

Hintergrund: 2. Teil der Risiken

Inhärente Risiken von CRISPR/Cas Anwendungen

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. Die Anwendungsmöglichkeiten der Genschere CRISPR/Cas sind sehr unterschiedlich und laufen in einem mehrstufigen Prozess ab. Dabei werden verschiedene molekularbiologische Techniken miteinander kombiniert, die jeweils mit spezifischen Risiken einhergehen. Wenn CRISPR/Cas in Zellen und den Zellkern eingebracht wird, können auf zellulärer Ebene ungewollte Veränderungen am Erbgut, an der RNA oder an Proteinen stattfinden. Das vorliegende Hintergrundpapier gibt einen Überblick über bereits bekannte, inhärente Risiken, die beim Einsatz von CRISPR/Cas und älteren Gentechnikverfahren auftreten können. Außerdem werden Verfahren vorgestellt mit denen genomeditierte Pflanzen umfangreich untersucht und unbeabsichtigte Veränderungen entdeckt werden können.

Genome Editing ist ein mehrstufiger Prozess, der zu unbeabsichtigten Veränderungen führen kann

Eine Anwendung der Genschere ist ein mehrstufiger Prozess, bei dem es zu verschiedenen unbeabsichtigten Veränderungen kommen kann, die spezifisch für alte und neue Gentechnik sind. Die verschiedenen Stufen der Anwendung der Genschere werden im Hintergrundpapier über die Technik ausführlich beschrieben.

Im ersten Schritt muss die Genschere zunächst in die pflanzlichen Zellen eingeschleust werden. Derzeit wird am häufigsten die Genschere-DNA, die die Information zur Bildung der Genschere trägt, in die Zelle eingebracht und in das Erbgut eingebaut. Dieser erste Schritt wird durch Verfahren der alten Gentechnik, wie zum Beispiel den Partikelbeschuss durch die Genkanone oder die *Agrobacterium*-Transformation, durchgeführt. Erst im nächsten Schritt wird die Genschere von der Zelle gebildet, die Zielsequenz erkennt und geschnitten. Dieser zweite Schritt stellt also die Anwendung der neuen Gentechnik dar, wenn die Genschere in der Zelle aktiv ist und die Zielsequenz sucht und schneidet.

Als Beispiel für die Risiken dieses mehrstufigen Prozesses soll ein Reis dienen, bei dem die Genschere CRISPR/Cas9 zu einer Ertragssteigerung eingesetzt wurde [1]. Dabei zeigte sich

bei einer anschließenden Risikobewertung der genomeditierten Reispflanzen, dass es zu unterschiedlichen unbeabsichtigten Veränderungen des Erbguts gekommen war:

1. Unbeabsichtigte Veränderungen durch die alte Gentechnik: Die Komponenten des CRISPR/Cas9-Systems wurden mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens* in die Zellen eingebracht, damit die Genscheren-DNA eingebaut werden kann. Dabei wurden zusätzlich auch Teile des Plasmids in das Erbgut der Reispflanzen eingefügt, mit dem die Genscheren-DNA in die pflanzliche Zelle transportiert wurde. Die Effekte waren in der nachfolgenden Generation nach der Genom-Editierung nachweisbar.
2. Unbeabsichtigte Veränderungen durch die neue Gentechnik: Im Erbgut einiger genomeditierter Reispflanzen wurden sogenannte Off-Target-Effekte gefunden, die sehr wahrscheinlich durch die Genschere CRISPR/Cas9 bewirkt wurden.
3. Weitere unbeabsichtigte Veränderungen durch die neue Gentechnik: Bei einigen Reispflanzen traten große Umstrukturierungen (wie Deletionen oder Insertionen) der DNA-Sequenz in der Nähe der Zielsequenz auf, ein Effekt, der als On-Target-Effekt bezeichnet wird.

Im folgenden Text werden diese und weitere unbeabsichtigte Veränderungen, die sowohl durch die Verfahren der alten Gentechnik als auch durch fehlerhafte und unpräzise Arbeitsweise der Genschere auftreten können und bereits mehrfach wissenschaftlich beschrieben wurden, ausführlich erklärt.

Unbeabsichtigte Veränderungen durch die alte Gentechnik

Viele wissenschaftliche Studien berichteten bereits von unbeabsichtigten Veränderungen am Erbgut von Pflanzen, nachdem sie mit Verfahren der alten Gentechnik behandelt wurden. Die alten Gentechnikverfahren werden überwiegend zum Einschleusen der Genscheren-DNA in pflanzliche Zelle verwendet. Als Zwischenschritt entsteht meist eine transgene Pflanze, die die genetische Information zur Bildung der Genschere im Erbgut trägt.

Zu den Verfahren der alten Gentechnik zählen der Partikelbeschuss mit der Genkanone, die Transformation mit dem Bodenbakterium *Agrobacterium tumefaciens* und die chemische Transformation mit PEG (mehr Informationen dazu sind im Hintergrundpapier über die Technik zu finden). Dabei wird die Genscheren-DNA in die pflanzlichen Zellen eingebracht und ungerichtet in das pflanzliche Erbgut eingebaut. Das Ziel hierbei ist es, dass dies einmal vollständig gelingt. Das ist jedoch der Idealfall, denn die Genscheren-DNA kann auch mehrfach und zum Teil fehlerhaft eingebaut werden. Das wurde anschaulich in verschiedenen Studien, wie beispielsweise an Sojabohnen [2; 3], Reis [1] oder der Ackerschmalwand [4], untersucht. In all diesen Studien wurde die genetische Information der Genschere CRISPR/Cas9 mit Hilfe des Agrobakteriums eingeschleust. Die Ergebnisse

zeigen, dass die Genscheren-DNA einmal, mehrfach, bruchstückhaft und an verschiedenen Stellen des Erbguts eingebaut werden kann. Wenn zusätzliche Kopien der Genscheren-DNA im Erbgut verbleiben, so steigt die Wahrscheinlichkeit, dass es in nachfolgenden Generationen zu unbeabsichtigten Veränderungen kommt. Außerdem können zusätzlich auch Teile des Plasmids in das Erbgut der Pflanzen eingebaut werden, mit dem die Genscheren-DNA transportiert wurde.

Bei der Transformation der Genscheren-DNA mit Hilfe des Bakteriums *Agrobacterium tumefaciens* kann es zudem zur Umstrukturierung von DNA-Sequenzen kommen [5; 6]. Hierbei können Teile des Erbguts gelöscht (man spricht auch von Deletionen), DNA-Sequenzen neu eingebaut (auch Insertionen genannt), DNA-Sequenzen an anderer Stelle des Erbguts eingefügt (sogenannte Translokationen) oder DNA-Sequenzen in ihrer Ausrichtung umgedreht werden (Inversionen) [7; 4; 8-10]. Außerdem konnten WissenschaftlerInnen zeigen, dass die Zusammensetzung der epigenetischen Marker in dem Bereich, wo die Genscheren-DNA eingebaut wurde, verändert werden kann [4]. Epigenetische Marker sind kleine Anhängsel an der DNA oder an Proteinen, die die Genaktivität regulieren. Man kann sich diese epigenetischen Marker wie kleine Schalter vorstellen, die an Genen sitzen und sie an- oder ausschalten. Anwendungen der alten Gentechnik können sich also auch auf die Regulierung der Genaktivität auswirken.

Auch beim Einsatz der sogenannten Genkanone wurden Nebenwirkungen beschrieben [11-13; 7]. Bei diesem Verfahren wird die Genscheren-DNA zusammen mit winzigen Metallpartikeln in einer Art Schrotschussverfahren in die Zellen eingeschossen. Auch hier kann DNA ungezielt und mehrfach in das Erbgut eingefügt werden [7]. Das wurde mit Hilfe von Whole-Genome-Sequencing-Verfahren genauer am Reis und Mais untersucht [7]. Whole-Genome-Sequencing-Verfahren sind moderne DNA-Sequenzierungsverfahren, mit denen die genaue Abfolge der DNA-Sequenz des gesamten Erbgutes entschlüsselt werden kann.

Es zeigte sich, dass auch beim Partikelbeschuss Insertionen und Umstrukturierungen der DNA auftreten. Durch den physischen Beschuss werden vielfach DNA-Schäden, wie Doppelstrangbrüche, verursacht. An diesen Stellen im Erbgut können DNA-Fragmente, die in der pflanzlichen Zelle vorhanden sind, eingebaut werden. Das können beispielsweise Teile der eingebrachten Genscheren-DNA oder DNA aus den Chloroplasten der Pflanzen sein. Chloroplasten sind in der pflanzlichen Zelle für die Photosynthese zuständig. Wenn die Genscheren-DNA mit der Genkanone eingeschossen wird und dabei die Chloroplasten in der Zelle getroffen werden, können Gene aus den Chloroplasten ungewollt in das Erbgut im Zellkern der Pflanzen eingebaut werden.

Auch bei Anwendungen an Tieren wurden ähnliche Effekte bereits beschrieben und zeigen, wie wichtig es bei einer Risikobewertung genomeditierter Organismen ist, das genaue Verfahren inklusive aller Zwischenschritte zu kennen. Als Beispiel wäre hier der Einsatz der

Genschere TALENs an Rindern zu nennen, um Hornlosigkeit zu bewirken [14]. Dazu wurde eine DNA-Vorlage der Gensequenz für die Hornlosigkeit mit in die Zellen eingebracht, damit sie an einer Zielsequenz im Erbgut der Rinder eingebaut wird. Es handelt sich also um eine SDN-3-Anwendung der Genschere, bei der zusätzliche Gensequenzen eingefügt werden. Bei Untersuchungen der genomeditierten Rinder zeigte sich allerdings, dass sich nicht nur die gewünschte Gensequenz, sondern auch Genkonstrukte der gentechnisch veränderten Bakterien im Erbgut befinden, die als Hilfsmittel bei der gentechnischen Veränderung genutzt wurden [15]. Im Erbgut der Rinder finden sich unter anderem vollständige DNA-Sequenzen, die Resistenzen gegenüber Antibiotika verleihen. Welche Auswirkungen das auf die Gesundheit der Tiere hat und ob die Gene biologisch aktiv sind, wurde nicht untersucht.

Unbeabsichtigte Veränderungen durch fehlerhafte bzw. unpräzise Anwendung der Genschere

Auch bei der neuen Gentechnik, also Genome-Editing-Verfahren wie CRISPR/Cas, können unbeabsichtigte Veränderungen im Erbgut von Pflanzen auftreten. Da die Anwendungsmöglichkeiten von CRISPR/Cas vielfältig sind, muss genau bekannt sein, wie die Genschere verwendet wurde, um die spezifischen Risiken eingehender zu untersuchen.

Bei klassischen Anwendungen der Genschere, bei denen an einer oder mehreren Zielsequenzen geschnitten wird, wurden bereits sogenannte Off-Target-Effekte und On-Target-Effekte beschrieben. Außerdem können ungewollte DNA-Fragmente zusätzlich in das Erbgut eingebaut und unbeabsichtigt neue Genprodukte gebildet werden. Alle aufgelisteten ungewollten Veränderungen können bei SDN-1-, SDN-2- und SDN-3-Anwendungen der Genschere auftreten, also wenn die DNA an einer oder mehreren Zielregion(en) geschnitten wird.

Bei SDN-2 und SDN-3 ergeben sich zusätzliche ungewollte Veränderungen. Es können zum Beispiel die DNA-Vorlagen in das Erbgut eingebaut oder epigenetische Marker umgeschrieben werden. Bei Verfahren, die nicht an der Zielsequenz schneiden, sondern eine nicht-schneidefähige Genschere verwenden, können prozessspezifische Risiken auftreten, die im Folgenden genauer erklärt werden.

Off-Target-Effekte (OTEs)

Off-Target-Effekte der Genschere wurden bereits bei vielen Organismen beschrieben, einschließlich menschlicher, tierischer und pflanzlicher Zellen. Off-Target-Effekte können dadurch entstehen, dass die Genschere an unbeabsichtigten Stellen des Erbguts schneidet. Häufig sind diese der eigentlichen Zielsequenz sehr ähnlich [16-18]. Die Genschere verwechselt die Off-Target-Bereiche mit der eigentlichen Zielsequenz und schneidet dort. Die Schnitte aktivieren die zelleigenen Reparaturmechanismen und können dort unbeabsichtigte Veränderungen wie zum Beispiel Punktmutationen oder kleine Insertionen

und Deletionen hervorrufen. Es werden also dieselben Prozesse wie an der Zielsequenz in Gang gesetzt.

Die Off-Target-Veränderungen können verschiedene Auswirkungen haben und sind abhängig vom jeweiligen Kontext, in dem sie bewirkt werden. Die unbeabsichtigten Veränderungen können zum Beispiel zum Ausschalten von Genen, zur Veränderung der Gensequenz oder auch der Genaktivität führen.

Das Auftreten von Off-Target-Effekten ist dabei von vielen verschiedenen Faktoren abhängig [18]. Vor allem die Entwicklung einer geeigneten gRNA für eine spezifische Zielsequenz spielt dabei eine besonders wichtige Rolle. Es zeigte sich, dass, je ähnlicher sich zwei Stellen im Erbgut sind, die Wahrscheinlichkeit umso höher ist, dass die Genschere unpräzise arbeitet. Unterscheidet sich der Zielbereich von Off-Target-Bereichen nur um eine oder zwei Basen, so ist es sehr wahrscheinlich, dass die Genschere an beiden Stellen schneidet [18].

Die Komplexität von CRISPR/Cas-Anwendungen (mehr Informationen dazu sind im Hintergrundpapier über die Möglichkeiten von CRISPR/Cas zu finden) spielt auch eine wichtige Rolle für die Analyse der der Technologie inhärenten Risiken und sollte dementsprechend bei einer Risikoanalyse berücksichtigt werden:

1. CRISPR/Cas kann an Stellen des Erbguts eingreifen, an denen natürlicherweise nur sehr unwahrscheinlich Veränderungen auftreten. Das bedeutet, dass unbeabsichtigte Effekte an Bereichen bewirkt werden können, die beispielsweise durch zelleigene Reparaturmechanismen geschützt werden oder die schlecht zugänglich sind (im Bereich des Zentromers und weiteren dicht verpackten DNA-Bereichen).
2. Wird die Genschere beim Multiplexing an mehrere verschiedene Stellen des Erbguts geführt, so können auch an mehreren Off-Target-Bereichen OTEs bewirkt werden. Dementsprechend müssen ausführlichere Analysen des Erbmaterials durchgeführt werden.
3. Die Fähigkeit von CRISPR/Cas, alle DNA-Regionen mit derselben Sequenz zu verändern, sollte auch bei der Risikobewertung berücksichtigt werden. Sollte ein Off-Target-Bereich mehrfach in einer Pflanze vorkommen, beispielsweise in der DNA-Sequenz eines Gens einer Genfamilie, kann es dazu kommen, dass gleich mehrere bzw. alle Gene dieser Genfamilie unbeabsichtigt verändert werden. Ein weiteres Beispiel sind polyploide Pflanzen: Bei diesen kann CRISPR/Cas einen Off-Target-Bereich so oft verändern, wie Genvarianten (sogenannte Allele) mit dieser DNA-Sequenz im Erbgut vorhanden sind.

Mit Hilfe von sogenannten Genomics-Verfahren ist es möglich, die DNA-Sequenz von genomeditierten Pflanzen zu analysieren und zu überprüfen, ob OTEs nach einer Anwendung der Genschere im Erbgut bewirkt wurden. Bisher gibt es jedoch nur wenige Studien, in denen das gesamte Erbgut von genomeditierten Pflanzen mit Hilfe von Whole-Genome-

Sequencing-Verfahren (WGS-Verfahren) untersucht wurde [19-22]. In allen WGS-Studien an genomeditierten Pflanzen wird betont, dass das Design der gRNA ausschlaggebend für das Auftreten von OTEs ist. Im Vergleich zu unbeabsichtigten Veränderungen, die während der Arbeiten in der Zellkultur entstehen (auch somaklonale Variation genannt), treten OTEs hier eher selten auf. Die Risiken sind von Fall zu Fall unterschiedlich, da sie stark abhängig sind vom jeweiligen Kontext, wo im Erbgut sie entstanden sind.

Meist wird mit Hilfe von Computerprogrammen und Referenzgenomen berechnet, welche Bereiche des Erbguts der Zielsequenz sehr ähnlich sind. Wie bereits erläutert, treten an diesen mit höherer Wahrscheinlichkeit OTEs auf, weswegen überwiegend nur dort gezielt mit Hilfe von sogenannten PCR-Verfahren gesucht wird [19]. Das restliche Erbgut wird also nicht weiter auf mögliche Fehler der Genschere überprüft. Die Berechnung der Off-Target-Bereiche hängt stark von den Einstellungen des Computerprogramms, dem Referenzgenom und der Erfahrung des/der jeweiligen Wissenschaftlers/Wissenschaftlerin ab.

Auch andere experimentelle Parameter können das Auftreten von OTEs beeinflussen: Damit CRISPR/Cas optimal funktioniert, muss die Genschere in einer auf den jeweiligen Zelltyp genau abgestimmten Menge in der Zelle vorliegen. Ist die Konzentration der Genschere zu hoch, können vermehrt Off-Target-Effekte auftreten, ist sie zu niedrig, werden die erwünschten Effekte nicht erreicht. Es muss also ein geeignetes Verhältnis zwischen der Effizienz, um an der Zielsequenz einer Veränderung zu bewirken, und dem Auftreten von Off-Target-Effekten gefunden werden.

In Studien, die das Erbgut genomeditierter Pflanzen mit WGS-Verfahren untersuchten, zeigte sich, dass ein aussagekräftiges Referenzgenom besonders wichtig ist, um wirklich alle Off-Target-Bereiche zu untersuchen. In einer Studie wurde eine genomeditierte Baumwolle mit WGS-Verfahren auf vorhandene OTEs hin untersucht [21]. Es zeigte sich darin, dass das Erbgut der Ausgangspflanzen als Referenzgenom verwendet werden sollte, um natürliche genetische Varianten zu identifizieren. Außerdem spiegeln die verfügbaren Referenzgenome von Pflanzen oft nicht die Bandbreite der vorhandenen genetischen Varianten verschiedener Pflanzenlinien wider, weswegen zusätzliche Off-Target-Bereiche im Erbgut vorhanden sein können. Ohne eine WGS-Analyse des Erbguts der Ausgangspflanze können zusätzliche Off-Target-Bereiche also unentdeckt bleiben.

Pflanzen mit einem sehr komplexen Erbgut und sich häufig wiederholenden DNA-Sequenzen stellen immer noch eine große Herausforderung bei WGS-Verfahren dar. Solche Bereiche können oft nicht eindeutig sequenziert werden. In einer Studie an einem genomeditierten Mais konnten beispielsweise nicht alle Off-Target-Bereiche untersucht werden [20]. An einem genomeditierten Reis konnte an einem vorher berechneten Off-Target-Bereich ein OTE nachgewiesen werden [22]. Aufgrund der geringen Studienanzahl und zum Teil noch lückenhaften Datenlage kann nicht geschlussfolgert werden, dass die durch die Genschere bewirkten OTEs in Off-Target-Bereichen zu vernachlässigen sind. Dafür müssen zum einen

WGS-Verfahren in vielen verschiedenen Pflanzenarten systematisch durchgeführt und ausgewertet und zum anderen die Referenzgenome und die WGS-Verfahren an sich weiter verbessert werden.

Oft wird in Frage gestellt, dass durch CRISPR/Cas bewirkte OTEs eindeutig von natürlicherweise auftretenden oder verfahrensbedingten Mutationen (somaklonale Variationen) unterschieden werden können. Wie oben schon erklärt, können WGS-Analysen der Ausgangspflanzen bereits vorhandene genetische Varianten identifizieren. Außerdem kann eine vorhandene PAM-Sequenz in der Nähe von OTEs Aufschluss darüber geben, ob diese neue Veränderung der DNA durch die Genschere bewirkt wurde. Auch an Off-Target-Bereichen benötigt die Genschere eine PAM-Sequenz, um die davorliegende DNA-Sequenz zu schneiden. Dieser Aspekt wurde bereits dafür verwendet, um CRISPR/Cas-induzierte OTEs als solche zu identifizieren [21].

On-Target-Effekte

Bei der Anwendung der Genschere CRISPR/Cas können neben den Off-Target-Effekten auch sogenannte On-Target-Effekte auftreten. Dabei handelt es sich um unbeabsichtigte Umstrukturierungen im Bereich der Zielsequenz sowie das unbeabsichtigte Einfügen von zusätzlichen DNA-Fragmenten am Zielbereich (siehe Abbildung 1).

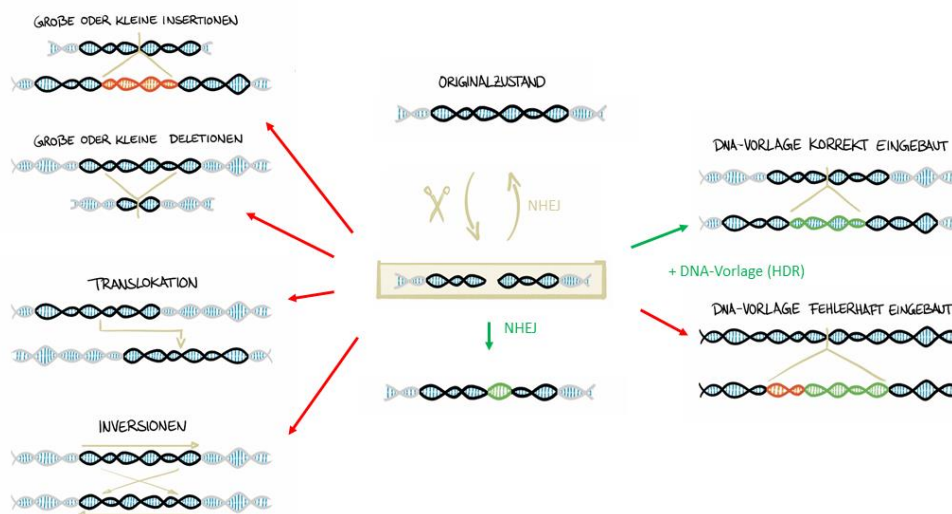


Abbildung 1: Schematische Darstellung von On-Target-Effekten

On-Target-Effekte sind unbeabsichtigte Umstrukturierungen im Bereich der Zielsequenz, wie Deletionen, Insertionen, Translokationen oder Inversionen, sowie das unbeabsichtigte Einfügen von zusätzlichen DNA-Fragmenten am Zielbereich, zum Beispiel, wenn die DNA-Vorlage fehlerhaft eingebaut wird.

Solche unbeabsichtigten Effekte wurden bereits an den gewollten Schnitten der Genschere nachgewiesen, können aber auch an Off-Target-Bereichen auftreten.

Zu den unbeabsichtigten Umstrukturierungen zählen zum einen große oder kleine Deletionen – DNA-Stücke können also gelöscht werden –, zum anderen große oder kleine Insertionen, also der Einbau von zusätzlichen DNA-Sequenzen. Der DNA-Bereich der Zielsequenz und angrenzender Bereiche kann aber auch an einer anderen Stelle im Erbgut eingefügt werden. Dann spricht man von einer Translokation. Zur Entstehung von Translokationen müssen zeitgleich mehrere Doppelstrangbrüche in einer Zelle auftreten und sich räumlich sehr nahe kommen, dann kann es zu einem Austausch von DNA-Bereichen kommen. Außerdem kann die Ausrichtung des DNA-Zielbereichs umgedreht werden, was man als Inversion bezeichnet.

On-Target-Effekte wurden bislang vor allem an menschlichen Zellen und Mauszellen analysiert und beschrieben [23-26]. Bei Pflanzen gibt es nur wenige Studien, die die Zielsequenz nach On-Target-Effekten nach der Anwendung der Genschere untersuchen [27; 3]. Die Verfahren, mit denen uneingeschränkt nach On-Target-Effekten gesucht werden kann [28; 29], werden noch nicht standardmäßig in Pflanzen angewandt [30]. Hier besteht Nachholbedarf in der Risikoanalyse, um solche unbeabsichtigten Umstrukturierungen der DNA-Sequenz und deren Konsequenzen zu ermitteln. Auf der anderen Seite gibt es bereits erste wissenschaftliche Arbeiten, die solche Umstrukturierungen gezielt durch CRISPR/Cas auslösen, um bestimmte Forschungsziele zu erreichen [31-33].

Analysen von WGS-Daten aus menschlichen Zellen und Mauszellen geben einen Überblick, wie häufig und welche Umstrukturierungen der DNA bei einer Anwendung von CRISPR/Cas auftreten [34; 35]: Am häufigsten sind Deletionen an der Zielsequenz, gefolgt von Insertionen und zu einem geringeren Anteil Translokationen.

Große Deletionen entstehen vor allem durch einen Reparaturmechanismus namens MMEJ (engl.: Microhomology-mediated end joining), der alternativ zur NHEJ-Reparatur aktiviert wird [36].

Große Insertionen können sowohl an der Zielsequenz als auch an anderen Stellen des Erbguts vorkommen und sind häufig eingebaute Teile des Transport-Vektors. Ein Vektor wird während eines CRISPR/Cas-Experiments dazu verwendet, um die Genscheren-DNA in die Zellen einzuschleusen.

Translokationen entstehen, wenn zeitgleich mehrere Doppelstrangbrüche der DNA in einer Zelle auftreten und sich räumlich sehr nahe kommen. Mehrere Doppelstrangbrüche können zum Beispiel durch Multiplexing, also während der gleichzeitigen Veränderung mehrerer unterschiedlicher Zielsequenzen, hervorgerufen werden, aber auch, wenn die Genschere an einer ungewollten Stelle im Erbgut schneidet, oder durch natürlicherweise auftretende Doppelstrangbrüche. Die meisten Translokationen sind auf demselben Chromosom zu finden, auf dem auch die Zielsequenz der Genschere liegt, manchmal aber auch auf anderen Chromosomen. Außerdem sind Translokationen auch an Off-Target-Bereichen zu finden [35]. Studien berichten außerdem von ganz erheblichen Veränderungen des Erbguts in menschlichen Zellen [37; 38]. So wurden beispielsweise Teile bis hin zu ganzen

Chromosomen gelöscht oder in einem Vorgang namens Chromothripsis massiv umstrukturiert. Beide Effekte wurden durch den Schnitt der Genschere an der Zielsequenz oder an Off-Target-Bereichen ausgelöst. Bei Pflanzen wurde diese Verbindung zwischen der Anwendung von CRISPR/Cas und Chromothripsis noch nicht beschrieben.

Bei SDN-2- und SDN-3-Anwendungen können die DNA-Vorlagen, die durch die HDR (engl.: Homology directed repair) im Zielbereich eingebaut werden sollen, dort mehrfach bzw. fehlerhaft eingefügt werden. An Pflanzen werden überwiegend SDN-1-Anwendungen durchgeführt, da die Effizienz von SDN-2- und SDN-3-Anwendungen recht niedrig ist. Daher sind es vor allem Studien an menschlichen und tierischen Zellen, die von solchen unbeabsichtigten Effekten berichten. In Mäuse-Studien wurde gezeigt, dass bei der Anwendung von CRISPR/Cas9 DNA-Vorlagen mehrfach innerhalb von Zielsequenzen eingebaut und mit einfachen PCR-Verfahren nicht nachgewiesen werden können [39]. Bei einem großen Anteil der Nachkommen der genomeditierten Mäuse war diese Mehrfachinsertion vorhanden.

Derselbe Effekt trat bei weiteren Versuchen wiederholt auf und scheint ein generelles Phänomen bei der Anwendung von CRISPR/Cas9 zu sein. Überraschenderweise war es mit normalen PCR-Verfahren nicht möglich, diesen Mehrfacheinbau der DNA-Vorlage nachzuweisen, sondern erst durch eine geeignete Kombination aus verschiedenen Verfahren.

Einbau von artfremder DNA

Es zeigte sich, dass – neben der DNA-Vorlage und dem Transportvektor zum Einschleusen der Genschere-DNA – auch DNA aus anderen Organismen an der Zielsequenz eingebaut werden kann. In einer Studie an Mauszellen wurde untersucht, welche Veränderungen an der Zielsequenz herbeigeführt werden [40]. In einigen Fällen wurden große DNA-Stücke eingebaut. Das meiste davon stammte aus dem Vektor, mit dem die Genschere-DNA in die Zellen eingebracht wurde, ein weiterer Teil der DNA-Fragmente aus dem Erbgut der Maus selbst sowie ein geringerer Anteil aus dem Bakterium *E. coli*, mit dem im Labor die Genschere-DNA vervielfältigt wurde, bevor diese dann in die Zellen eingebracht wurde. Überraschenderweise war auch ein geringer Anteil der zusätzlichen DNA-Fragmente auf das Erbgut von Rindern zurückzuführen. Die Erklärung dafür: Bei der Arbeit in der Zellkultur muss dem Nährmedium der Mauszellen etwas Rinderserum beigefügt werden, damit die Zellen sich vermehren und überleben können. Die DNA aus dem Rind wird über kleine Vesikel in die Mauszellen eingeschleust. Für die Anwendung von CRISPR/Cas9 ergeben sich dadurch wesentliche Aspekte für die Risikobewertung:

Doppelstrangbrüche begünstigen den Einbau von Fremd-DNA, was ein generelles Problem im Grundkonzept der Genschere ist. Artfremde DNA-Fragmente, die beispielsweise als Verunreinigungen während der Arbeit in der Zellkultur mit in die Zielzellen eingeschleust

werden, können theoretisch auch an Off-Target-Bereichen und natürlicherweise auftretenden Doppelstrangbrüchen der DNA eingebaut werden.

Unbeabsichtigte Bildung von neuen Genprodukten

Bei einer Anwendung der Genschere können verschiedene Veränderungen an der Zielsequenz bewirkt werden. Die Zielsequenz kann so verändert werden, dass die Bildung von mRNAs und damit des entsprechenden Proteins verhindert wird. Außerdem können bestimmte Eingriffe in die DNA-Sequenz dazu führen, dass mRNAs mit einer veränderten Zusammensetzung entstehen, also zum Beispiel einzelne Bereiche des Gens gelöscht werden. Die daraus gebildeten verkürzten Proteine können beispielsweise eine spezifische Funktion nicht mehr ausführen.

Es können aber auch unbeabsichtigt neue mRNAs auftreten, die vom/von der AnwenderIn übersehen und aus denen neue Proteine gebildet werden können [41]. Beispielsweise kann es zu einem Effekt namens Exon Skipping kommen. Beim Exon Skipping bewirkt die gewollte Veränderung an der Zielsequenz, dass die mRNAs anders als geplant zusammengesetzt werden. Es können mRNAs entstehen, die verkürzt sind. Das daraus gebildete Protein ist dann natürlich auch kürzer und kann in der Zelle noch Funktionen ausführen. Manchmal werden auch die ursprünglichen Proteine weiterhin in der Zelle gebildet, obwohl das zugrundeliegende Gen ausgeschaltet wurde [42-44; 41].

Außerdem können die beabsichtigten Veränderungen zur Entstehung von sogenannten Frameshift-Mutationen führen. Frameshift bedeutet, dass sich das Leseraster der DNA-Sequenz von Genen verschiebt und die Gene ganz anders abgelesen werden können. Im Ergebnis können neue mRNAs und Proteine gebildet werden, die auch neue Funktionen im Zellstoffwechsel ausführen können. Solche unbeabsichtigten Effekte sind auf der Ebene der DNA oft nicht erkennbar. Es ist jedoch wichtig, diese aufzudecken, weil Veränderungen der Proteinzusammensetzung ein wichtiger Gesichtspunkt für die Bewertung der Umwelt- und Lebensmittelsicherheit sind. Zum Beispiel ist es möglich, dass Allergene entstehen, die eine Immunantwort auslösen können.

CRISPR/Cas wird in vielen Fällen dafür eingesetzt, komplexe Veränderungen im Erbgut von Pflanzen zu bewirken. Es können beispielsweise mehrere Mitglieder einer ganzen Genfamilie gleichzeitig verändert werden [45]. Solche komplexen SDN-1-Anwendungen gehen mit inhärenten Risiken einher: An jeder einzelnen Zielsequenz, an der die Genschere eine Veränderung herbeiführt, können neue Genprodukte mit unbeabsichtigten Auswirkungen gebildet werden. Ein Beispiel soll das veranschaulichen: In einem genomeditierten Weizen wurden mit Hilfe der Genschere 35 von insgesamt 45 α -Gliadin-Genen verändert. Das bedeutet, dass an jeder der 35 Stellen des Erbguts verschiedene Veränderungen an der DNA-

Sequenz bewirkt wurden. Diese Veränderungen müssen analysiert und eventuell neu gebildete Genprodukte untersucht werden. Solche Risiken müssen in genomeditierten Pflanzen beispielsweise durch den Einsatz von Metabolomics- und Genomics-Verfahren untersucht werden.

SDN-2 und SDN-3

Bei SDN-2- und SDN-3-Anwendungen der Genschere werden DNA-Vorlagen in Zellen eingeschleust, die an der jeweiligen Zielsequenz im Erbgut des Zielorganismus eingebaut werden sollen. In diesem Zusammenhang können unbeabsichtigte Veränderungen auftreten. Wie schon beschrieben, kann die DNA-Vorlage fehlerhaft ins Erbgut eingebaut werden, beispielsweise mehrfach, oder auch nur Teile davon. Das kann direkt an der Zielsequenz geschehen und/oder an ganz anderen Bereichen des Erbguts (z.B. an Off-Target-Bereichen).

Außerdem zeigen Untersuchungen an Mauszellen, dass sich die Zusammensetzung von epigenetischen Markern im Bereich der Zielsequenzen verändert, wenn dort durch die Anwendung von CRISPR/Cas DNA-Vorlagen eingefügt werden [46]. Unklar ist, ob die Genaktivität in den genomeditierten Mäusen durch die veränderten epigenetischen Marker beeinflusst wird. Es ist davon auszugehen, dass die Genaktivität von Genen in unmittelbarer Nähe zu der beabsichtigten Veränderung beeinträchtigt sein kann.

Bei Pflanzen wurde bisher die Verteilung der epigenetischen Marker nach SDN-1-Anwendungen der Genschere untersucht [47]. In den analysierten Fällen war diese nicht verändert. Ob das bei SDN-2- und SDN-3-Anwendungen der Genschere in Pflanzen auch der Fall ist, ist bisher noch nicht untersucht worden.

Ungewollte Nebeneffekte anderer CRISPR/Cas-Varianten

Im Hintergrundpapier über die möglichen Anwendungen von CRISPR/Cas wurden einige Beispiele aus der wissenschaftlichen Literatur vorgestellt, wie die klassische Genschere weiterentwickelt wurde. Die bereits bekannten ungewollten Veränderungen und auch nicht untersuchte Risiken dieser Anwendungen werden hier genauer beschrieben.

Epigenome Editing

Das CRISPR/Cas-System kann auch dazu verwendet werden, die Epigenetik, das heißt die Genaktivität zu verändern. Dazu wird nicht die DNA, sondern die Zusammensetzung von epigenetischen Markern verändert, was Einfluss auf die Aktivität der Gene haben und dazu führen kann, dass bestimmte Gene an- oder abgeschaltet werden.

Die Genschere wurde dafür so verändert, dass sie die DNA nicht mehr schneidet (dead Cas9/dCas9), sie die DNA aber noch binden kann. An die Genschere werden Enzyme

gekoppelt, die an der Zielsequenz die Zusammensetzung der epigenetischen Marker verändern sollen [48-50].

Allerdings zeigte sich, dass diese Enzyme unspezifisch über das gesamte Erbgut aktiv werden und an ungewollten Stellen epigenetische Veränderungen bewirken können [51-53]. Damit kann die Genexpression an ganz anderer Stelle beeinflusst werden, wodurch die Eigenschaften der betroffenen Organismen grundlegend verändert werden können, ohne dass dies auf der Ebene der DNA erkennbar wäre. WissenschaftlerInnen arbeiten an Weiterentwicklungen des Epigenome Editings, um Off-Target-Effekte zu verringern [54]. Bislang gibt es vor allem Epigenome-Editing-Anwendungen in menschlichen und tierischen Zellen und nur wenige in Pflanzen.

Base Editing

Beim Base Editing werden Enzyme an die nicht zum Schneiden fähige Genschere CRISPR/dCas9 angehängt. Diese können bestimmte Basenarten an der Zielsequenz der DNA in andere Basenarten umwandeln, also Cytosin in Thymin und Adenin in Guanin. Dabei sind unbeabsichtigte Veränderungen auf verschiedenen Ebenen der Zelle möglich:

Zum einen wurde an einem Reis gezeigt, dass bestimmte Base-Editoren ungewollte Veränderungen im Erbgut verursachen können [55], und zwar über das gesamte Erbgut hinweg und nicht nur an bestimmten DNA-Bereichen. Für die Risikobewertung solcher Pflanzen sollte also das gesamte Erbgut mit Hilfe von Whole-Genome-Sequencing-Verfahren untersucht werden. Die unspezifischen, ungewollten Veränderungen an willkürlichen Stellen des Erbguts zeigen, wie unpräzise und ungenau Base-Editoren sind.

Außerdem stellte man fest, dass Base-Editoren ungewollt mRNA-Moleküle verändern können [56]. Dabei wurden unbeabsichtigt mehrere Cytosine in Uracile umgewandelt, wodurch Proteine anders gebildet werden. Diese ungewollten C-zu-U-Veränderungen auf RNA-Ebene treten unabhängig von unbeabsichtigten Effekten auf der DNA-Ebene auf und werden durch eine zusätzliche Aktivität der Base-Editoren bewirkt. Auch bei Base-Editoren, die eine Umwandlung von Adenin nach Guanin hervorrufen, wird diese Art von unbeabsichtigten Veränderungen auf der RNA-Ebene gefunden [56].

Prime Editing

Prime Editing ist eine komplexe Anwendung der Genschere mit ebenso komplexen Risiken (eine ausführliche Beschreibung dieser Anwendung ist im Hintergrundpapier über die Möglichkeiten von CRISPR/Cas zu finden).

Zum einen können unbeabsichtigte Veränderungen an Off-Target-Bereichen, also an Stellen des Erbguts, die der eigentlichen Zielsequenz ähneln, aber auch an ganz anderen Orten auftreten. Die übersetzte RNA-Vorlage kann dabei an einem Bereich des Erbguts mehrfach und/oder an verschiedenen Bereichen eingebaut werden.

Zusätzlich kann die Reverse Transkriptase, der Übersetzer des Prime Editings, auch andere RNA-Moleküle wie etwa mRNAs, die natürlicherweise in der Zelle vorkommen, in DNA übersetzen und diese dann in das Erbgut ungewollt einbaut werden.

Falls die genetische Information des Prime-Editors in die pflanzlichen Zellen eingeschleust wird, können auch zu einem späteren Zeitpunkt Teile davon eingefügt werden: Die genetische Information für den Prime Editor wird zunächst in das Erbgut der Pflanze eingebaut und anschließend in der pflanzlichen Zelle abgelesen. Die dabei gebildete mRNA wird dann in den eigentlichen Prime-Editor übersetzt. Bei einem Zwischenschritt kann es zu unbeabsichtigten Effekten kommen: Die gebildete Prime-Editor-mRNA kann von bereits gebildeten Prime-Editoren in DNA übersetzt werden und diese DNA ungewollt in das Erbgut eingebaut werden.

Zusammenfassend können viele unbeabsichtigte Veränderungen beim Prime Editing auftreten. Deshalb sollten solche Organismen mit geeigneten Verfahren wie beispielsweise WGS- oder NGS-Verfahren untersucht werden, um zu überprüfen, ob irgendwo im Erbgut ungewollte Veränderungen bewirkt wurden.

Es gibt bisher nur wenige Studien, die sich mit den Risiken des Prime Editings beschäftigen und solche unbeabsichtigten Veränderungen im Erbgut ermitteln [57; 58].

In einer Studie an menschlichen Zellen wurde nach Off-Target-Effekten im gesamten Erbgut gesucht. Es treten demnach wenige Off-Target-Effekte an anderen Stellen der DNA als der Zielregion auf [57]. Eine andere Studie durchsuchte das gesamte Erbgut von Reis nach unbeabsichtigten Veränderungen, nachdem verschiedene Zielgene mit einem Prime-Editor verändert wurden [58]. Auch dabei wurden wenige Off-Target-Effekte an Stellen gefunden, die dem Zielbereich ähneln. Es wurden keine Off-Target-Effekte an Bereichen des Erbguts gefunden, die der Zielsequenz nicht ähneln. Andere unbeabsichtigte Veränderungen wurden in dieser Analyse nicht gefunden. Nun müssen weitere Studien an anderen Nutzpflanzenarten, die vor allem ein komplexeres Erbgut als der Reis besitzen, durchgeführt werden, um die Risiken des Prime Editings genauer zu untersuchen.

Wie sollten genomeditierte Pflanzen untersucht werden?

Die Anwendungsmöglichkeiten der Genschere CRISPR/Cas sind sehr unterschiedlich und laufen in einem mehrstufigen Prozess ab. Dabei werden verschiedene molekularbiologische Techniken miteinander kombiniert, die jeweils mit spezifischen Risiken einhergehen. Das Auftreten solcher Risiken sollte bei Anwendungen von Genome Editing in Pflanzen und Tieren, die darauf abzielen, eine Zulassung zu erlangen, auch umfassend untersucht werden. Die genomeditierten Organismen müssen in einer umfassenden Analyse untersucht werden, um ungewollte Veränderungen am Erbgut und den nachgeschalteten Ebenen der RNA, Proteinen und Stoffwechselprodukten zu identifizieren. Die Verfahren des mehrstufigen Prozesses, die eingesetzt wurden, um die Pflanzen mit der Genschere zu verändern, sollten

im besten Falle bekannt sein, um die geeignetsten Analyseverfahren auszuwählen. Im Folgenden werden verschiedene Analyseverfahren vorgestellt, mit denen unbeabsichtigte Veränderungen aufgespürt werden können.

PCR-Analysen zur Untersuchung von Off-Target-Bereichen

Am häufigsten werden klassische PCR-Analysen durchgeführt, um an einigen Stellen im Erbgut nach unbeabsichtigten Off-Target-Effekten zu suchen [19]. Dafür werden zuerst mit Hilfe von Computerprogrammen Bereiche des Erbguts bestimmt, die der eigentlichen Zielsequenz sehr ähnlich sind und wo die Genschere unbeabsichtigt schneiden und Veränderungen auslösen kann. Die berechneten Bereiche des Erbguts werden im Anschluss an ein durchgeführtes Experiment mit der Genschere in den genomeditierten Zellen untersucht und die genaue Abfolge der DNA-Basen der möglichen Off-Target-Bereiche entschlüsselt. In den meisten Studien werden allerdings nur wenige Off-Target-Bereiche untersucht.

Omics-Verfahren

Es gibt eine Reihe von Verfahren, mit denen die verschiedenen molekularen Ebenen einer Zelle uneingeschränkt analysiert werden können. Diese werden unter dem Oberbegriff Omics zusammengefasst werden. Mit diesen Verfahren können unbeabsichtigte Veränderungen aufgespürt werden, die sowohl durch die Anwendung der Genschere als auch anderer Verfahren entstehen können. Zusätzlich zu den Omics gezählt werden oft auch Verfahren zur Analyse des Epigenoms, also der Gesamtheit aller epigenetischen Marker, die die Genaktivität steuern, sowie Verfahren, die die Zusammensetzung des Mikrobioms eines Organismus entschlüsseln. Diese Verfahren werden in diesem Hintergrundpapier nicht weiter erklärt.

1. Analyseverfahren, mit denen man die DNA-Sequenz eines Organismus untersuchen kann, zum Beispiel mittels Genomsequenzierung, werden unter dem Begriff Genomics zusammengefasst. Zu den Genomics zählen sogenannte Whole-Genome-Sequencing (WGS)-Verfahren, mit denen das gesamte Erbgut eines Organismus sequenziert und damit die genaue Abfolge der Basen der DNA entschlüsselt werden kann. Mit Hilfe eines Referenzgenoms und des sequenzierten Erbguts der genomeditierten Pflanze kann man vergleichen, welche Veränderungen durch die Genschere CRISPR/Cas bewirkt wurden. Es können sowohl die gewollten als auch die ungewollten und unbekanntenen Veränderungen der DNA-Sequenz ermittelt werden. Die WGS-Verfahren sind für Pflanzen mit einem komplexen Erbgut – und damit beispielsweise vielen sich wiederholenden DNA-Sequenzen – oft noch nicht detailliert genug. Dadurch kann mitunter nicht sichergestellt sein, dass wirklich das gesamte

Erbgut aufgeschlüsselt wird. Außerdem fehlen häufig noch vollständige Referenzgenome von weniger gut untersuchten Pflanzen, wie zum Beispiel sog. Orphan Crops.

Es wurden in den letzten Jahren weitere Verfahren entwickelt, die zu den Genomics gezählt werden, mit denen das Erbgut gezielt nach Off-Target- oder On-Target-Effekten untersucht werden kann. Diese sind auch unter dem Begriff NGS oder Next-Generation-Sequencing bekannt. Zu nennen ist beispielsweise Digenome-Seq [59]. Dieses Verfahren wird zur genomweiten Analyse von Off-Target-Effekten in Pflanzen verwendet [60].

2. Unter dem Oberbegriff Transcriptomics werden Analyseverfahren zusammengefasst, mit denen man die Zusammensetzung aller RNA-Moleküle einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt bestimmen kann. RNA ist zum einen das Zwischenprodukt ausgehend von der DNA-Sequenz zur Bildung von Proteinen, sie kann aber auch regulatorische Funktionen einnehmen (z.B. miRNA, long non-coding RNA). Durch Transcriptomics-Verfahren kann die Gesamtheit aller RNAs einer durch CRISPR/Cas veränderten Zelle ermittelt und mit unveränderten Zellen verglichen werden, um so ungewollte Nebeneffekte, wie Veränderungen der Genexpression von Nicht-Ziel-Genen oder anders zusammengesetzte mRNAs, nachzuweisen.
3. Die Proteomics sind Analyseverfahren aller vorhandenen Proteine einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt und ermöglichen den Vergleich von veränderten mit unveränderten Zellen. Damit können ungewollte Nebeneffekte ermittelt werden wie etwa falsch zusammengesetzte Proteine durch Exon-Skipping. Proteomics schließen zum Beispiel Verfahren der Massenspektrometrie ein.
4. Zu den Metabolomics zählen Verfahren, mit denen man die Zusammensetzung der Stoffwechselprodukte einer Zelle (= das Metabolom) analysieren kann. 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 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 haben. Eine Metabolomics-Analyse ist umfangreich und in der Lage, die Zusammensetzung von Vorläufermolekülen, Zwischenprodukten, Endprodukten und deren Derivate in vielen verschiedenen Stoffwechselwegen aufzuschlüsseln. Je mehr Informationen über den veränderten Stoffwechselweg bekannt sind, desto einfacher und gezielter kann die Zusammensetzung der Metabolite analysiert und ggf. der Nachweis von bestimmten

Stoffwechselprodukten erbracht werden. Wird beispielsweise durch die Genscheren in den Fettsäurestoffwechsel eingegriffen und ein Enzym zur Bildung einer bestimmten Fettsäure ausgeschaltet, dann lässt sich gezielt mit Hilfe von Lipidomics-Verfahren die Zusammensetzung aller zellulären Fette untersuchen. 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 [61; 62]

Vor allem die Genomics- und die Metabolomics-Verfahren sollten für eine Risikobewertung von genomeditierten Pflanzen eingesetzt werden, denn mit ihnen können viele bereits bekannte unbeabsichtigte Veränderungen entdeckt werden.

Stand Juni 2021

Referenzen

1. Biswas S, Tian J, Li R, Chen X, Luo Z, Chen M, Zhao X, Zhang D, Persson S, Yuan Z, Shi J (2020) Investigation of CRISPR/Cas9-induced SD1 rice mutants highlights the importance of molecular characterization in plant molecular breeding. *J Genet Genomics*. doi:10.1016/j.jgg.2020.04.004
2. Michno JM, Viridi K, Stec AO, Liu J, Wang X, Xiong Y, Stupar RM (2020) Integration, abundance, and transmission of mutations and transgenes in a series of CRISPR/Cas9 soybean lines. *BMC Biotechnol* 20 (1):10. doi:10.1186/s12896-020-00604-3
3. Li Z, Liu ZB, Xing A, Moon BP, Koellhoffer JP, Huang L, Ward RT, Clifton E, Falco SC, Cigan AM (2015) Cas9-guide RNA directed genome editing in soybean. *Plant Physiol* 169 (2):960-970. doi:10.1104/pp.15.00783
4. Jupe F, Rivkin AC, Michael TP, Zander M, Motley ST, Sandoval JP, Slotkin RK, Chen H, Castanon R, Nery JR, Ecker JR (2019) The complex architecture and epigenomic impact of plant T-DNA insertions. *PLoS Genet* 15 (1):e1007819. doi:10.1371/journal.pgen.1007819
5. Jupe M, Rivkin, Zander, Motley, Sandoval, Slotkin, Chen, Castagnon, Nery, J. R. Ecker (2018) The complex architecture of plant transgene insertions. *BioRxiv* (Preprint)
6. Gelvin SB (2017) Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu Rev Genet* 51:195-217. doi:10.1146/annurev-genet-120215-035320
7. Liu J, Nannas NJ, Fu F-F, Shi J, Aspinwall B, Parrott WA, Dawe RK (2019) Genome-Scale Sequence Disruption Following Biolistic Transformation in Rice and Maize. *The Plant cell* 31 (2):368-383. doi:10.1105/tpc.18.00613
8. Zhu C, Wu J, He C (2010) Induction of chromosomal inversion by integration of T-DNA in the rice genome. *Journal of Genetics and Genomics* 37 (3):189-196. doi:https://doi.org/10.1016/S1673-8527(09)60037-0
9. Clark KA, Krysan PJ (2010) Chromosomal translocations are a common phenomenon in *Arabidopsis thaliana* T-DNA insertion lines. *Plant J* 64 (6):990-1001. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04386.x
10. Nacry P, Camilleri C, Courtial B, Caboche M, Bouchez D (1998) Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* 149 (2):641-650
11. Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA (2003) Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via microprojectile bombardment. *Plant Mol Biol* 52 (2):421-432. doi:10.1023/a:1023968920830

- 12.Svitashev SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA (2002) Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *Plant J* 32 (4):433-445. doi:10.1046/j.1365-313x.2002.01433.x
- 13.Pawlowski WP, Somers DA (1996) Transgene inheritance in plants genetically engineered by microprojectile bombardment. *Mol Biotechnol* 6 (1):17-30. doi:10.1007/bf02762320
- 14.Carlson DF, Lancto CA, Zang B, Kim ES, Walton M, Oldeschulte D, Seabury C, Sonstegard TS, Fahrenkrug SC (2016) Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *Nat Biotechnol* 34 (5):479-481. doi:10.1038/nbt.3560
- 15.Norris AL, Lee SS, Greenlees KJ, Tadesse DA, Miller MF, Lombardi HA (2020) Template plasmid integration in germline genome-edited cattle. *Nat Biotechnol* 38 (2):163-164. doi:10.1038/s41587-019-0394-6
- 16.Cho SW, Kim S, Kim Y, Kweon J, Kim HS, Bae S, Kim JS (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res* 24 (1):132-141. doi:10.1101/gr.162339.113
- 17.Fu Y, Foden JA, Khayter C, Maeder ML, Reyon D, Joung JK, Sander JD (2013) High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nat Biotechnol* 31 (9):822-826. doi:10.1038/nbt.2623
- 18.Modrzejewski D, Hartung F, Lehnert H, Sprink T, Kohl C, Keilwagen J, Wilhelm R (2020) Which Factors Affect the Occurrence of Off-Target Effects Caused by the Use of CRISPR/Cas: A Systematic Review in Plants. *Frontiers in Plant Science* 11 (1838). doi:10.3389/fpls.2020.574959
- 19.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. *Environ Evid* 8 (27). doi:10.1186/s13750-019-0171-5
- 20.Lee K, Zhang Y, Kleinstiver BP, Guo JA, Aryee MJ, Miller J, Malzahn A, Zarecor S, Lawrence-Dill CJ, Joung JK, Qi Y, Wang K (2019) Activities and specificities of CRISPR/Cas9 and Cas12a nucleases for targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol J* 17 (2):362-372. doi:10.1111/pbi.12982
- 21.Li J, Manghwar H, Sun L, Wang P, Wang G, Sheng H, Zhang J, Liu H, Qin L, Rui H, Li B, Lindsey K, Daniell H, Jin S, Zhang X (2019) Whole genome sequencing reveals rare off-target mutations and considerable inherent genetic or/and somaclonal variations in CRISPR/Cas9-edited cotton plants. *Plant Biotechnol J* 17 (5):858-868. doi:10.1111/pbi.13020
- 22.Tang X, Liu G, Zhou J, Ren Q, You Q, Tian L, Xin X, Zhong Z, Liu B, Zheng X, Zhang D, Malzahn A, Gong Z, Qi Y, Zhang T, Zhang Y (2018) A large-scale whole-genome sequencing analysis reveals highly specific genome editing by both Cas9 and Cpf1 (Cas12a) nucleases in rice. *Genome Biol* 19 (1):84. doi:10.1186/s13059-018-1458-5
- 23.Adikusuma F, Piltz S, Corbett MA, Turvey M, McColl SR, Helbig KJ, Beard MR, Hughes J, Pomerantz RT, Thomas PQ (2018) Large deletions induced by Cas9 cleavage. *Nature* 560 (7717):E8-E9. doi:10.1038/s41586-018-0380-z
- 24.Kosicki M, Tomberg K, Bradley A (2018) Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. *Nat Biotechnol* 36 (8):765-771. doi:10.1038/nbt.4192
- 25.Weisheit I, Kroeger JA, Malik R, Klimmt J, Crusius D, Dannert A, Dichgans M, Paquet D (2020) Detection of Deleterious On-Target Effects after HDR-Mediated CRISPR Editing. *Cell Rep* 31 (8):107689. doi:10.1016/j.celrep.2020.107689
- 26.Weisheit I, Kroeger JA, Malik R, Wefers B, Lichtner P, Wurst W, Dichgans M, Paquet D (2021) Simple and reliable detection of CRISPR-induced on-target effects by qPCR and SNP genotyping. *Nature Protocols*. doi:10.1038/s41596-020-00481-2
- 27.Biswas S, Tian J, Li R, Chen X, Luo Z, Chen M, Zhao X, Zhang D, Persson S, Yuan Z, Shi J (2020) Investigation of CRISPR/Cas9-induced SD1 rice mutants highlights the importance of molecular characterization in plant molecular breeding. *Journal of Genetics and Genomics* 47 (5):273-280. doi:https://doi.org/10.1016/j.jgg.2020.04.004
- 28.Giraldo PA, Shinozuka H, Spangenberg GC, Smith KF, Cogan NOI (2021) Rapid and Detailed Characterization of Transgene Insertion Sites in Genetically Modified Plants via Nanopore Sequencing. *Frontiers in Plant Science* 11 (2292). doi:10.3389/fpls.2020.602313
- 29.Höijer I, Johansson J, Gudmundsson S, Chin C-S, Bunikis I, Häggqvist S, Emmanouilidou A, Wilbe M, den Hoed M, Bondeson M-L, Feuk L, Gyllensten U, Ameer A (2020) Amplification-free long-read sequencing reveals unforeseen CRISPR-Cas9 off-target activity. *Genome Biology* 21 (1):290. doi:10.1186/s13059-020-02206-w

- 30.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. doi:10.1007/s00299-018-2355-9
- 31.Huang TK, Puchta H (2021) Novel CRISPR/Cas applications in plants: from prime editing to chromosome engineering. *Transgenic Res.* doi:10.1007/s11248-021-00238-x
- 32.Beying N, Schmidt C, Pacher M, Houben A, Puchta H (2020) CRISPR-Cas9-mediated induction of heritable chromosomal translocations in Arabidopsis. *Nat Plants.* doi:10.1038/s41477-020-0663-x
- 33.Schmidt C, Franz P, Rönspies M, Dreissig S, Fuchs J, Heckmann S, Houben A, Puchta H (2020) Changing local recombination patterns in Arabidopsis by CRISPR/Cas mediated chromosome engineering. *Nature Communications* 11 (1):4418. doi:10.1038/s41467-020-18277-z
- 34.Kosicki M, Allen F, Bradley A (2020) Cas9-induced large deletions and small indels are controlled in a convergent fashion. *bioRxiv:2020.2008.2005.216739.* doi:10.1101/2020.08.05.216739
- 35.Liu M, Zhang W, Xin C, Yin J, Shang Y, Ai C, Li J, Meng F-l, Hu J (2021) Global detection of DNA repair outcomes induced by CRISPR-Cas9. *bioRxiv:2021.2002.2015.431335.* doi:10.1101/2021.02.15.431335
- 36.Owens DDG, Caulder A, Frontera V, Harman JR, Allan AJ, Bucakci A, Greder L, Codner GF, Hublitz P, McHugh PJ, Teboul L, de Bruijn MFTR (2019) Microhomologies are prevalent at Cas9-induced larger deletions. *Nucleic Acids Research* 47 (14):7402-7417. doi:10.1093/nar/gkz459
- 37.Zuccaro MV, Xu J, Mitchell C, Marin D, Zimmerman R, Rana B, Weinstein E, King RT, Palmerola KL, Smith ME, Tsang SH, Goland R, Jasin M, Lobo R, Treff N, Egli D (2020) Allele-Specific Chromosome Removal after Cas9 Cleavage in Human Embryos. *Cell.* doi:https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.10.025
- 38.Leibowitz ML, Papatthanasiou S, Doerfler PA, Blaine LJ, Sun L, Yao Y, Zhang C-Z, Weiss MJ, Pellman D (2021) Chromothripsis as an on-target consequence of CRISPR-Cas9 genome editing. *Nature Genetics.* doi:10.1038/s41588-021-00838-7
- 39.Skryabin BV, Kummerfeld DM, Gubar L, Seeger B, Kaiser H, Stegemann A, Roth J, Meuth SG, Pavenstadt H, Sherwood J, Pap T, Wedlich-Soldner R, Sunderkotter C, Schwartz YB, Brosius J, Rozhdestvensky TS (2020) Pervasive head-to-tail insertions of DNA templates mask desired CRISPR-Cas9-mediated genome editing events. *Sci Adv* 6 (7):eaax2941. doi:10.1126/sciadv.aax2941
- 40.Ono R, Yasuhiko Y, Aisaki KI, Kitajima S, Kanno J, Hirabayashi Y (2019) Exosome-mediated horizontal gene transfer occurs in double-strand break repair during genome editing. *Commun Biol* 2:57. doi:10.1038/s42003-019-0300-2
- 41.Tuladhar R, Yeu Y, Tyler Piazza J, Tan Z, Rene Clemenceau J, Wu X, Barrett Q, Herbert J, Mathews DH, Kim J, Hyun Hwang T, Lum L (2019) CRISPR-Cas9-based mutagenesis frequently provokes on-target mRNA misregulation. *Nat Commun* 10 (1):4056. doi:10.1038/s41467-019-12028-5
- 42.Kapahnke M, Banning A, Tikkanen R (2016) Random splicing of several exons caused by a single base change in the target exon of CRISPR/Cas9 mediated gene knockout. *Cells* 5 (4). doi:10.3390/cells5040045
- 43.Lalonde S, Stone OA, Lessard S, Lavertu A, Desjardins J, Beaudoin M, Rivas M, Stainier DYR, Lettre G (2017) Frameshift indels introduced by genome editing can lead to in-frame exon skipping. *PLoS One* 12 (6):e0178700. doi:10.1371/journal.pone.0178700
- 44.Mou H, Smith JL, Peng L, Yin H, Moore J, Zhang XO, Song CQ, Sheel A, Wu Q, Ozata DM, Li Y, Anderson DG, Emerson CP, Sontheimer EJ, Moore MJ, Weng Z, Xue W (2017) CRISPR/Cas9-mediated genome editing induces exon skipping by alternative splicing or exon deletion. *Genome Biol* 18 (1):108. doi:10.1186/s13059-017-1237-8
- 45.Sanchez-Leon S, Gil-Humanes J, Ozuna CV, Gimenez MJ, Sousa C, Voytas DF, Barro F (2018) Low-gluten, nontransgenic wheat engineered with CRISPR/Cas9. *Plant Biotechnol J* 16 (4):902-910. doi:10.1111/pbi.12837
- 46.Farris MH, Texter PA, Mora AA, Wiles MV, Mac Garrigle EF, Klaus SA, Rosfjord K (2020) Detection of CRISPR-mediated genome modifications through altered methylation patterns of CpG islands. *BMC Genomics* 21 (1):856. doi:10.1186/s12864-020-07233-2
- 47.Lee JH, Mazarei M, Pfothenhauer AC, Dorrough AB, Poindexter MR, Hewezi T, Lenaghan SC, Graham DE, Stewart CN (2020) Epigenetic Footprints of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Plants. *Frontiers in Plant Science* 10 (1720). doi:10.3389/fpls.2019.01720
- 48.Hilton IB, D'Ippolito AM, Vockley CM, Thakore PI, Crawford GE, Reddy TE, Gersbach CA (2015) Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33 (5):510-517. doi:10.1038/nbt.3199
- 49.Huang YH, Su J, Lei Y, Brunetti L, Gundry MC, Zhang X, Jeong M, Li W, Goodell MA (2017) DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A. *Genome Biol* 18 (1):176. doi:10.1186/s13059-017-1306-z

50. Fal K, Tomkova D, Vachon G, Chabouté ME, Berr A, Carles CC (2021) Chromatin Manipulation and Editing: Challenges, New Technologies and Their Use in Plants. *Int J Mol Sci* 22 (2). doi:10.3390/ijms22020512
51. Galonska C, Charlton J, Mattei AL, Donaghey J, Clement K, Gu H, Mohammad AW, Stamenova EK, Cacchiarelli D, Klages S, Timmermann B, Cantz T, Scholer HR, Gnirke A, Ziller MJ, Meissner A (2018) Genome-wide tracking of dCas9-methyltransferase footprints. *Nat Commun* 9 (1):597. doi:10.1038/s41467-017-02708-5
52. Liu XS, Wu H, Ji X, Stelzer Y, Wu X, Czauderna S, Shu J, Dadon D, Young RA, Jaenisch R (2016) Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome. *Cell* 167 (1):233-247.e217. doi:10.1016/j.cell.2016.08.056
53. Stepper P, Kungulovski G, Jurkowska RZ, Chandra T, Krueger F, Reinhardt R, Reik W, Jeltsch A, Jurkowski TP (2017) Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9-Dnmt3a-Dnmt3L methyltransferase. *Nucleic acids research* 45 (4):1703-1713. doi:10.1093/nar/gkw1112
54. Pflueger C, Tan D, Swain T, Nguyen T, Pflueger J, Nefzger C, Polo JM, Ford E, Lister R (2018) A modular dCas9-SunTag DNMT3A epigenome editing system overcomes pervasive off-target activity of direct fusion dCas9-DNMT3A constructs. *Genome Res* 28 (8):1193-1206. doi:10.1101/gr.233049.117
55. Jin S, Zong Y, Gao Q, Zhu Z, Wang Y, Qin P, Liang C, Wang D, Qiu JL, Zhang F, Gao C (2019) Cytosine, but not adenine, base editors induce genome-wide off-target mutations in rice. *Science* 364 (6437):292-295. doi:10.1126/science.aaw7166
56. Grünewald J, Zhou R, Iyer S, Lareau CA, Garcia SP, Aryee MJ, Joung JK (2019) CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities. *Nat Biotechnol* 37 (9):1041-1048. doi:10.1038/s41587-019-0236-6
57. Kim DY, Moon SB, Ko J-H, Kim Y-S, Kim D (2020) Unbiased investigation of specificities of prime editing systems in human cells. *Nucleic Acids Research* 48 (18):10576-10589. doi:10.1093/nar/gkaa764
58. Jin S, Lin Q, Luo Y, Zhu Z, Liu G, Li Y, Chen K, Qiu J-L, Gao C (2021) Genome-wide specificity of prime editors in plants. *Nature Biotechnology*. doi:10.1038/s41587-021-00891-x
59. Kim D, Bae S, Park J, Kim E, Kim S, Yu HR, Hwang J, Kim J-I, Kim J-S (2015) Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. *Nature Methods* 12 (3):237-243. doi:10.1038/nmeth.3284
60. Xu W, Fu W, Zhu P, Li Z, Wang C, Wang C, Zhang Y, Zhu S (2019) Comprehensive Analysis of CRISPR/Cas9-Mediated Mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* by Genome-wide Sequencing. *Int J Mol Sci* 20 (17). doi:10.3390/ijms20174125
61. 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
62. 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