So entsteht eine Gentechpflanze

Vorbereitende Schritte

1./ Aus der Pflanze, die verändert werden soll, **wird DNA gewonnen.**

2./ Die genaue Abfolge der Bausteine ihrer DNA (DNA-Sequenz) wird eruiert. Das zu verändernde Gen wird ausgesucht.

3./ Das dazu passende Leitmolekül (gRNA) – das Erkennungskomponent der Genschere – wird am Computer entworfen.

MÖGLICHE NEBENEFFEKTE

Bei diesem Schritt kann man bereits versuchen, die Häufigkeit der ungewollten Fehler durch gute Planung zu verringern. Die Qualität der Ausführung dieser Aufgabe hängt jedoch von vielen Faktoren ab: u.a. vom verwendeten Computerprogramm, von den Programm-Einstellungen und von der Erfahrung des damit arbeitenden Forschenden.

Die gRNA wird anschliessend **im Labor** durch Biotechnologieunternehmen aus ihren Bausteinen **synthetisiert.**

4./Zell- oder Gewebekulturen werden hergestellt.
Die Genschere wird in auf einem Nährmedium wachsenden Kulturen eingebracht. Um diese herzustellen, werden den Pflanzen Organteile oder Gewebestücke (Kallus) entnommen und auf einem Nährmedium kultiviert. In einigen Fällen kann die Genschere nur dann in die Pflanze eingeschleust werden, wenn die undurchlässige Zellwand der Zellen entfernt werden. Die so entstehenden wandlosen Pflanzenzellen (Protoplasten) werden ebenfalls in Nährmedien kultiviert. Dieser Schritt der Protoplastenherstellung und Kultivierung ist jedoch bisher nur für gewisse Nutzpflanzenarten erarbeitet worden.

MÖGLICHE NEBENEFFEKTE

Diese Techniken können «Spuren» auf der Ebene der epigenetischen Regulierung hinterlassen und somit auch als ein Hinweis auf eine gentechnische Veränderung dienen, der beim Nachweisprozess in Zweifelsfällen gebraucht werden kann.

☛ *Diese Techniken wurden bereits bei der alten Gentechnik verwendet.*

Einführen der Genschere in die Pflanzenzelle

5./Die Genschere – bestehend aus der Erkennungskomponente (gRNA) und dem Schneideenzym – **wird in die Pflanzenzelle eingeführt.**

Die Genschere kann in verschiedenen Formen in die Zelle eingebracht werden:

Am häufigsten wird der CRISPR/Cas-Komplex a.) **als DNA** in die Zelle eingebracht. Die Genschere kann aber auch b.) **als fertiger**, im Labor hergestellter **Enzymkomplex**, **als** c.) **mRNA** oder d.) **als Leit-RNA** in die Zelle eingebracht werden.

Für den Prozess des Einbringens gibt es ebenfalls verschiedene Möglichkeiten:

a) Wird die Genschere als DNA eingebracht,
- kommt oft ein Transportmittel (**Vektor**) zum Einsatz. Dazu wird die nötige Information in eine ringförmiges Bakterien-DNA (**Plasmid**) eingebracht. Das Plasmid gelangt mittels ***Agrobacterium tumefaciens*** – einem Bodenbakterium, welches von Natur aus die Fähigkeit besitzt, Teile seines Erbmaterials auf Pflanzenzellen zu übertragen – in die Zelle und integriert sich in deren Erbgut und überträgt so die in ihm enthaltene DNA ins pflanzliche Erbgut. Aus den darin enthaltenen Informationen wird anschliessend die Genschere in der Zelle gebildet. Da man einen Indikator benötigt, um Zellen zu identifizieren, die die Genschere aufgenommen haben, wird mit dem Plasmid oft auch ein Markergen, meistens ein Antibiotika-Resistenzgen, eingeführt.
- Alternativ kann die DNA mittels **Partikelbeschuss** in die Zelle eingeschleust werden. Dazu werden winzige Metallpartikel (Wolfram, Gold) mit der für die Genschere kodierenden DNA beschichtet. Diese Partikeln werden mit hohem Druck in die Pflanzenzelle hineingeschossen und können so in den Zellkern gelangen und sich ins Erbgut integrieren.
- Schlussendlich kann die DNA auch mittels **Chemikalien (Polyethylenglykol, PEG)** in die Pflanzenzelle gebracht werden. PEG begünstigt die Verschmelzung von Spender- und Zielprotoplasten, beziehungsweise ihrer Zellkerne.

=>Die Anwendung der beiden letzten Verfahren ist nur beschränkt möglich, denn für beide braucht es Protoplasten. Dessen Herstellung ist jedoch nicht einfach und nicht für alle Nutzpflanzen erprobt.

MÖGLICHE NEBENEFFEKTE

Wird die Genschere als DNA in die Zelle eingebracht, integriert sich diese ins Genom: Es entsteht eine transgene Pflanze (!), welche diese Anleitung an Nachfolgezellen weitergeben kann. Die für die Genschere kodierende DNA (sowie das eingebrachte Markergen) muss deshalb später durch Auskreuzung wieder entfernt werden (10). Trotzdem kann es sein, dass sie übersehen wird und im Pflanzengenom bleibt.

Bei allen Methoden des Einbringens in Form von DNA kann sich die Anleitung für die Genschere auch mehrfach, nur bruchstückhaft oder an der falschen Stelle integrieren. Auch weitere Teile des Plasmids können sich versehentlich in das Erbgut der Pflanzen integrieren. Zudem beeinflussen diese Eingriffe die Zusammensetzung der epigenetischen Marker (kleinen Molekülen, die als Anhängsel an der DNA sitzen und die Genaktivität regulieren). Solche Veränderungen können auf einen gentechnischen Eingriff hinweisen und als Teil des Nachweisprozesses in Zweifelsfällen gebraucht werden.

Beim Partikelbeschuss kann es auch vorkommen, dass die Anleitung sich in die DNA der für die Photosynthese zuständigen Zellorganellen, der Chloroplasten integriert, die eine eigene DNA besitzen. Auch können DNA-Stücke, die in der Zelle vorhanden sind (bspw. Chloroplasten-DNA) versehentlich an der Beschussstelle im Erbgut integriert werden.

☛ *Diese Techniken wurden bereits bei der alten Gentechnik verwendet.*

b) Wird die Genschere als fertiger, bereits im Labor synthetisierter **Enzymkomplex** eingebracht, können dazu

- Nanopartikel,
- Partikelbeschuss und
- PEG verwendet werden.

=>Auch hierzu braucht es Protoplasten. Der Komplex wird im Zellplasma aktiv und wird nach einiger Zeit abgebaut. Es entsteht keine transgene Pflanze.

c) Wird die Genschere als **Leit-RNA** eingebracht, erlaubt dies zwar eine Manipulation an einer ganzen Pflanze, wird aber kaum angewendet. Denn die Voraussetzung für die Anwendung ist, dass die Pflanze zuvor gentechnisch so vorbereitet wird, dass sie die genetische Bauanleitung für den zweiten Bauteil der Genschere, für das Schneideenzym, bereits in sich trägt. Für das Einbringen der Leit-RNA werden Pflanzenviren als Vektoren benutzt.

MÖGLICHE NEBENEFFEKTE

Auch hier wird mit einer Pflanze gearbeitet, die die Anleitung für das Schneideenzym der Genschere in ihrem Erbgut trägt (transgene Pflanze).

Die Genschere verursacht einen Doppelstrangbruch an der gewünschten Stelle. Dort kann die geplante gentechnische Veränderung durchgeführt werden.

MÖGLICHE NEBENEFFEKTE

Für die verschiedenen Abläufe der gentechnischen Veränderung («Schnitt») und die dabei vorkommenden Fehlermöglichkeiten siehe: https://www.youtube.com/watch?v=_u1Eaoek-7w
sowie
https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/Hintergrundpapier_CRISPRCas_Erklaerung_der_Technik.pdf (Punkt 4)
und
https://fachstelle-gentechnik-umwelt.de/wp-content/uploads/FGU_CRISPR_Risiken2.pdf

Selektion und Regeneration

6./ Pflanzen, die das Markergen und somit wahrscheinlich auch die gentechnische Veränderung tragen, werden selektiert. Dazu fügt man Antibiotika zum Nährmedium hinzu. Nur die Zellen, die das Resistenzgen enthalten, überleben.

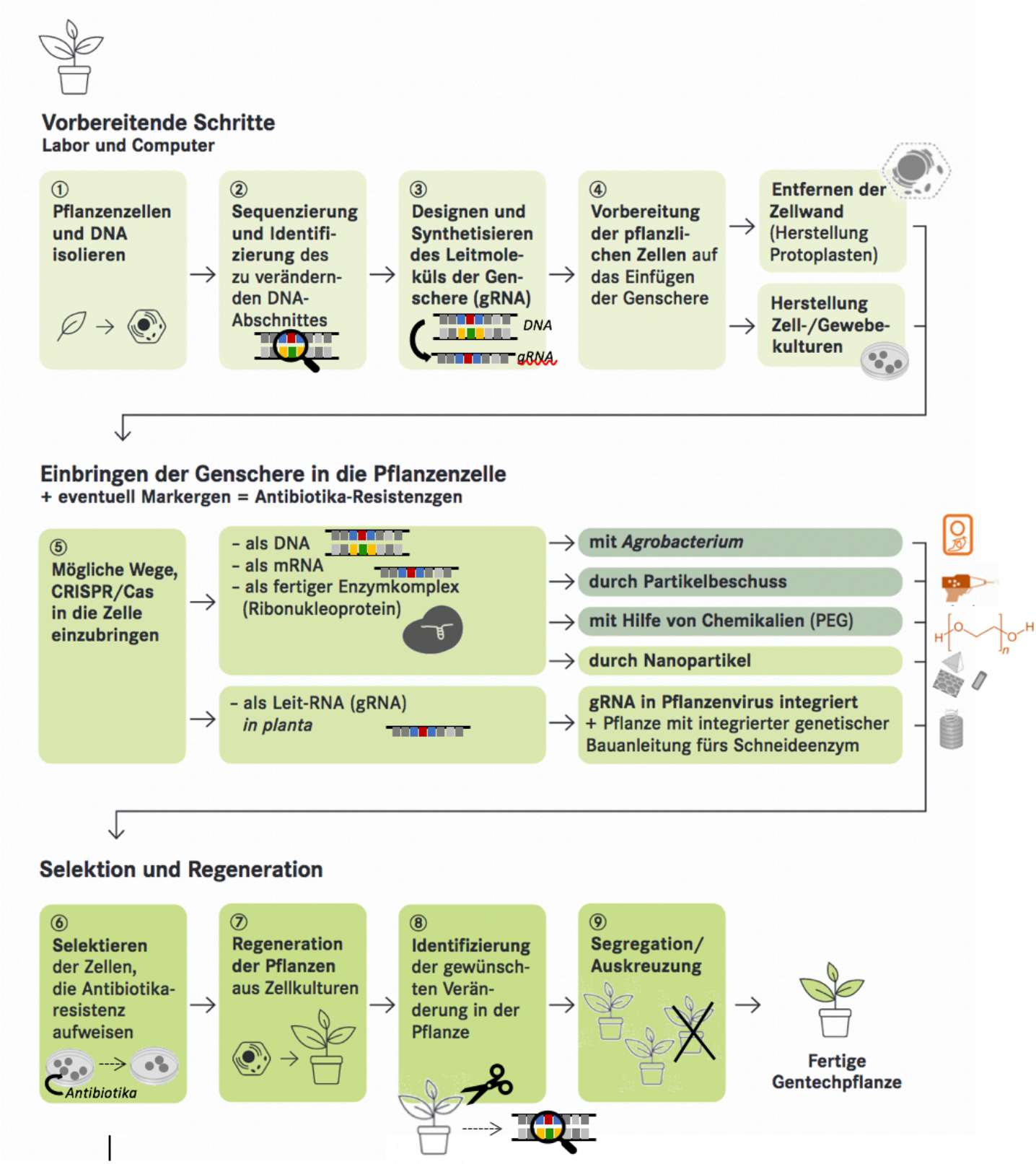
7./ Aus den Zell- oder Gewebekulturen wird durch Zugabe pflanzlicher Hormone zum Nährmedium **eine ganze Pflanze regeneriert.** Dazu wird die Fähigkeit pflanzlicher Zellen, verloren gegangene Pflanzenteile zu ersetzen, benutzt. Durch die Zugabe pflanzlicher Hormone (z.B. Auxin, Cytokinine) kann dieser Prozess angeregt werden. Doch dieser Schritt funktioniert bei vielen Pflanzen noch nicht zufriedenstellend.

8./ Um die Pflanzen auszusuchen, die die gewünschte gentechnische Veränderung tatsächlich tragen, wird **aus den neuen Pflanzen DNA gewonnen und** mittels PCR-Verfahren **sequenziert** – d.h. die Abfolge der DNA-Bausteine wird ermittelt – und die so erhaltene Sequenz mit der Sequenz der geplanten Veränderung verglichen. Die Pflanzen mit der gewünschten Veränderung werden ausgewählt. Dieser Schritt ist notwendig, da bei den vorherigen Schritten (in den meisten Fällen) mit Zellen/Zellhaufen und nicht mit einer ganzen Pflanze gearbeitet wurde. Nicht in jede dieser Zellen konnte die Genschere eingefügt werden und nicht in jeder Zelle wurde die Zielsequenz wie geplant verändert.

9./ Wurde zu Beginn ein **Markergen** (4) und/oder die Bauanleitung für die Genschere ins Genom der Pflanze integriert, **wird** dieses **durch Auskreuzung** in mehreren Schritten **aus der regenerierten Pflanze entfernt** (Segregation).

MÖGLICHE NEBENEFFEKTE

Trotz sorgfältigen Screenings und Auskreuzung kann es sein, dass das Markergen (z.B. Antibiotikaresistenzgene) oder andere Teile des Genoms des Bakterienvektors (falls eines verwendet wurde) im Erbgut der Pflanze bestehen bleiben. Die Wahrscheinlichkeit, dass etwas übersehen wird, erhöht sich, wenn sich das unerwünschte genetische Material nicht nur an der Zielstelle, sondern auch an anderen, weiter entfernten Stellen des Genoms integriert hat.


Vorbereitende Schritte
Labor und Computer
① Pflanzenzellen und DNA isolieren
② Sequenzierung und Identifizierung des zu verändernden DNA-Abschnittes
③ Designen und Synthetisieren des Leitmoleküls der Genschere (gRNA)
DNA
gRNA
④ Vorbereitung der pflanzlichen Zellen auf das Einfügen der Genschere
Entfernen der Zellwand (Herstellung Protoplasten)
Herstellung Zell-/Gewebekulturen
Einbringen der Genschere in die Pflanzenzelle
+ eventuell Markergen = Antibiotika-Resistenzgen
⑤ Mögliche Wege, CRISPR/Cas in die Zelle einzubringen
- als DNA
- als mRNA
- als fertiger Enzymkomplex (Ribonukleoprotein)
- als Leit-RNA (gRNA) in planta
mit Agrobacterium
durch Partikelbeschuss
mit Hilfe von Chemikalien (PEG)
durch Nanopartikel
gRNA in Pflanzenvirus integriert
+ Pflanze mit integrierter genetischer Bauanleitung fürs Schneideenzym
Selektion und Regeneration
⑥ Selektieren der Zellen, die Antibiotikaresistenz aufweisen
Antibiotika
⑦ Regeneration der Pflanzen aus Zellkulturen
⑧ Identifizierung der gewünschten Veränderung in der Pflanze
⑨ Segregation/ Auskreuzung
Fertige Gentechpflanze