

So entsteht eine Gentechpflanze



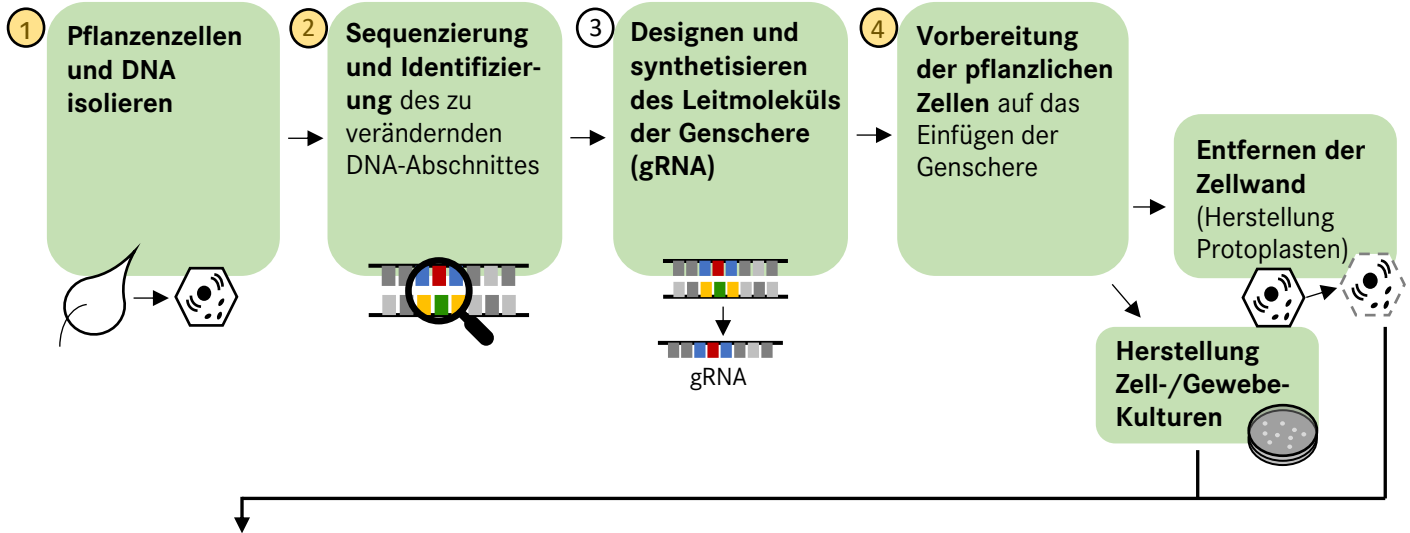
Factsheet

Schweizer Allianz Gentechnikfrei

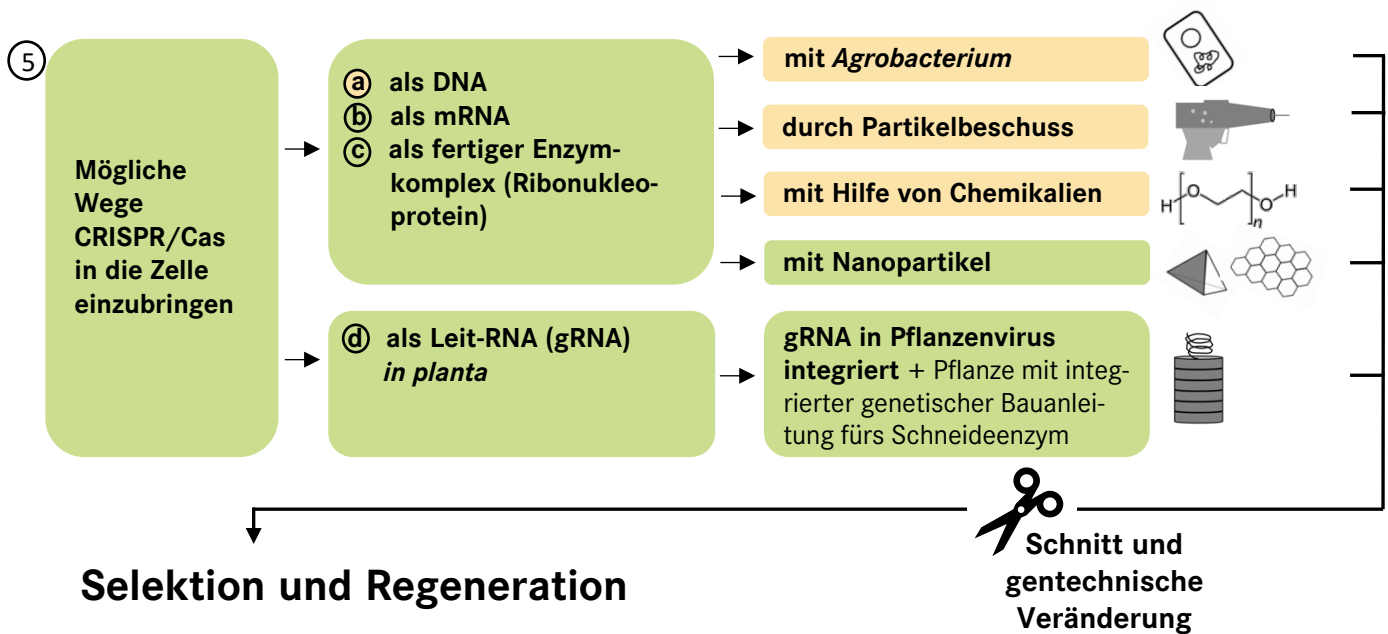
Dezember 2022



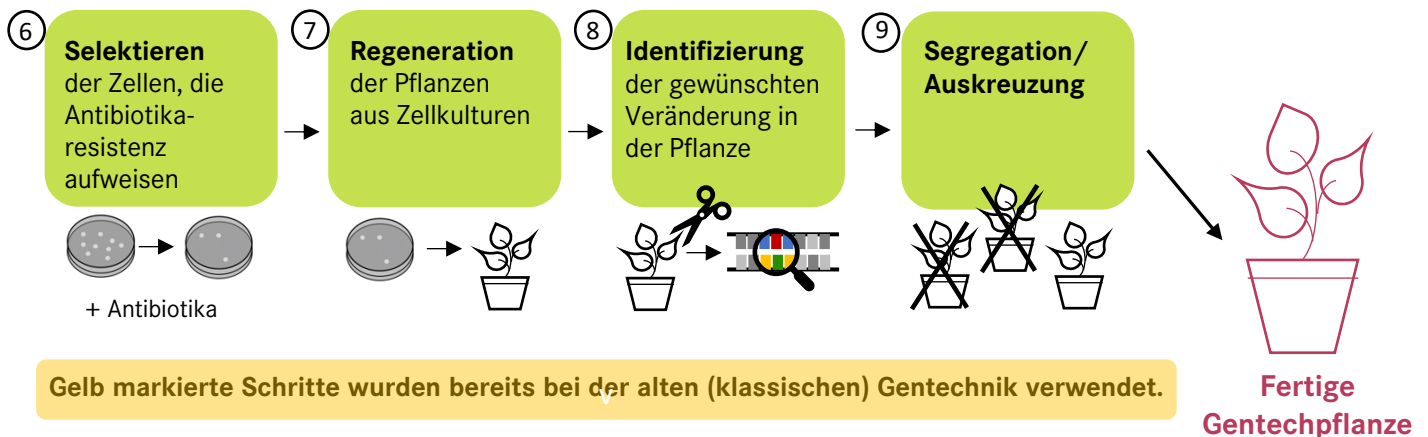
Vorbereitende Schritte Labor und Computer



Einbringen der Genschere in die Pflanzenzelle + eventuell Markergen = Antibiotika-Resistenzgen



Selektion und Regeneration



Vorbereitende Schritte

Gelb markierte Schritte wurden bereits bei der alten (klassischen) Gentechnik verwendet.

- ① Aus der Pflanze, die verändert werden soll, wird DNA gewonnen.
- ② Die DNA-Sequenz wird eruiert – d.h. die genaue Abfolge der Bausteine der DNA. Das zu verändernde Gen wird ausgesucht.
- ③ Das dazu passende Leitmolekül (**gRNA**) – die Erkennungskomponente der Genschere – wird am Computer entworfen. Die gRNA wird anschliessend im Labor durch Biotechnologieunternehmen aus ihren Bausteinen synthetisiert.

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.

- ④ **Zell- oder Gewebekulturen werden hergestellt.**
Die Genschere wird in Zell- oder Gewebekulturen 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 wird. 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.

Einführen der Genschere in die Pflanzenzelle

- ⑤ Die Genschere (CRISPR/Cas-Komplex) wird in die Pflanzenzelle eingeführt. Sie besteht aus der Erkennungskomponente (gRNA) und dem Schneideenzym.

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

- a. als DNA – dies ist das häufigste Vorgehen.
- b. als fertiger Enzymkomplex (im Labor hergestellt)
- c. als mRNA (messenger oder Boten-RNA: einzelsträngige Ribonukleinsäure, enthält den genetischen Bauplan für ein spezifisches Protein)
- d. als Leit-RNA

Für den Prozess des Einbringens gibt es ebenfalls verschiedene Möglichkeiten:

- Wird die Genschere als DNA eingebracht (a.), kommen folgende Methoden zum Einsatz:
 - **Vektor (Transportmittel):**

Die zur Bildung der Genschere nötige Information wird in eine ringförmige Bakterien-DNA (**Plasmid**) eingebracht. Das Plasmid gelangt mittels **Agrobacterium tumefaciens** in die Zelle. *A. tumefaciens* ist ein Bodenbakterium, welches von Natur aus die Fähigkeit besitzt, Teile seines Erbmateri als auf Pflanzenzellen zu übertragen.

In der Zelle integriert sich das Plasmid 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 **Marker gen**, meistens ein **Antibiotika-Resistenz gen**, eingeführt.
 - **Partikelbeschuss:**

Winzige Metallpartikel (Wolfram, Gold) werden mit der für die Genschere kodierenden DNA beschichtet. Diese Partikel werden mit hohem Druck in die Pflanzenzelle hineingeschossen und können so in den Zellkern gelangen und sich ins Erbgut integrieren.
 - **Chemikalien (Polyethylenglykol, PEG):**

PEG begünstigt die Verschmelzung von Spender- und Zielprotoplasten, bzw. 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

Bei allen Methoden des Einbringens in Form von DNA:

- **Anleitung für Genschere wird nicht entfernt.** 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 Marker gen) muss deshalb später durch Auskreuzung wieder entfernt werden (10). Trotzdem kann es sein, dass sie übersehen wird und im Pflanzengenom bleibt.
- **Anleitung für die Genschere integriert sich fehlerhaft:** Mehrfach, bruchstückhaft oder an der falschen Stelle. 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:

- **Anleitung für Genschere integriert sich in die DNA der Zellorganellen:** etwa in die DNA der für die Photosynthese zuständigen Chloroplasten, 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.

- Wird die Genschere als fertiger, bereits im Labor synthetisierter **Enzymkomplex** (b.) 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.

- Wird die Genschere als **Leit-RNA** (c.) 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, welche die Anleitung für das Schneideenzym der Genschere in ihrem Erbgut trägt (transgene Pflanze).

Schnitt und gentechnische Veränderung



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 eine ganze Pflanze regeneriert.** Der Prozess basiert auf die Fähigkeit pflanzlicher Zellen, verloren gegangene Pflanzenteile zu ersetzen. Durch die Zugabe pflanzlicher Hormone (z.B. Auxin, Cytokinine) zum Nährmedium kann dieser Prozess angeregt werden. Doch dieser Schritt funktioniert bei vielen Pflanzen noch nicht zufriedenstellend.
- ⑧ **Identifizierung der Pflanzen, welche die gewünschte gentechnische Veränderung tragen.** Dazu 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 **Markergen wird durch Auskreuzung entfernt.** Wurde zu Beginn ein Markergen ⑤ 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.