

Gentechnik bei Pflanzen und die „Neuen Züchtungstechniken“ (NZT)

Inhärente Risiken und Regulierungsbedarf

Dr. Ricarda A. Steinbrecher*

Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

In den vergangenen 5 bis 10 Jahren gab es eine rasante Entwicklung bei den gentechnischen Verfahren (genetische Modifikation). Damit einhergehend gibt es zunehmend die Möglichkeit, tiefgreifende und komplexe Veränderungen am Erbgut und an den Stoffwechselprozessen lebender Organismen vorzunehmen. Dies hat zum Entstehen zweier neuer Bereiche der Gentechnik geführt, die sich überschneiden: Die Synthetische Biologie und die so genannten Neuen Züchtungstechniken (NZT).

Im Zusammenhang mit den NZT ist es besorgniserregend, dass es viele Bemühungen gibt, diese in erster Linie so zu konstruieren, dass man die Genehmigungsverfahren für GVO¹ umgehen kann, und gleichzeitig Namen gewählt werden, die es der Öffentlichkeit erschwert zu erkennen, dass gentechnische Verfahren (genetische Modifikation) genutzt wurden. Dies geht mit Bemühungen einher, das Vorsorgeprinzip aufzuweichen, das dazu dient, vor der Einführung neuer Techniken zu schützen, die in Zukunft möglicherweise negative Auswirkungen auf die Gesundheit und / oder die Umwelt haben.

Der Europäischen Kommission liegt derzeit eine Liste von sieben „neuen“ Gentechnik-Verfahren vor und sie wird entscheiden, ob die Produkte dieser Techniken, wenn sie bei Pflanzen angewendet werden, vom EU-Rechtsrahmen für GVO abgedeckt werden oder nicht. Seitens der Industrie wird entweder behauptet, diese seien keine GVO im Sinne der derzeitigen Definition von GVO. Sie würden mit Techniken hergestellt, die von der Regelung ausgeschlossen sind, oder das Endprodukt – selbst wenn zu irgendeinem Zeitpunkt während seiner Entwicklung Gentechnik im Einsatz war – enthalte kein GV-Material mehr und sei deshalb kein GVO. Derzeit arbeiten die EU-Kommission an der rechtlichen Interpretation, wie auch viele Anwälte im Auftrag der Industrie und auf Seiten der Zivilgesellschaft. Es ist wichtig, sich darüber bewusst zu sein – sowohl hinsichtlich der rechtlichen Auslegung als auch in Bezug auf die Risiken – dass einige dieser Techniken möglicherweise auch in Kombination miteinander oder ein und dieselbe Technik mehrmals hintereinander angewendet werden könnten, um den angestrebten Effekt zu erzielen.

Dieses Papier betrachtet diese sieben Techniken weniger aus der rechtlichen als vielmehr aus der wissenschaftlichen Perspektive und zielt darauf ab, die Techniken und die damit einhergehenden Risiken besser zu verstehen. Bei der Prüfung der möglichen ungewollten Effekte wurde deutlich, dass all diese Techniken, die vorgeben, äußerst präzise zu sein, auch Nebeneffekte haben und unvorhersehbare Konsequenzen hervorrufen können. In der Tat ist „präzise“ eigentlich alles andere als eine präzise Beschreibung und ist nicht mit „vorhersagbar“ gleichzusetzen.

Kurzum, jedes der sieben neuen Gentechnik-Verfahren, die als NZT bezeichnet werden, birgt ganz eigene Risiken und Unsicherheiten. Viele dieser Risiken sind bereits von älteren GV-Methoden bekannt, zudem gibt es auch neue, ernst zu nehmende Bedenken, wie etwa die potentiellen Auswirkungen der RNA-gesteuerten DNA-Methylierung (RdDM) auf Umwelt und Gesundheit. Gleichzeitig erwächst ein neues Ausmaß an Unsicherheit und Risiko unbeabsichtigter Nebeneffekte aus der Anwendung der Gene-Editing-Verfahren (ZFN und ODM, sowie CRISPR und TALENs). Dieses Papier kommt zu dem Schluss, dass es aus wissenschaftlicher Sicht angebracht ist, all diese Verfahren als GV einzustufen und ihre Anwendung mit derselben Sorgfalt zu regulieren, wie bisherige und aktuelle GV-Methoden.

¹ GVO meint gentechnisch veränderter Organismus (Anmerkung der Übersetzung).

* Dieses Papier wurde von der IG-Nachbau und AbL übersetzt und von der Verfasserin an einigen Stellen ergänzt.

Die 7 Techniken, die die EU-Kommission derzeit prüft²:

- | | |
|---|---|
| 1) Zink-Finger-Nuklease-Technologie (ZFN-1/2/3) | 5) Pfropfen (auf GVO-Unterlage) |
| 2) Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (ODM) | 6) Reverse Breeding (RB) |
| 3) Cisgenese/ Intragenese | 7) Agroinfiltration (sowohl Agroinfiltration im engeren Sinne als auch Agroinoculation) |
| 4) RNA-gesteuerte DNA-Methylierung (RdDM) | |

Die Arbeitsgruppe der Kommission hat ursprünglich eine weitere achte Methode in Betracht gezogen: *Synthetische Genomik* (Entwurf, Konstruktion und Verwendung von synthetischen Genen und Nukleinsäuren). Diese wird jedoch allgemein als Teilgebiet der *Synthetischen Biologie* angesehen. Außerdem ist bisher keine Anwendung in Bezug auf Pflanzenzuchtprogramme bekannt, ihre Anwendung wird aber derzeit zum Bsp. in Zusammenhang mit Mikroorganismen erforscht.

1) Zink-Finger-Nukleasen (ZFN) Typen 1, 2 und 3 (Gen und Genom-Editing Verfahren)

Bei ZFN handelt es sich um Gentechnik-Verfahren, deren Zweck es ist, beabsichtigte Veränderungen am Erbgut und an den Eigenschaften eines Organismus auszulösen. Sie werden auch als Gen- oder Genom-Editing-Verfahren bezeichnet. Andere Genom-Editing-Verfahren sind auf dem Vormarsch, jedoch ist ZFN die einzige, die in der EU-Liste erwähnt wird.

Das Ziel ist, in der Lage zu sein, die DNA (bzw. die DNA-Sequenz) an bestimmten Stellen gezielt zu verändern - durch Einfügen, Entfernen oder Austausch bestimmter DNA-Abschnitte. Insofern unterscheiden sich die Ziele nicht von denen anderer Gentechnik-Verfahren. Im Fall der „Editing“-Verfahren können das kleine Veränderungen an 1-10 Nukleotiden³ (ZFN-1 und 2) oder umfangreiche Insertionen (Einfügungen) ganzer Gene, einschließlich von Transgenen (ZFN-3), sein.

Zu diesem Zweck muss das DNA-Molekül erst einmal an einer bestimmten Stelle „durchgeschnitten“ werden. ZFN sind Proteine, die genau zu diesem Zweck hergestellt und verwendet werden. Der „Zink-Finger“ (ZF) als Bestandteil der ZFN kann einen bestimmten kurzen Abschnitt der DNA (9-12 Basen) erkennen und der andere Bestandteil, die Nuklease (N)⁴ schneidet die DNA an dieser Stelle durch. Es bedarf zweier ZFN – sie docken schräg gegenüber voneinander am DNA-Doppelstrang an – um beide Stränge durchzuschneiden. Der Schnitt in der DNA löst einen von zwei möglichen DNA-Reparaturmechanismen der Zelle aus, um die offenen Enden wieder zu verknüpfen und dies hat eine Reihe von möglichen Ergebnissen zur Folge.

3 ZFN-Typen:

- ZFN-1: kleinere, ortsspezifische und zufällige DNA-Veränderungen, diese können kleinere Deletionen (Löschungen), Substitutionen (Ersetzungen) oder Insertionen (Einfügungen) von Nukleotiden sein. In diesem Fall „repariert“ die Zelle den „Schnitt“ mehr oder weniger zufällig, wobei sie einen Reparaturmechanismus anwendet, der als „NHEJ“ (Nicht-homologe Endverknüpfung) bezeichnet wird.
- ZFN-2: kleinere ortsspezifische gezielte DNA-Veränderung, wie etwa „Punktmutationen“ (Veränderung eines einzelnen Nukleotids). Hier erfolgt die Reparatur auf Anweisung eines DNA-Matrizenstrangs, der hinzugefügt wurde (ein DNA-Strang mit derselben Sequenz wie der Zielbereich, jedoch mit ein oder zwei kleineren Veränderungen oder einer kurzen Einfügung). Der hier angewendete Reparaturmechanismus heißt „HR“ (Homologe Rekombination).
- ZFN-3: größere ortsspezifische Insertionen von Genen oder regulierenden Sequenzen. Bei diesem gentechnischen Verfahren wird wie bei ZFN-2 ein DNA-Matrizenstrang hinzugefügt, dieser enthält jedoch eine zusätzliche lange DNA-Sequenz (z. B. ein oder mehrere Gene) zur Integration.

² http://ec.europa.eu/food/plant/gmo/legislation/plant_breeding/index_en.htm.

³ *Nukleotide* sind die Grundbausteine der DNA und der RNA, also der genetischen Grundsubstanzen, die auch als *Nukleinsäuren* bezeichnet werden. In der DNA bestehen die Nukleotide aus A, C, G und T (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin); und in der RNA aus A, C, G und U (Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil). Die Abfolge dieser Bausteine bestimmt darüber, welches Protein erzeugt bzw. welcher Befehl gegeben werden soll.

⁴ Nuklease: Enzym, das die DNA durchschneiden kann.

Das Gen für die speziell zugeschnittene ZFN wird für gewöhnlich durch Gentechnik-Verfahren mit einer standardmäßigen GV-Transformation in die Pflanze eingebracht, und macht diese damit zunächst zu einem GVO. Wenn die ZFN-Proteine produziert wurden und ihre Aufgabe erfüllt haben, werden in einem nächsten Schritt Pflanzenlinien ausgewählt, die das Transgen für die ZFN-Proteine nicht tragen. Alternativ dazu wurden - mit dem erklärten Ziel, die Einstufung als GVO zu umgehen - in Pflanzenviren exprimierte Systeme entwickelt, wobei das ZFN-Gen innerhalb des viralen Expressionssystems verbleiben soll. Damit soll verhindert werden, dass das ZFN-Transgen in die DNA der Pflanze integriert und an zukünftige Generationen weitervererbt wird.

Kommerzielle Anwendungen ZFN-1, 2: Der Verlust, die Veränderung oder die Insertion eines einzelnen Nukleotids (Punktmutation) kann ausreichen, um bestimmte Merkmale einer Pflanze zu verändern, bspw.: Herbizidtoleranz, männliche oder weibliche Sterilität, Blütenfarbe, verzögerte Fruchtreife.

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Ziel-ungenauigkeit: Die ZFN-Technologie ist für ihre unspezifische Anlagerung an Nicht-Ziel-DNA bekannt, was zu einer signifikanten Menge nicht gewollter Mutationen im Genom führt. Diese Mutationen können a), wenn sie in der kodierenden Sequenz vorkommen, die Funktion von Proteinen beeinflussen; oder b), wenn sie in regulierenden Sequenzen vorkommen, die Genexpression beeinflussen, sodass etwa mehr Pflanzengifte produziert oder Proteine nicht mehr erzeugt werden, die wichtig sind für die Nährstoffversorgung, Abwehrkräfte oder Resistenz gegen Krankheiten der Pflanze.
- Möglicherweise werden die zugefügten DNA-Matrizenstränge (ZFN-2 und 3) willkürlich - entweder ganz oder teilweise - in das Genom integriert, wie es auch bei transgenen Insertionen (Einfügungen) geschieht, wodurch Gene und regulierende Sequenzen zerstört oder Proteine potentiell verändert werden. Das kann wiederum zu einer Leistungsminderung, höherer Krankheitsanfälligkeit, Anreicherung von Giften und Rückständen und einem Anstieg von Allergenen führen.
- Transformations- und Transfektionsprozesse⁵, einschließlich Gewebekultur⁶, werden zur Herstellung von mit ZFN gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzt. Solche Prozesse führen bekanntlich zu weiteren Mutationen (mit den oben aufgeführten Risiken)⁷.

Schlussfolgerung: Alle drei ZFN-Techniken sind Gentechnik-Verfahren, deren Zweck es ist, absichtliche Veränderungen am Erbgut und an den Eigenschaften eines Organismus hervorzurufen. Sie sind Labortechniken. Alle drei sind anfällig für ungewollte Effekte, sowohl bedingt durch die ZFN-Aktivität als auch durch die Auswirkungen der Gentechnik-Verfahren, was in der Regel zu hunderten von Mutationen und ungewollten Effekten führt. Abgesehen davon sind die Reparaturmechanismen der Pflanzen nicht abschließend erforscht, was Anlass zu zusätzlichen Unsicherheiten gibt. Aufgrund des Prozesses, der Veränderungen und Risiken sind ZFN als GVO einzustufen und erfordern umfassende Risikobewertungen.

Andere Genom-Editing-Verfahren:

Es gibt eine Reihe weiterer Genom-Editing-Verfahren, bspw. TALENs, Meganukleasen und CRISPR/Cas.⁸ Diese mögen im Detail unterschiedlich sein, beruhen aber alle auf dem Einsatz von Nukleasen, die programmiert sind, um bestimmte DNA Ziel-Sequenzen zu finden und dort den DNA-Strang durchzuschneiden, was einen natürlichen zelleigenen Reparaturmechanismus auslöst, wie oben beschrieben.

⁵ Bei der *Transformation* (Umwandlung, Anm. der Übersetzung) pflanzlicher Zellen handelt es sich um einen Prozess, mit dem externe DNA in die Zelle eingebracht und in die DNA der Pflanze integriert wird. Der Begriff *Transfektion* (Transfektion ist ein Kunstwort aus *Transformation* und *Infektion*, Anm. der Übersetzung) von Pflanzen wird eher benutzt, wenn Viren verwendet werden oder wenn die externe DNA nicht integriert werden soll.

⁶ Bei der *Gewebekultur* wachsen Pflanzenzellen auf einem Nährmedium außerhalb der Pflanze. Durch die Verwendung von Nährstoffen, speziellen Verbindungen, Enzymen und verschiedenen Wachstumshormonen können Zellen 1), das für die Transformation (Insertion der neuen Gensequenz) nötige Stadium erreichen und 2), dann dazu gebracht werden, wieder zu einer kompletten Pflanze heran zu wachsen. Gewebekultur – besonders der Typ, der bei Pflanzen-Transformation verwendet wird – führt bekanntlich zu Mutationen im gesamten Genom.

⁷ Siehe auch Wilson et al. (2006), Referenz in den Hintergrundinformationen am Ende.

⁸ TALENs (transcription activator-like effector nucleases = Transkriptionsaktivator-artige Effektor-Nukleasen), MN (Meganukleasen) und CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeat system = gehäuft auftretende, gleichmäßig verteilte Wiederholungen, die aus beiden Richtungen gelesen werden können) - siehe auch Agapito-Tenfen (2015) als Referenz in den Hintergrundinformationen am Ende.

Diese Genom-Editing-Verfahren sind aus denselben Gründen wie die ZFN-Technik als Verfahren zur Erzeugung von GVO einzustufen. Sprich, es ist deren Zweck, bewusste Veränderungen am Erbgut und an den Eigenschaften eines Organismus hervorzurufen; es handelt sich dabei um Labortechniken, die anfällig für Nebeneffekte sowie für ungewollte Auswirkungen durch die gentechnischen Prozesse sind.

2) Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (ODM)

Das Ziel ist es, kleinere und im Voraus bestimmte Veränderungen an dafür vorgesehenen Stellen in Genen hervorzurufen, um entweder die Funktion des Genproduktes zu ändern oder dessen Produktion zu beenden. Für die ODM wird ein Oligonukleotid⁹, ein kurzes DNA-Stück aus einem einzelnen Strang von Nucleinsäuren, bestehend aus einer kleinen Anzahl von Nucleotiden, synthetisch hergestellt. Es ist so aufgebaut, dass es fast identisch mit der DNA-Sequenz des Zielgens ist, mit Ausnahme von 1-4 Nucleotiden. Das führt zu einer Fehlanpassung der Sequenzen, wenn das Oligonukleotid an das Zielgen anlagert, woraufhin eine ortsspezifische DNA-Veränderung (Mutation) stattfindet, sobald der zelleigene DNA-Reparaturmechanismus ausgelöst wurde. Hierbei wird eher die DNA Sequenz des Oligonukleotids übernommen als die Originalsequenz.

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Ziel- Ungenauigkeit: Das Oligonukleotid kann an andere DNA-Abschnitte anlagern, wenn ausreichende Ähnlichkeit besteht, und dort ungewollte Mutationen hervorrufen. Diese können zu einer Veränderung oder zu einem Verlust der Proteinfunktion führen oder die Genexpression verändern, was zu Problemen führen kann, etwa der Anreicherung von giftigen Pflanzeninhaltsstoffen.
- Das Oligonukleotid kann auch in die DNA der Pflanze integriert werden, ähnlich wie bei transgenen Insertionen, wodurch Gene und regulierende Sequenzen zerstört oder Proteine potentiell verändert werden können.
- Die Anwendung von Gewebekultur und den Methoden der GV-Transformation- oder Transfektion¹⁰ führt bekanntlich zu ungewollten Mutationen im gesamten Genom.
- Bei mittels ODM erzeugten GV-Organismen wurden Mutationen nahe dem Zielbereich beobachtet.
- Je nachdem welche Oligonukleotide verwendet werden, besteht das Risiko, dass diese die zelleigene Regulierung der Genexpression stören, indem sie den RNAi-Prozess¹¹ auslösen, was zum Gen-Silencing (Stilllegung) führen kann. Das kann zu vererbaren Veränderungen führen, die mehrere Generationen überdauern können und die von verschiedenen Faktoren abhängen, die nicht ausreichend erforscht sind. Dies trifft besonders auf Oligonukleotide zu, die RNA-Nucleotide beinhalten.

Fazit: ODM ist ein Gentechnik-Verfahren, das zu den gleichen oder ähnlichen direkten und indirekten negativen Auswirkungen führen kann wie derzeitige GVO, sowohl aufgrund der beabsichtigten Eigenschaften (z. B. Herbizidtoleranz, wie etwa Raps der Firma CIBUS gegenüber Sulfonylharnstoff-Herbiziden)¹², als auch durch die angewandten Prozesse und Methoden und die potentielle Integration der Oligonukleotide. Das Verfahren bedarf deshalb einer umfassenden Risikobewertung.

⁹ *Nucleotide* sind die Grundbausteine der DNA und der RNA, also der genetischen Grundsubstanzen, die auch als Nucleinsäuren bezeichnet werden. In der DNA bestehen die Nucleotide aus A, C, G und T (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin); und in der RNA aus A, C, G und U (Adenin, Cytosin, Guanin, Uracil).

Oligonucleotide sind Abschnitte von Nucleinsäuren, für gewöhnlich 20-200 Nucleotide lang; sie können aus DNA, RNA, aus Nucleotidanaloga oder einer Kombination daraus bestehen. Sie sind normalerweise aus einem einzelnen Strang, aber nicht immer.

¹⁰ Siehe Fußnote 5 & 6.

¹¹ RNAi-Prozess. Die RNA-Interferenz (RNAi) ist ein zellinterner Prozess, bei dem RNA-Moleküle verschiedener Art durch eine Reihe von Schritten die Abschaltung von Genen hervorrufen können.

¹² CIBUS nutzt ODM unter dem Namen „Rapid Trait Development System“ (RTDS™).

3) Cisgenese und Intragenese

Cisgenese und Intragenese unterscheiden sich grundsätzlich nicht von der Transgenese, aber anstatt die DNA-Sequenz von einer vollkommen anderen Spezies zu verwenden oder eine neue synthetische DNA-Sequenz zu erfinden, stammt die einzufügende DNA-Sequenz von der gleichen oder einer nah verwandten Art, mit der die Pflanze, zumindest theoretisch, auch kreuzungskompatibel ist. Bei der „Cisgenese“ wird die einzusetzende DNA entsprechend der exakten Sequenz eines im Spenderorganismus vorkommenden Gens erstellt.¹³ Bei der „Intragenese“ ist die einzusetzende Gensequenz eine Kombination aus Sequenzen und Elementen verschiedener Gene einer oder mehrerer nah verwandter Arten (weitere Details s. Fußnote).¹⁴

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Ob die DNA-Sequenzen von nah verwandten Arten stammen oder nicht ist irrelevant, der Prozess des gentechnischen Verfahrens ist der Gleiche, einschließlich der gleichen Risiken und Unvorhersehbarkeiten, wie bei der Transgenese. Zum Beispiel:
 - Zufällige Integration der neu eingefügten DNA, die in der Lage ist, ein weiteres Gen zu zerstören oder die Regulierung benachbarter Gene zu behindern (Positionseffekte).
 - Mutationen an der Stelle der Insertion und am gesamten Genom aufgrund der Transformationsprozesse, einschließlich der Effekte der Gewebekultur¹⁵. Dies kann Löschungen, Neuordnungen und Vervielfältigung von DNA-Sequenzen einschließen.
 - Potential zum Stilllegen des eingebrachten Gens oder der pflanzeigenen Gene, wenn Promotorsequenzen eine hohe Ähnlichkeit aufweisen (Homologie).
- Bezüglich Cisgenese: Die Tatsache, dass das eingefügte Gen von einer verwandten Art stammt, ist keine Garantie dafür, dass keine ungewollten oder unvorhersehbaren Effekte auftreten, da weder das einzelne Gen noch sein Produkt vorher in diesem genetischen Kontext oder an dieser Stelle vorgekommen sind. Daher kann seine Expression anders sein als in der Pflanze, der es entnommen wurde und/ oder sich auf die allgemeine/ weitere Genregulierung oder Stoffwechselfvorgänge auswirken (z. B. diese stören). Dies wiederum kann die Ursache für verändertes Verhalten und Leistung sein, höhere Anfälligkeit für Krankheiten, gesteigerte Fitness und/ oder Invasivität, geänderte Zusammensetzung von Signalstoffen¹⁶, Nährstoffen, Giftstoffen und Allergenen.
- Bezüglich Intragenese: Die DNA-Sequenzen, die in solch einem Gen angeordnet werden, sind hinsichtlich ihrer Kombination und ihrem regulatorischen Kontext vollkommen neu. Allein das Wissen darüber, um welche DNA-Sequenz es sich handelt oder darüber, dass diese Sequenzen aus verwandten Arten stammen, lässt noch keine Rückschlüsse über ihr Verhalten und ihr Zusammenspiel untereinander zu. Nur eine umfassende Analyse und eine strenge Bewertung der tatsächlichen Effekte und Auswirkungen kann hier Antworten geben.

Fazit: Bezüglich Risiken und potentieller negativer Auswirkungen unterscheiden sich diese Verfahren kaum von der Transgenese, weshalb eine umfassende molekulare Charakterisierung sowie eine vollständige Risikobewertung, einschließlich umfassender Fütterungsversuche von Lebens- und Futtermitteln, notwendig sind.

¹³ Die eingefügte DNA wird nicht direkt aus den Spenderorganismen entnommen, sondern künstlich synthetisiert oder im Mikroorganismus *E. coli* vermehrt.

¹⁴ Z. B. können die Promotor-, Kodier- und Terminal- (End-)Sequenzen von verschiedenen Genen und Arten stammen.

¹⁵ Gewebekultur: siehe Fußnote 6.

¹⁶ *Signalstoffe* übertragen Informationen zwischen Zellen und Geweben von Vielzellern. Sie können aus einfachen Molekülen, aber auch aus komplexen Proteinen bestehen, bspw. Wachstumshormone. Eine weitere Kategorie sind die so genannten Botenstoffe, die Signale zwischen verschiedenen Individuen entweder derselben Art oder verschiedener Arten übertragen.

4) RNA-gesteuerte DNA-Methylierung (RdDM)

Ein Ziel ist es, über mehrere Saatgutgenerationen hinweg ein neues Merkmal zu erzielen ohne dazu DNA-Sequenzen, d. h. die Reihenfolge der Nukleotide, im Organismus verändern zu müssen - in der Hoffnung, dadurch die Einstufung als GVO zu umgehen. Stattdessen kann innerhalb der Zelle ein RdDM-Prozess¹⁷ genutzt werden, um ein bestimmtes Gen auszuschalten, sodass aus diesem Gen kein Genprodukt hervorgeht. Dies kann wiederum dazu führen, dass die gewünschten Merkmale, wie etwa verzögerte Fruchtreife, veränderte Blütenfarbe, erhöhte Gehalte bestimmter Nährstoffe oder männliche Sterilität ausgebildet werden.

RNA-gesteuerte DNA-Methylierung (RdDM) ist ein Prozess, bei dem RNA-Moleküle die Zelle anweisen, Methylgruppen (-CH₃-Gruppen)¹⁸ an bestimmte Nukleotide entlang eines bestimmten DNA-Abschnitts zu binden um ein Gen auszuschalten (weitere Details siehe Fußnote¹⁹).

Die Methylierung der Promotorregion eines Gens stoppt die Expression dieses Gens. Obwohl dieses Gen-Silencing keine permanente Veränderung darstellt, wird es trotzdem über mehrere Generationen vererbt. Bei Pflanzen wird davon ausgegangen, dass es mit der Zeit verschwindet, aber das trifft nicht auf alle Organismen zu, z. B. im Fall des Fadenwurms *Caenorhabditis elegans*. Die Auslöser dieser Umkehrung der Methylierung sind jedoch weder bekannt noch werden sie verstanden.

Wie funktioniert es:

Jede kleine Doppelstrang-RNA-Sequenz, die zu einer vorhandenen DNA-Sequenz passt, löst die Methylierung dieser DNA-Sequenzen aus und schaltet so das damit verbundene Gen aus. Es gibt eine Reihe von Möglichkeiten, bestimmte Doppelstrang-RNA-Sequenzen in eine Zelle einzuschleusen, z. B.:

- (a) indem die Pflanze gentechnisch mit einem Gen ausgestattet wird, das solch eine RNA (mit einer „umgekehrten“/ umgedrehten Sequenz) produziert - mit dem Zweck, ein Gen permanent oder vorübergehend auszuschalten (Gen-Silencing).
- (b) um ein Gen vorübergehend auszuschalten (Gen-Silencing), d. h. nur über wenige Generationen hinweg, kann das eingebrachte Gen durch Rückkreuzung im Züchtungsverfahren entfernt (deselektiert) werden.
- (c) Infektion von Pflanzen mit gentechnisch hergestellten Pflanzenviren, die die (angestrebte) Ziel-Promotorsequenz beinhalten, was zur Abschaltung des Zielgens durch Methylierung führt („Virus-induziertes Gen-Silencing“ (VIGS) – RdDM).
- (d) Besprühen der Pflanze mit Doppelstrang-RNA (dsRNA).

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Unbeabsichtigte Effekte: Ausschaltung anderer Gene, was zu veränderten Merkmalen führt, mit möglichen negativen Folgen wie etwa der Produktion und Anreicherung von Giftstoffen und Allergenen, niedrigerem Nährstoffgehalt, Krankheitsanfälligkeit.
- Die Ausschaltung (Stilllegung) des Zielgens stoppt möglicherweise nicht nur die Herstellung des Genprodukts (d. h. des Proteins), sondern ruft, in Abhängigkeit der eventuellen Mitwirkung dieses Proteins an anderen Prozessen, auch andere unvorhergesehene Effekte hervor (oft bezeichnet als pleiotrope Effekte). Zu den möglichen Folgen zählt alles, was mit diesen Prozessen in Zusammenhang steht, z. B. Wachstumsfaktoren, Verteidigungs- und Signalmechanismen, Anreicherung von Stoffverbindungen, etc.
- Speziell bei dsRNA: Je nach angewandter Methodik kann das Vorhandensein von dsRNA-Molekülen in der Nahrungskette und der Umwelt negative Auswirkungen auf andere Organismen haben, die diese aufnehmen oder damit in Kontakt kommen, zum Beispiel durch Besprühen. Sie können über die Nahrungskette weitergereicht werden, sich verstärken und zur Ausschaltung lebenswichtiger Gene führen, was weit reichende Folgen für Umwelt und Gesundheit haben kann. Dieses Ziel wird zum Beispiel mit dsRNAs verfolgt, die in gentechnisch veränderten Nutzpflanzen produziert werden und die gegen Insekten wirken sollen. Im Vergleich zu älteren GVO ist das eine neue und ernst zu nehmende Dimension des Risikos.

¹⁷ RdDM („RNA dependend DNA methylation“) ist eine Form der RNA-Interferenz (RNAi).

¹⁸ Eine Methylgruppe (-CH₃-Gruppe) besteht aus einem Kohlenstoffatom in Verbindung mit drei Wasserstoffatomen.

¹⁹ Bei höheren Organismen wie Pflanzen und Tieren kann nur eine der vier DNA-Nukleotide, die Cytosin-Base, methyliert werden. Bei niederen Organismen wie Bakterien kann auch das Nukleotid Adenosin methyliert werden.

Fazit: Die entscheidende Frage ist nicht, ob das Endprodukt (die Pflanze) durch Gentechnik eingebrachte DNA-Sequenzen enthält oder nicht. Es geht vielmehr darum, dass RdDM eine sehr junge und wenig erforschte Technologie ist – mit möglicherweise ernst zu nehmenden negativen Folgen sowohl beim Verzehr als auch für die Umwelt. Es handelt sich um ein Gentechnik-Verfahren, das in Anbetracht der Risiken einer umfassenden Regulierung und Risikobewertung bedarf.

5) Pfropfen (Veredelung): eines nicht-GVO Pfropflings (Reiser/Zweig)²⁰ auf GVO-Unterlage/Wurzelstock (und umgekehrt)

Pfropfen (z. B. von Obstbäumen, Weinreben, Tomaten)²¹ ist ein Weg, die Stärken oder erwünschten Merkmale zweier Organismen zu vereinen, ohne sie kreuzen zu müssen, z. B. eine Unterlage mit Krankheitsresistenz mit einem Pfropfling oder Reiser für den Geschmack der Frucht. Obwohl die Kombination aus Pfropfling und Unterlage eine Chimäre ist (ein Organismus, bestehend aus genetisch verschiedenen Zellen), werden beide, der Reiser und der Wurzelstock, jeweils ihre eigenen genetischen Identitäten bezüglich der Grundsequenz ihrer DNA weitestgehend behalten.

Das Ziel bei der Verwendung einer GV-Unterlage ist es, Pfropflinge zu züchten, die von den GV-Eigenschaften profitieren, ohne als GV definiert werden zu müssen oder die GV-DNA zu tragen - obwohl die Pflanzen, als Ganzes gesehen, GVO sind.

Streng genommen wurde das Gewebe des Pfropflings nicht gentechnisch hergestellt, das der Unterlage aber schon. Dennoch können sich viele von der GV-Unterlage produzierte Moleküle, seien es Proteine, bestimmte RNA-Typen (z. B.: dsRNA), Hormone, Signal- oder Abwehrstoffe, in der gesamten chimären Pflanze verbreiten.²²

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Wirkung der GV-Unterlage auf die Umwelt: gentechnische Prozesse, wie etwa Transformation und Gewebekultur (siehe Fußnote 6), sind dafür bekannt, im gesamten Genom Mutationen auszulösen, auch an Insertionsstellen. Diese können veränderte oder unerwartete Merkmale hervorrufen, möglicherweise mit negativen Folgen für Boden und Umwelt. Positionseffekte eingefügter Gene (z. B. Beeinträchtigung der Expression benachbarter Gene) können ebenfalls negative Folgen hervorrufen.
- Verbindungen und Stoffwechselprodukte, die von der GV-Unterlage produziert werden, tauchen im Pfropfling und seinen Produkten (z. B. in der Frucht) auf und können die Zusammensetzung der Frucht / des Produkts verändern, was wiederum möglicherweise die Zusammensetzung von Nährstoffen, Allergenen oder Giftstoffen beeinflusst.
- Wenn RNAi (RNA-Interferenz) an der GV-Unterlage verwendet wurde, kann sich die Gen-Stilllegung der Unterlage durch die Bewegung der kleinen RNA-Moleküle von der Unterlage hin zum Pfropfling auf die DNA des Pfropflings übertragen. Das kann zum Abschalten von Genen im Pfropfling und zur Veränderung seiner Merkmale führen und umgekehrt.

Fazit: Um eine chimäre GV-Pflanze zu erhalten, bedarf es per Definition der Anwendung von Gentechnik und die entstehenden Risiken resultieren aus dem Gentechnik-Verfahren (die eingesetzte Sequenz, ihre Position (innerhalb des Chromosoms) und die Transformationsprozesse). Die Tatsache, dass der Reiser keinerlei gentechnisch veränderte DNA besitzt, verringert nicht automatisch die Risiken für die Umwelt, das Ökosystem und/ oder die Gesundheit von Mensch und Tier. Da Verbindungen/ Stoffe zwischen Unterlage und Pfropfling hin und her wandern können und das Verhalten und die molekulare Zusammensetzung des Pfropflings beeinflussen können, müssen sowohl die Pflanze als Ganzes als auch der Pfropfling und seine Produkte als GVO eingestuft sowie umfassend bewertet und reguliert werden. Das ist angebracht, gerade weil die Prozesse und das Zusammenspiel von Unterlage und Pfropflingen nicht hinreichend erforscht sind.

²⁰ *Pfropfreiser:* Ein junger Pflanzenteil (Trieb, Reiser oder Knospe), der für die Veredelung abgeschnitten wurde.

²¹ *Pfropfen (Veredelung):* Seit über 2000 Jahren bei Gehölzen angewendet, besonders bei Obstbäumen, Rosen und Weinreben. Veredelung von Gemüsesorten wird erst seit jüngerer Zeit betrieben, vor allem bei Tomaten und Wassermelonen, aber auch bei Gurken und Auberginen.

²² Der Transport läuft in erster Linie über das *Phloem*, ein Gefäßgewebe, das Wasser, Nahrung und Nährstoffe nach oben und unten (d. h. in beide Richtungen) in die wachsenden Teile einer Pflanze transportiert.

6) Reverse Breeding (RB)

RB ist ein gentechnisches Verfahren, das angewandt wird, um aus einem existierenden Hybriden, dessen Elternlinien nicht mehr verfügbar sind oder nicht mehr existieren, genetisch einheitliche und reine (homozygote) Elternlinien zu rekonstruieren. Eine wesentliche Hürde dabei ist, dass die von den Elternlinien stammenden Chromosomen immer dann, wenn durch Meiose Gameten (Keimzellen) produziert werden, durch genetische Rekombination²³ Informationen austauschen und somit die DNA vermischen. Um das zu verhindern, wird ein ausgewählter Hybrid gentechnisch so verändert, dass eine genetische Rekombination bei der Keimzellenbildung unterdrückt wird (unter Verwendung von RNAi). Mittels Gewebekultur werden individuelle Keimzellen verwendet, um daraus Pflanzen mit zwei gleichen Chromosomensätzen (genannt „Doppelhaploide“) zu rekonstruieren. In einem späteren Stadium wird das GV-Gen herausgezüchtet und Elternlinien ausgewählt, die – in Kombination – den angestrebten Hybriden hervorbringen.

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Da dieselben Gentechnik-Verfahren genutzt werden, sowohl zum Einfügen der Gene als auch zur Rekonstruktion der Pflanzen durch Gewebekultur, sind die gleichen Risiken und unvorhersehbaren Folgen möglich wie bei anderen GVO. Häufige Folgen:
 - Mutationen an der Stelle der Insertion und am gesamten Genom (z. B. Löschungen, Neuordnungen, Vervielfältigungen) aufgrund der Transformationsprozesse, einschließlich Gewebekultur, mit unvorhersehbaren Folgen, die zu veränderter Leistungsfähigkeit und Krankheitsanfälligkeit führen können, zur Anreicherung von Giftstoffen, erhöhter Allergenproduktion oder Veränderungen der Nährstoffzusammensetzung.
 - Der überwiegende Teil dieser Mutationen bleibt in den rekonstruierten Elternlinien auch dann erhalten, wenn das GV-Gen selbst herausgezüchtet wird und mit ihm die Mutationen, die am engsten mit der Insertionsstelle selbst verbunden sind.
- Das gentechnische Verfahren des Gen-Silencing der RNAi-Methode kann zur Ausschaltung von Nicht-Zielgenen führen – Effekte, die über viele Saatgutgenerationen hinweg beibehalten werden. Daher muss die Leistungsfähigkeit überprüft und eine Analyse der Inhaltsstoffe durchgeführt werden, gefolgt von einer umfassenden Risikobewertung. Diese Schritte, einschließlich Fütterungsversuche, müssen vor der ersten Pflanzung getätigt werden und dann erneut einige Generationen später, sobald das gewollte und ungewollte Gen-Silencing nicht mehr auftritt.
- Funktionelle Komponenten oder komplette Sequenzen des GV-Gens könnten sich zusätzlich zu der ersten Insertion an anderen Stellen selbst integriert haben. Möglicherweise werden sie daher beim Herauszüchten nicht entfernt, sondern verbleiben an Ort und Stelle, wo sie potentiell immer noch in der Lage sind, Gene in der Zielregion oder in Nicht-Ziel-Regionen auszuschalten.

Fazit: Die ausgewählten Elternlinien und die kombinierten neuen Hybriden müssen auf das Vorhandensein von GV-Sequenzen und auf ungewollte Effekte aufgrund von ungewolltem Gen-Silencing und transformationsinduzierten Mutationen hin überprüft werden, die das Potential haben, z. B. Leistungsbeeinträchtigungen und Krankheitsanfälligkeit, Anreicherung von Giftstoffen, gesteigerte Allergenproduktion und veränderte Nährstoffzusammensetzungen hervorzurufen. Umfassende Risikobewertungen sind vonnöten.

²³ *Meiose* ist ein Prozess der Zellteilung, der bei der Bildung von Gameten abläuft, d. h. der männlichen oder weiblichen Keimzellen, von denen jede halb so viele Chromosomen besitzt (*haploid*) wie gewöhnliche Pflanzenzellen, die zwei Chromosomensätze haben, einen von jedem Elternteil (*diploid*). Die Einzelstränge der haploiden Keimzellen entsprechen normalerweise nicht den ursprünglichen Einzelsträngen der Elternlinien, sondern sie werden bei der Meiose (Reduktionsteilung) durch genetische Rekombination anders zusammengesetzt. Genau das will Reverse Breeding verhindern (Anmerkung der Übersetzer).

7) Agroinfiltration: Agroinfiltration im engeren Sinne & Agroinfektion

Diese Methode umfasst zwei unterschiedliche Techniken. Es wird nicht beabsichtigt, bestimmte GV-Gene stabil einzubringen und in das Genom der Pflanze zu integrieren, sondern vielmehr, solche Gene höchstens eine Generation lang vorübergehend in der Pflanzenzelle zu behalten.

Zu diesem Zweck werden Gene, die entweder für bestimmte Proteine kodieren oder für RNAs, die die pflanzeneigenen Gene beeinflussen sollen (z. B. via RNAi), in das Plasmid²⁴ von *Agrobacterium tumefaciens* eingeführt.²⁵ Eine Lösung mit solchen Agrobakterien oder ihren Plasmiden wird dann benutzt, um bestimmte Gewebe lebender Pflanzen (z. B. Blätter) so zu behandeln, dass die Plasmide mit den GV-Genen in die Zellen in diesem Gewebe eingebracht werden. Das GV-Gen wird dann innerhalb des Plasmids in eine RNA transkribiert (abgelesen) und befindet sich danach in der Zelle. Hier wird sie dann entweder in ein Protein übersetzt oder aber regulativ wirksam und schaltet bestimmte DNA Sequenzen durch Gene Silencing ab.

Mögliche Ziele sind: Potentielle Transgene zu testen; die Funktion der pflanzeneigenen Gene zu untersuchen (z. B. durch Gen-Silencing via RNAi); hochwertige Proteine in Pflanzen zu exprimieren und zu produzieren (z. B. Arzneimittel); Pflanzen, Samen, Hybride mit durch RdDM veränderten Merkmalen (RNA-gesteuerte DNA-Methylierung – siehe Abschnitt 4); oder Verwendung als Transportsystem für andere gentechnisch-basierte Instrumente der NZT, wie etwa orts-gerichtete Nukleasen.

Zwei verschiedene Techniken:

Agroinfiltration (im engeren Sinne): Zielsetzung ist es, die Genexpression und deren Wirkung an Ort und Stelle zu halten, dabei wird nicht davon ausgegangen, dass sich das vorbereitete und verwendete Genkonstrukt in der Empfängerzelle reproduziert.

Agroinfektion: Zielsetzung ist es, dass sich ein bestimmtes GV-Gen in der gesamten Pflanze in nahezu allen Geweben ausbreitet, aber trotzdem nicht in die DNA der Pflanze integriert wird. Zu diesem Zweck enthält das Genkonstrukt zusätzlich zu dem ausgewählten Gen eine virale Vektorsequenz, damit das Genkonstrukt in allen infizierten Zellen reproduziert wird. Das gentechnisch eingefügte Gen, das für die benötigte RNA kodiert, soll von seiner Stelle auf dem Vektor exprimiert werden, d. h. nicht von einer Stelle auf der Pflanzen-DNA.

Ungewollte Veränderungen und Risiken:

- Obwohl das Genkonstrukt lokal angewandt wird, kann es sich aufgrund der verwendeten Agrobakterien und/ oder viralen Vektorsequenzen trotzdem in der gesamten Pflanze ausbreiten. Obwohl das Genmaterial nur vorübergehend wirken soll, wird es möglicherweise in die DNA der Pflanze und selbst in reproduktives Gewebe integriert und führt somit unbeabsichtigt zur Entstehung von GVO und GV-Nachkommen.
- Die Integration im Genom kann überall zufällig stattfinden, dabei kann es sich auch um kleinere DNA-Sequenzen, einschließlich die Vektor-DNA, handeln. Die Beeinträchtigung von Pflanzen-Genen durch Positionseffekte oder durch Sequenzen aus dem Genkonstrukt, können negative Auswirkungen auf die Leistung der Pflanze, ihre Umwelt und Biodiversität oder auf ihre Sicherheit als Lebensmittel haben.
- Es könnten versehentlich gentechnisch veränderte Agrobakterien in die Umwelt gelangen (entweder durch die Verbreitung von und Kontaminierung mit infiltriertem Pflanzenmaterial, das nicht mehr gebraucht oder entfernt wurde, oder einfach durch z. B. in einem Labor, Gewächshaus oder einem Versuchsfeld verschüttete oder ausgelaufene Flüssigkeiten). Dies wiederum kann potentiell negative Auswirkungen haben, wenn die Genkonstrukte in andere Pflanzen oder Mikroorganismen gelangen.
- Die Replikation (Vermehrung von Plasmiden und Gen-Konstrukten) könnte in so geringem Ausmaß auftreten, dass sie lange Zeit nicht entdeckt wird, was die Wahrscheinlichkeit der Integration oder Mutation erhöht, wodurch die DNA wiederum stabil vererbt werden kann.

Schlussfolgerung: Pflanzen, Pflanzenteile, deren Produkte oder Nachkommen, die der Agroinfiltration (einschließlich Agroinfektion) ausgesetzt wurden, müssen auf das Vorhandensein von DNA-Sequenzen des Vektors und/ oder des Genkonstrukts sowie auf das Vorhandensein und die Effekte des Gen-Silencing, falls dies das ursprüngliche Ziel der Agroinfiltration war, überprüft werden.

²⁴ Ein *Plasmid* ist ein ringförmiges DNA-Molekül in einer Bakterienzelle, das sich unabhängig von den Chromosomen reproduzieren und auf andere Bakterien übertragen werden kann. Hier enthält es die Transgene.

²⁵ Die Verwendung von *Agrobacterium* als Genfahre (Transportvehikel) ist eines der gängigsten Hilfsmittel, GVO zu erzeugen.

Vier der wichtigsten Quellen mit Hintergrundinformationen und zum weiteren Studium:

Eckerstorfer M, Miklau M and Gaugitsch H. (2014). New plant breeding techniques and risks associated with their application. Technical Report. REP-0477. Environmental Agency Austria. ISBN: 978-3-99004-282-3
<http://www.umweltbundesamt.at/fileadmin/site/publikationen/REP0477.pdf>

Heinemann JA, Agapito-Tenfen SZ, and Carman JA. (2013). A comparative evaluation of the regulation of GM crops or products containing dsRNA and suggested improvements to risk assessment. *Environment International* 55: 43–55
<http://gmojudycarman.org/wp-content/uploads/2013/06/comparative-evaluation-of-the-regulation-of-GM-crops-or-products-containing-dsRNA-and-suggested-improvements-to-risk-assessments.pdf>

Wilson AK, Latham JR and Steinbrecher RA. (2006). Transformation-induced mutations in transgenic plants: analysis and biosafety implications. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 23:209–237
<http://econexus.info/publication/transformation-induced-mutations-transgenic-plants>

Agapito-Tenfen, SZ and Wikmark, O-G (2015). Current status of emerging technologies for plant breeding: Biosafety and knowledge gaps of site directed nucleases and oligonucleotide-directed mutagenesis. GenØk Biosafety Report 02/15. <http://genok.com/arkiv/4288/>

Übersetzung des Hintergrundpapiers: Sophia Erben.

Unterstützt von Dr. Elisabeth Bücking, Dr. Ricarda A. Steinbrecher, Annemarie Volling.

Im Auftrag der Arbeitsgemeinschaft bäuerliche Landwirtschaft (AbL).

Herausgabe: Februar 2016.

Die Übersetzung wurde unterstützt von:



Unterstützen Sie unsere Arbeit für die gentechnikfreie, bäuerliche Landwirtschaft:

Empfänger: FaNaL e.V. Rheda-Wiedenbrück

IBAN: DE68478535200002029379

BIC: WELADED1WDB

Kreditinstitut: Kreissparkasse Wiedenbrück

Stichwort: gentechnikfrei