

Marie Nyman

Gentekniknämnden, Stockholm, Sverige

GMO eller inte GMO? Nya tekniker sätter lagstiftningen på prov

Inom EU finns en gemensam lagstiftning som reglerar användningen av genetiskt modifierade organismer (GMO). Lagstiftningen gäller i princip all verksamhet från användningen av genetiskt modifierade bakterier eller möss på laboratorium till kontrollerade försök med växter utomhus, kommersiell odling och import till EU. Lagstiftningen gäller alla typer av organismer, utom människa. Denna text kommer dock att fokusera på växter.

De delar av lagstiftningen som definierar vad en GMO är har över 20 år på nacken och under den perioden har utvecklingen inom det gentekniska området gått rasande fort. Det har lett till att det i dagsläget är oklart om vissa tekniker leder till en GMO som ska regleras eller inte.

Inom EU diskuteras sedan 2007 åtta olika tekniker. Sedan diskussionerna startade har ytterligare nya tekniker, i gränslandet mellan vad som ska regleras och vad som inte ska det, utvecklats.

Till skillnad från en "klassisk" GMO resulterar flera av de nya teknikerna i en växt som inte bär på något främmande DNA. Växten innehåller därmed ingen hybridnukleinsyra.

Hybridnukleinsyra är ett centralt begrepp i lagstiftningen och innebär att man länkar samman genetiskt material från olika källor.

Om växten inte innehåller någon hybridnukleinsyra, vad är då problemet? Jo, i många fall använder man hybridnukleinsyramolekyler under något steg i förädlingsprocessen. Så en av de frågor som ställs är, en gång GMO, alltid GMO?

Vad säger lagstiftningen?

Lagstiftningen är teknikbaserad, det vill säga det är metoden för hur till exempel en ny växtsort tagits fram som är avgörande för om den ska regleras eller inte.

I lagstiftningen definieras en genetiskt modifierad organism som "*en organism, med undantag för människa, i vilken det genetiska materialet har ändrats på ett sådant sätt som inte sker naturligt genom parning och/eller naturlig rekombination.*"

KORRESPONDENS TILL
Marie Nyman; Email:
marie.nyman@genteknik.se

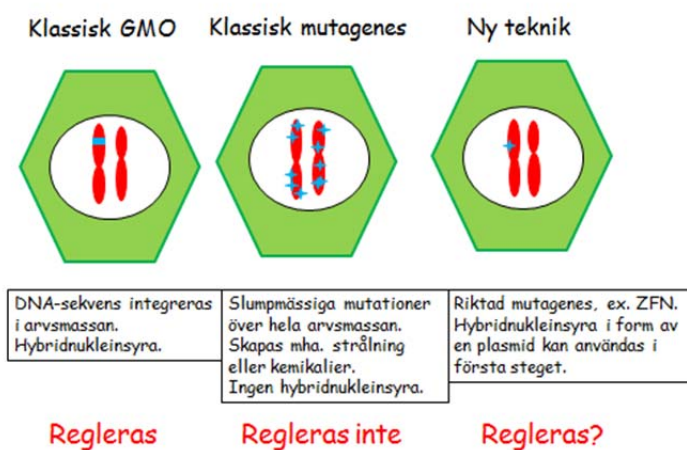
Enligt definitionen leder alltså allt som inte är ett resultat av en befruktning till en GMO. Det innebär att även många traditionella förädlingsmetoder omfattas av grunddefinitionen.

I bilagorna till direktivet görs dock vissa undantag. Där listas vad som inte anses leda till en GMO och vad som anses leda till en GMO men undantas reglering.

Tekniker som inte leder till en GMO

När det gäller växter finns det två förädlingstekniker som inte leder till en GMO enligt lagstiftningen. Den ena är att öka antalet kromosomuppsättningar i en växt. De allra flesta djur har två kromosomuppsättningar (diploid). Växter kan däremot ha många fler, även i naturen. Bland de odlade växterna har till exempel banan tre kromosomuppsättningar (triploid), potatis fyra (tetraploid) och jordgubben hela åtta uppsättningar (oktoploid). Växter med fler än två kromosomuppsättningar är ofta robustare, producerar större frukter eller knölar etc. Att bananen är triploid gör att den är steril, vilket innebär att det inte utvecklas några riktiga frön i bananen.

Den andra tekniken som enligt lagstiftningen inte leder till en GMO är sammansmältning av somatiska celler, det vill säga celler som inte är könsceller (pollen och äggcell). På samma sätt som ett befruktat ägg, kan de sammansmälta somatiska cellerna fås att utvecklas till en ny planta. Plantan kallas en somatisk hybrid eftersom den inte är ett resultat av en kombination av könsceller. Om de växter vars celler har smälts samman går att kombinera på annat sätt, till exempel via korsning, räknas den somatiska hybriden inte som en GMO. Däremot är det enligt lagstiftningen en GMO om växterna inte går att kombinera på annat sätt än via somatisk hybridisering.



Figur 1.

Tekniker som leder till en GMO, men som undantas reglering

All växtförädling bygger på att det finns en genetisk variation. En klassisk förädlingsteknik som använts sedan 1930-talet är mutagenes. Det innebär att man med hjälp av strålning eller kemikalier skapar mutationer, och därmed en större genetisk variation, i växtmaterialet. Det finns 1000-tals sorter som tagits fram på detta sätt exempelvis kornsorten *Golden Promise* som använts flitigt vid öl- och whiskeytillverkning. Mutationsförädling leder

enligt lagstiftningen till en GMO, men undantas reglering, förutsatt att metoden inte inbegriper användning av hybridnukleinsyramolekyler. (se fig 1).

Tre exempel på nya tekniker i gränlandet

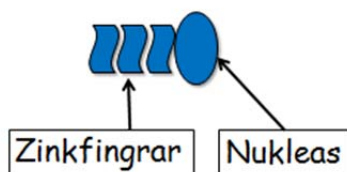
I de genetiskt modifierade växter som idag finns på marknaden har en DNA-sekvens förts in och integrerats i växtens arvs massa. Man har alltså kombinerat växtens DNA med det DNA som förts in utifrån och skapat hybridnukleinsyra. Syftet har antingen varit att producera ett nytt protein eller att hämma produktionen av ett protein i växten. Genom att förändra proteinproduktionen kan man ge växten en ny egenskap, till exempel resistens mot olika skadegörare eller ett förbättrat näringsinnehåll.

Zinkfingernukleas (ZFN)

Proteinkomplex som består av:

✓ DNA-bindande del: Zinkfinger
(designas för att binda till ett specifikt ställe i arvs massan)

✓ DNA-klyvande del: Nukleas



Figur 2.

Riktade förändringar av arvs massan - nukleaser

En grupp tekniker som bygger på designade proteinkomplex har blivit allt vanligare inom forskning och utveckling. Det gäller både inom den grundläggande och den tillämpade forskningen och teknikerna används på en rad olika organismer/celler som fiskar, insekter, däggdjur, växter och stamceller.

Den gemensamma nämnaren för dessa tekniker är olika varianter av nukleaser, proteiner som kan klippa itu DNA. Nukleaset kom-

bineras ihop med ett protein som känner igen en viss sekvens av DNA-byggstenarna A, T, G och C. Det gör att DNA:t i växten klipps itu på en förutbestämd plats i arvs massan. (se fig 2).

När DNA-strängen klippts itu, reagerar växtens eget reparationssystem och skadan lagas.

Vid lagningen försvinner ofta enstaka baspar, något som inträffar även när skadan uppstått av annan anledning. När baspar försvinner skapas en förändring i arvs massan, en mutation.

Med hjälp av den klassiska mutationsförädlingen skapas slumpmässiga mutationer över hela arvs massan och det är först i efterhand man kan analysera om någon mutation lett till en för människan intressant egenskap. Med de nya teknikerna för riktade förändringar kan man redan på förhand bestämma var mutationen ska ske. Vill man till exempel stoppa proteinproduktionen från en viss gen kan man designa proteinkomplexet så

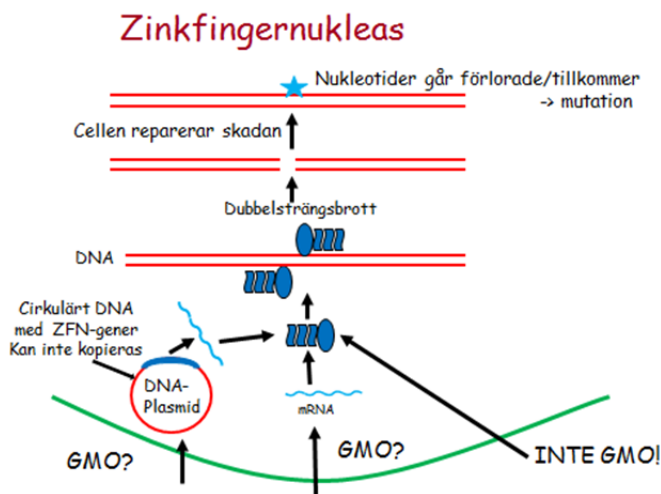
att det via en mutation inaktiverar genen. Om man samtidigt för in en gen för någon egenskap i växtcellen integreras den på den plats där DNA:t klippts itu. Därmed kan man redan på förhand bestämma var i växtens arvs massa den nya genen ska placeras. Det sistnämnda fallet leder till en GMO som ska regleras. Osäkerheten gäller om det bara skapas en mutation.

Tekniker där nukleaser används på detta sätt utsågs av den vetenskapliga tidskriften *Nature Methods* till årets metod 2011 och listades som ett av de tio stora genombrotten 2012 av tidskriften *Science*.

Det finns exempel på att man fört in själva protein-komplexet i en växtcell, men vanligtvis använder man sig av cirkulärt DNA (plasmider) som bär på generna för proteinerna eller i form av mellansteget mellan DNA och protein, mRNA.

Det finns alltså tre sätt: (se fig 3).

1. Proteinkomplexet förs in i växtcellen utan något mellansteg.
2. En DNA-plasmid som bär på gener för proteinkomplexet förs in i en växtcell. På plats i växtcellen producerar generna ett mRNA som översätts till proteinkomplexet. När proteinerna gjort sitt jobb bryts plasmiderna, RNA:t och proteinkomplexet ner. Kvar blir en riktad mutation i arvs massan.
3. Man hoppar över DNA-steget och för in mRNA istället. I cellen översätts mRNA:t till protein.

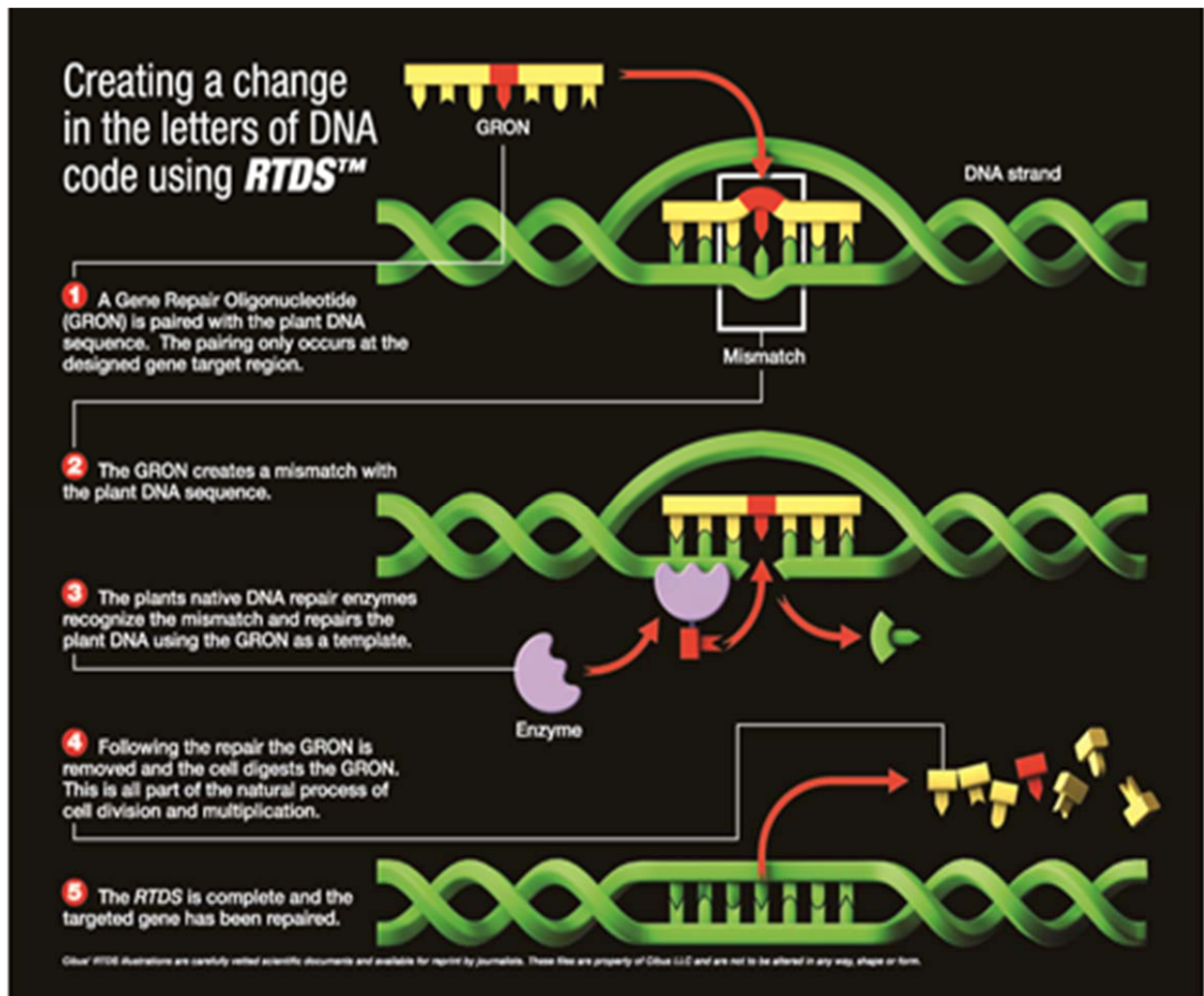


Figur 3.

I det första fallet står det klart att tekniken inte leder till en GMO som ska regleras, eftersom nukleinsyra inte använts i något steg. Gränsdragningsproblematiken uppstår när man för in nukleinsyra i form av exempelvis en plasmid. Plasmiden består av en gen för det protein som ska känna igen en viss DNA-sekvens, en gen för nukleaset och andra sekvenser som inte resulterar i något protein utan mer kan ses som bärare av generna. Plasmiden består alltså av genetiskt material från olika källor och är därmed en hybridnukleinsyra.

Oavsett om man initialt använder plasmider eller mRNA eller om man för in proteinerna direkt kommer resultatet att bli detsamma eftersom det i slutändan är proteinerna som utför själva arbetet. Lagstiftningen säger dock att om man för in proteinerna direkt blir resultatet inte en GMO som ska regleras, medan det är mer tvek-

samt om man använder DNA-plasmider eller mRNA som mellansteg.



Figur 4. Att skapa en förändring i DNA-koden genom att använda RTDS (Rapid Trait Development System)

1. Oligonukleotiden (kallad GRON) parar med den DNA-sekvens i växten där det baspar man vill förändra finns.
2. Vid det ställe man vill förändra fungerar inte basparningen. Ett G kan till exempel inte binda till ett T.
3. Växtens reparationsenzym känner av den dåliga passningen och ändrar växtens DNA med oligonukleotiden som mall.
4. När förändringen skett bryts oligonukleotiden ner.

Riktade förändringar av arvmassan - oligonukleotider

I en annan teknik, som även den resulterar i riktade mutationer, använder man sig av korta DNA-sekvenser (oligonukleotider). Oligonukleotiden designas så att den kan baspara med en viss DNA-sekvens i växten, med undantag för den plats där man vill göra förändringen. (se fig 4). Där sätter man in till exempel ett T fast motsvarande plats i växtens arvs massa är G. Eftersom T

alltid binder till A och G till C kommer oligonukleotiden och växtens arvs massa inte att kunna baspara vid just detta ställe. Växtens eget reparationssystem upptäcker detta och använder sig av den pool av DNA-byggstenar som finns i cellen för att byta ut den byggsten i växtens DNA som inte kan baspara med oligonukleotiden. När ett baspar bytts ut har det skapats en riktad mutation. Oligonukleotiden har gjort sig jobb och bryts ner av cellens enzymer. Något främmande DNA integreras inte i växtens arvs massa.

En oligonukleotid kan bestå av till exempel DNA, en kombination av DNA och RNA eller en nukleinsyraanalog som rent biologiskt inte är någon nukleinsyra. I det sistnämnda fallet används alltså ingen nukleinsyra och därmed blir resultatet inte en GMO som ska regleras.

Hur är det då om man använder en oligonukleotid som består av DNA? De frågor som ställs är om en syntetiskt framställd oligonukleotid kan definieras som en hybridnukleinsyramolekyl och om den kan räknas som ärftligt material även om den i sig inte kan nedärvas.

I USA och Kanada har man beslutat att tekniken inte leder till en GMO.

Ympning av skott på genetiskt modifierad grundstam

Ympning av skott på grundstam är mycket vanligt när det gäller fruktträd, men används även vid odling av till exempel tomat och vattenmelon. Skott från vattenmelon ympas till exempel ofta på kalebassgrundstammar eftersom det ger resistens mot jordburna svampar, och päron i kommersiell odling ympas ofta på kvitten. Frågan är om ett äpple som produceras på ett träd som växer på en genetiskt modifierad grundstam täcks av lagstiftningen?

Vad händer på EU-nivå?

En arbetsgrupp med experter från medlemsstaterna bildades 2008. Gruppens uppgift var att analysera åtta tekniker utifrån definitionerna i lagstiftningen, de tekniker som listas i bilagorna till lagstiftningen och senaste vetenskapliga data. I början av 2012 fick medlemsstaternas behöriga myndigheter ta del av gruppens slutsatser.

Den europeiska livsmedelssäkerhetsmyndigheten fick 2011 i uppdrag av EU-kommissionen att analysera vilka risker för påverkan på hälsa och miljö de nya teknikerna kan innebära och om det finns behov av nya riktlinjer för riskbedömning. Detta oavsett om de kommer att omfattas av GMO-lagstiftningen eller inte. Myndighetens GMO-panel har hittills publicerat två utlåtanden och

kommissionen har meddelat att de i nuläget inte behöver analysera de återstående sex teknikerna.

Generaldirektoratet Joint Research Center, EU-kommissionens vetenskapliga arm, har bland annat analyserat vilka som utvecklar de nya teknikerna, vilka de främsta drivkrafterna/begränsningarna och om resultatet av de nya teknikerna går att detektera. I maj 2011 publicerade de sin rapport.

Rapporten visar att växtförädlare redan börjat praktiskt använda de nya teknikerna och att kommersiella tillämpningar för vissa av teknikerna är långt framskridna. Företag och universitet inom EU spelar enligt rapporten en framträdande roll i utvecklingen av nya tekniker. En av de främsta drivkrafterna är teknikernas stora potential. En av de största begränsningarna är osäkerheten om en viss teknik leder till en GMO som ska regleras eller inte. Kostnaderna kommer att vara mycket låga om en produkt klassificeras som icke-GMO eller undantas reglering och mycket höga om den klassificeras som en GMO som ska regleras.

Många av de nya teknikerna leder till en produkt som inte bär på något främmande DNA. När det gäller till exempel tekniker för riktade mutationer i arvsmassan går det inte att avgöra om mutationen är ett resultat av klassisk mutationsförädling, någon av de nya teknikerna eller om det rör sig om en naturligt förekommande variant av växten. I och med det är det inte möjligt att utveckla detektionsmetoder som ger entydiga svar, vilket är ett krav enligt EUs lagstiftning.

Hur beslutsfattandet om de enskilda teknikerna kommer att se ut på EU-nivå är fortfarande oklart.

Teknikutvecklingen stannar inte av

År 2007 började man inom EU att diskutera åtta olika teknikers rättsliga hemvist. Sedan dess har ytterligare nya tekniker, som inte diskuteras, utvecklats.

Ett exempel är en ny teknik för riktade förändringar i arvsmassan som på kort tid fått ett sällan skådat genomslag i forskarvärlden. På samma sätt som de tidigare beskrivna teknikerna bygger denna teknik på nukleaser, men istället för att det är proteiner som känner igen en viss sekvens i arvsmassan är det ett så kallat guide-RNA. Tekniken bygger på samma princip som många bakterier använder sig av för att skydda sig mot till exempel virusangrepp. Bakterierna använder sig av målsökande RNA-sekvenser som binder till virusets arvs massa. Med hjälp av bakteriens eget nukleas klipps därefter viruset arvs massa itu intill den plats där guide-RNA:t bundit. Bakterien har därmed oskadliggjort viruset. Bakteriernas system för att oskadliggöra främmande DNA/RNA används nu i något modifierad form

för att på olika sätt förändra arvsmassan i en rad olika organismer, allt ifrån mikroorganismer och växter till apor, fiskar och stamceller.

Tekniken är mycket precis och kan förändra flera platser i arvsmassan samtidigt. Den är dessutom användarvänligare och betydligt billigare än andra tekniker för riktade förändringar av arvsmassan. Forskargruppen som utvecklade tekniken har inte heller tagit något patent.

Tekniken blev av de vetenskapliga tidskrifterna *Science* och *Nature* utnämnd till en av de viktigaste vetenskapliga upptäckterna under 2013 och ledaren för forskargruppen bakom tekniken listades av tidskriften *Nature* som en av *Ten people who mattered this year*. Han har även bildat ett företag och planerar att använda tekniken inom genterapin.

Vidare läsning

På Gentekniknämndens webbplats (www.genteknik.se) hittar du de årliga rapporterna om Genteknikens utveckling. I rapporterna från 2009-2012 hittar du exempel på hur teknikerna använts i forskning och utveckling, med referenser till de vetenskapliga originalartiklarna.

All lagstiftning som rör GMO finns samlad på genteknikmyndigheternas gemensamma webbplats, www.gmo.nu.