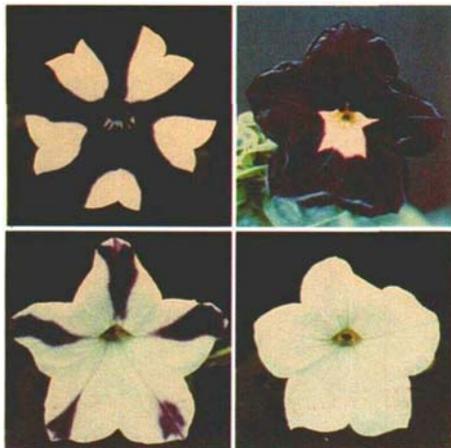
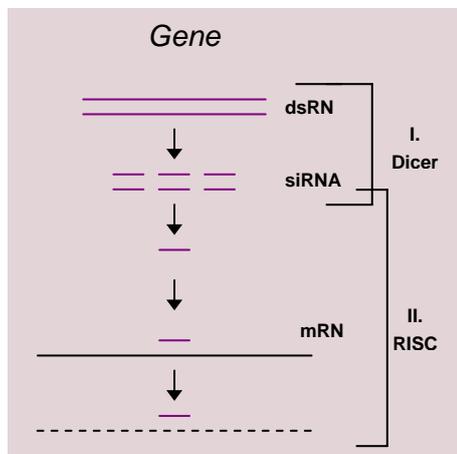


Katja Moch

Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen: Auswirkungen auf die Risikobewertung



Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen: Auswirkungen auf die Risikobewertung

**Gutachten im Auftrag des
Bundesamtes für Naturschutz**

Katja Moch

**Unter Mitarbeit von
Ruth Brauner
Bettina Ott**



Titelbild:

Foto links oben: Skizze zum Ablauf des Gene silencing
Foto rechts oben: Petunie (www.biosicherheit.de)
Foto links unten: Petunien, (entnommen und verändert aus NAPOLI C, LEMIEUX C, JORGENSEN R (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene in Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell 2: 279-289).
Foto rechts unten: Auf Nährmedium kultivierter Pflanzenkeimling, entnommen und verändert aus ‚EU policy on biotechnology‘, EC 2006, ISBN 92-79-01330-0.

Adressen der Autorinnen:

Katja Moch	Öko-Institut e.V. Geschäftsstelle Freiburg Postfach 50 02 40 D-79028 Freiburg Tel.: +49-(0)761-452950 Fax: +49-(0)761-45295-88
Ruth Brauner	Öko-Institut e.V. Büro Berlin Novalisstraße 10 D-10115 Berlin Tel.: +49-(0)30-280486-80 Fax: +49-(0)30-280486-88
Bettina Ott	Büro Darmstadt Rheinstr. 95 D-64295 Darmstadt Tel.: (06151) 8191-0 Fax: (06151) 8191-33

Fachbetreuung im BfN:

Dr. Wolfram Reichenbecher, Fachgebiet II 2.3 „Bewertung gentechnisch veränderter Organismen, Vollzug GenTG“

Die Beiträge der Skripten werden aufgenommen in die Literaturdatenbank „**DNL-online**“ (www.dnl-online.de).

Die BfN-Skripten sind nicht im Buchhandel erhältlich.

Herausgeber: Bundesamt für Naturschutz (BfN)
Konstantinstr. 110
53179 Bonn
Tel.: 0228/8491-0
Fax: 0228/8491-9999
www.bfn.de

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie für die Beachtung privater Rechte Dritter. Die in den Beiträgen geäußerten Ansichten und Meinungen müssen nicht mit denen des Herausgebers übereinstimmen.

Nachdruck, auch in Auszügen, nur mit Genehmigung des BfN.

Druck: BMU-Druckerei

Gedruckt auf 100% Altpapier

Bonn-Bad Godesberg 2006

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Summary	6
1. Einleitung	8
1.1 Problemstellung.....	8
1.2 Vorgehen	10
2. Epigenetik und epigenetische Effekte, Begriffe und Erklärungen.....	12
2.1 Chromatinstruktur und ihr Einfluss.....	13
2.2 Methylierung und Imprinting in Pflanzen.....	14
2.3 RNA-Interferenz.....	14
2.4 Positionseffekte	16
2.5 Pleiotrope Effekte	17
2.6 Unterschiede zwischen Tieren und Pflanzen.....	17
3. Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen.....	19
3.1 Gene Silencing	19
3.1.1 Transkriptionelles Gene Silencing	20
3.1.2 Post-transkriptionelles Gene Silencing	21
3.1.3 Gene Silencing und Umwelteinflüsse	24
3.1.4 Ansätze zur Stabilisierung der Transgenexpression	24
3.1.5 Fazit.....	25
3.2 Positionseffekte	27
3.3 Pleiotrope Effekte	28
3.3.1 Profiling-Methoden oder Omics-Technologien	38
3.3.2 Problem des Komparators	48
3.3.3 Fazit.....	49
4. Empfehlungen für die Risikobewertung.....	52
4.1 Die Referenz: die genetische Ebene	52
4.1.1 Bewertung der genetischen Ebene.....	56
4.1.2 Empfehlung für die Risikobewertung.....	57
4.2 Epigenetische Effekte.....	57
4.2.1 Kompositionsanalyse.....	58
4.2.2 Biologie der Pflanze.....	61
4.2.3 Bewertung der epigenetischen Ebene.....	61

5. Fazit.....	63
5.1.1 Vorschläge zur Anpassung der Risikobewertung	63
5.1.2 Forschungs- und Handlungsbedarf	64
5.1.3 Bewertung von Unterschieden.....	64
6. Literatur	66
Anhang 1	80

Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Tier und Pflanze auf der Organisationsebene, nach Stöcklin (2004).....	18
Tabelle 2: Übersicht über Untersuchungen zum unerwünschten Gene Silencing von Transgenen in Nutzpflanzen; TGS= transkriptionelles Gene Silencing, PTGS = post-transkriptionelles Gene Silencing	23
Tabelle 3: Übersicht über beobachtete pleiotrope Effekte bei transgenen Pflanzen	30
Tabelle 4: Forschungsprojekte der britischen Food Standards Agency (FSA): Analysemethoden zur Detektion unerwarteter Effekte, Laufzeit der Projekte: 2001-2005.	43

Zusammenfassung

Das Ein-Gen-Ein-Protein-Paradigma, das sich in den fünfziger Jahren nach Aufklärung der Struktur der DNA etablierte, muss nach zahlreichen Ergebnissen der Grundlagenforschung als überholt gelten. Das Genom ist wesentlich komplexer und flexibler aufgebaut; Informationsflüsse verlaufen vernetzt und auch in unterschiedliche Richtungen. Bezogen auf gentechnische Arbeiten bedeuten diese Erkenntnisse, dass durch das Einbringen von Genkonstrukten in ein vorhandenes Genom eines Organismus nicht nur die gewünschte Veränderung herbeigeführt wird, sondern dass damit auch in genregulatorische Vorgänge und Strukturen eingegriffen wird. Unbeabsichtigte Effekte der gentechnischen Veränderung können dann die Folge sein. Bislang gibt es keine detaillierte Zusammenstellung und Bewertung der verschiedenen unbeabsichtigten Effekte bei gentechnischen Veränderungen in Pflanzen.

Das Gutachten setzt bei der Zusammenfassung epigenetischer Effekte bei transgenen Pflanzen an. Damit sind unbeabsichtigte Effekte, die über ungewollte Veränderungen auf genetischer Ebene, wie etwa multiple Insertionen, Umordnungen, Deletionen, Füll-DNA etc. hinausgehen, gemeint. Epigenetische Effekte, die bisher bei transgenen Pflanzen beobachtet wurden, lassen sich in Gene Silencing, also eine Stilllegung des Transgens, Positionseffekte und pleiotrope Effekte einteilen. Ergebnisse zu Positionseffekten betreffen die Höhe und Stabilität der Transgenexpression, zeigen aber auch, dass Transgene mit erhöhter Wahrscheinlichkeit in aktive oder regulatorisch bedeutsame Regionen des pflanzlichen Genoms inserieren. Pleiotrope Effekte beziehen sich auf alle möglichen unbeabsichtigten Veränderungen auf morphologischer und physiologischer Ebene. Oft äußern sie sich auch in einer veränderten Zusammensetzung der Inhaltstoffe. Grundsätzlich zeigt sich hier das Problem, dass pleiotrope Effekte sehr unterschiedlich bewertet werden.

Insbesondere die Erkennung von pleiotropen Effekten stellt eine Herausforderung für die Risikobewertung dar. Als mögliche Hilfe gelten die sogenannten Omics-Technologien, die eine nicht-zielgerichtete Analyse der transkribierten DNA, der Proteine und der Inhaltstoffe erlauben sollen. Das Gutachten diskutiert den Stand der Wissenschaft und Technik der Omics-Technologien.

Von dieser Zusammenfassung ausgehend unterbreitet das Gutachten Vorschläge, wie epigenetische Effekte für die Risikobewertung untersucht werden können. Dazu wurden unterschiedliche Experten befragt. Das Guidance Document, das der Gentechnik-Ausschuss der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, EFSA, im Jahre 2004 als Empfehlung für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen herausgegeben hat, stellt dabei das wichtigste Referenzdokument dar.

Die Vorschläge des Gutachtens betreffen den Umfang von Untersuchungen. So wäre es beispielsweise sinnvoll, eine Sequenzierung des Konstruktes (bzw. aller Kopien und Fragmente des Konstruktes) nach der Insertion sowie Untersuchungen, ob aberrante RNA oder Fusionsproteine gebildet werden, vorzuschreiben.

Daneben zeigt das Gutachten eine Reihe von zukünftigen Handlungsfeldern auf. Darunter fällt beispielsweise, dass in der EU keine Mindestanforderungen aufgestellt wurden, welche Methoden für die Untersuchungen an transgenen Pflanzen auf alle Fälle angewendet werden sollten. Hilfreich wäre es insbesondere, wenn die Methoden stärker standardisiert werden, damit beispielsweise Ergebnisse der Risikobewertungen verschiedener GVO-Anträge besser miteinander verglichen werden können.

Darüber hinaus gilt es, die theoretischen Konzepte und Überlegungen, auf die sich die Risikobewertung stützt, einer dauernden kritischen Überprüfung zu unterziehen. Beispiele hierfür sind der Open Reading Frame oder Konzepte darüber, welche Genomabschnitte durch Insertionen eine besondere Störung erfahren. Solche Konzepte sollten durch Experimente abgesichert werden können.

Insbesondere bleibt die Frage, wie Unterschiede zwischen den transgenen Pflanzen und dem Vergleichsobjekt zu bewerten sind, zu diskutieren und zu klären. Dazu gehört auch die offene Frage, welche Pflanzen als Vergleichsobjekt hinzugezogen werden sollten: lediglich die Ausgangslinie oder mehrere konventionell gezüchtete Sorten. Hierbei sollte die Diskussion nicht nur im Ausschuss der EFSA geführt und entschieden werden. Wünschenswert wäre eine breite und offene Diskussion, in der unterschiedliche Experten eingebunden werden.

Summary

The paradigm of a linear "one gene, one protein" sequence that was established in the 1950s after the structure of the DNA was revealed is no longer tenable. Numerous results showed that the genome is far more complex. With regards to transgenic plants, this means that the insertion of a transgenic construct does not only trigger the intended effect. Instead, genetic engineering can entail unintended effects. So far, there is no detailed compilation on what kind and to what extent unintended effects can occur in transgenic plants.

This expertise analysed the scientific literature for epigenetic effects. These are effects that go beyond unintended effects on the genetic level such as multiple insertions, rearrangements, deletion, filler DNA etc. and that are due to epigenetic mechanisms. Epigenetic effects in transgenic plants can be classified in gene silencing, positional effects and pleiotropic effects. Gene silencing is the most often described epigenetic effect; simply because the silencing of the transgene is an important obstacle for a successful transformation. A positional effect is attributable to the place where the gene construct has inserted in the plant genome. It especially influences the stability of the transgene. Generally, the insertion of transgenes does not take place completely randomly but transgenes more often insert into transcribed regions or endogenous plant genes. This means that there is a significant probability of disturbance of plant gene expression. Pleiotropic effects are alterations of morphological or physiological properties. Sometimes, the effects get obvious by alterations of the components. For pleiotropic effects, actually the assessment of whether a detected alteration is relevant or not is controversial.

Especially, the detection of pleiotropic effects is a challenge for the analysis in the risk assessment. The so-called Omics technologies are aimed to detect pleiotropic effects by analysing the whole transcriptom, proteom or metabolom. The state of the art of the Omics technologies are discussed.

Starting from the compilation, the expertise proposes improvements of the current risk assessment. Additionally, several experts were interviewed for their opinion on these proposals. The Guidance Document of the Scientific Panel of the European Food Safety Authority on GMO for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed formed the basis for the proposals because it is now the most relevant guidance for the submission of applications of transgenic plants.

The proposals cover the amount of tests that have to be performed for a risk assessment. For example, the sequencing of the transgenic insert after transformation should become obligatory. A thorough molecular characterisation can indicate to what extent unintended effects might occur. Furthermore, possible aberrant mRNA of the transgenic sequence and flanking sequences should be checked by experiments and should not be dealt with exclusively by assumptions on open reading frames or sequence comparisons.

The expertise also points out open questions such as the lack of standardisation of a minimum requirement of methods. This would also allow a comparison of different risk assessment dossiers. Besides, theoretical concepts and ideas that form the basis of parts of the risk assessment should be continuously peer reviewed. Examples are the open reading frame of the concept on which genomic areas are prone for disturbance. Those concepts should be confirmed by experiments.

Especially, the question remained open how differences between transgenic plants and their comparator should be assessed. It should be discussed and decided publicly and Europe-wide how differences of a transgenic line to the parental line should be assessed and whether they can be embedded into a certain variation. But also the choice of the comparator remains undecided, whether only the parental line or conventional varieties as well should be included in the comparison. This discussion should be hold in a broad and open manner and should involve a wide spectrum of experts.

1. Einleitung

1.1 Problemstellung

Nachdem in den fünfziger Jahren die Struktur der DNA aufgeklärt wurde, etablierte sich in der Molekularbiologie das Ein-Gen-Ein-Protein-Paradigma. Es besagt, dass der Informationsfluss linear ist und ausschließlich vom Gen zum Protein erfolgt und zumeist *einen* definierten Effekt auslöst. Insofern kann man diese Lehrmeinung auch als das Paradigma des genetischen Determinismus beschreiben.

Spätestens nach der Entschlüsselung des menschlichen Genoms konnte dieses Paradigma nicht mehr aufrecht gehalten werden. Eines der grundlegenden Ergebnisse des Human Genom Projektes war, dass die meisten Gene für mehr als ein Protein kodieren: Zwischen 25.000 und 30.000 Gene müssen für mehr als ein Vielfaches an Proteinen (etwa 500.000) kodieren (Venter et al. 2001). Zudem kam die Entschlüsselung des Genoms verschiedener Mikroorganismen und einiger Pflanzen und Tiere zu dem Ergebnis, dass die DNA-Sequenz des Menschen zu 50 % mit der DNA-Sequenz von Reis, zu 47 % mit der der Fruchtfliege und zu 15 % mit der DNA-Sequenz von Bäckerhefe übereinstimmt. Vor allem enthalten die Genome generell weniger Gene, als die große Anzahl an gebildeten Proteinen in den jeweiligen Organismen nach dem alten Paradigma erwarten ließ. Das heißt, dass die Regulierung des Genoms wesentlich komplexer ist, als dies das Paradigma „Ein-Gen-Ein-Protein“ annimmt und dass die eigentliche Komplexität der Genome auf der Ebene der Regulation liegen muss.

Viele Wissenschaftler haben in den letzten Jahren das Ende des deterministischen und reduktionistischen Paradigmas erklärt. In der Veröffentlichung eines ersten Entwurfes des menschlichen Genoms, der statt der geschätzten mehr als 100.000 Gene weniger als 30.000 Gene enthält, erklärten Venter et al. (2001) die Grenzen der Genetik für erreicht. Strohmann (2001) äußerte in diesem Zusammenhang, dass das Buch des Lebens, wie die DNA bisweilen genannte wurde, eher mit einer zufälligen Ansammlung von Worten vergleichbar sei. Diese könnten in unterschiedlichster Weise zusammengesetzt werden und ergäben nur mit Hilfe eines zweiten Informationssystems eine sinnvolle Geschichte.

Das alte Paradigma des genetischen Determinismus ist allerdings an vielen Stellen noch nicht durch ein anderes Denken ersetzt worden, Wie ein solches aussehen mag, ist noch offen (Tappeser & Hoffmann 2004). Im Grunde sollte es aber nicht zwingend das Ziel sein, ein neues Paradigma zu erstellen. Vielmehr könnten offene und vielfältige Denkmuster in Zukunft vermeiden, dass trotz besseren Wissens an alten Annahmen festgehalten wird, wie dies in der Biologie immer noch zu beobachten ist.

Bezogen auf gentechnische Arbeiten bedeuten die Erkenntnisse aus den Genomentschlüsselungen, dass durch das Einbringen von Genkonstrukten in ein vorhandenes Genom eines Organismus nicht nur die gewünschte Veränderung

herbeigeführt wird, sondern dass damit auch in genregulatorische Vorgänge und Strukturen eingegriffen wird, was zu unbeabsichtigten Effekten führen kann.

Derartige neue Erkenntnisse müssen auch Eingang in die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) finden. Nach dem gültigen Recht soll die Risikobewertung dem aktuellen Erkenntnisgewinn entsprechend fortgeschrieben werden. So besagt Artikel 27 der Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG, dass zum Verfahren der Freisetzung eine Anpassung an den technischen Fortschritt in folgenden Punkten erfolgen soll: in der Methodik der Umweltverträglichkeitsprüfung, bezüglich der Informationen, die in der Anmeldung für die Freisetzung von GMO enthalten sein müssen und hinsichtlich der Erstellung des Überwachungsplanes. Die Verordnung 1829/2003/EG weist im Erwägungsgrund (37) allgemein darauf hin, dass der technologische Fortschritt und wissenschaftliche Entwicklungen bei der Durchführung der Verordnung berücksichtigt werden sollten.

Während die Freisetzungsrichtlinien 90/220/EWG und 2001/18/EG zu unbeabsichtigten Effekten der gentechnischen Veränderung, die relevant für die Umwelt sein könnten, nur eingeschränkt Aussagen machen¹, weist die neuere europäische Gentechnikgesetzgebung ausdrücklich darauf hin, dass eine Risikobewertung von GMO auch unbeabsichtigte Effekte einbeziehen muss. Da für die Ursachen unbeabsichtigter Effekte die Komplexität der Genomregulation sehr relevant ist, muss diese bei der Risikobewertung folglich auch berücksichtigt werden. Konkret erwähnen die Leitlinien zur Ergänzung des Anhangs II der Freisetzungsrichtlinie (623/2002/EG), dass „die Methode zur Herstellung der Transgene und die Stelle des Einbaus der Transgene in das Genom des GMO zu weiteren schädlichen Auswirkungen, beispielsweise zu pleiotropen Auswirkungen, führen [könnte]. Werden zwei oder mehrere Transgene in einen Empfänger übertragen oder wird ein Transgen in einen GMO eingeführt, sind mögliche Wechselwirkungen der verschiedenen Transgene auch im Hinblick auf möglicherweise epigenetische Auswirkungen oder Auswirkungen auf die Steuerungsprozesse zu betrachten.“² Die Formulierung ist an dieser Stelle etwas ungenau, und das Konzept wird auch nicht weiter ausgeführt.

Die Anleitung des wissenschaftlichen Ausschusses der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, EFSA, für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA 2004)³ stellt zwei Jahre später

¹ In den Freisetzungsrichtlinien kommt der Begriff „unexpected traits“ vor, wird aber in einem beschränkten Zusammenhang verwendet: Die „alte“ Freisetzungsrichtlinie 90/220/EWG beschreibt im Anhang II zum Abschnitt IV. „Informationen über die Wechselwirkungen zwischen dem GMO und der Umwelt“, dass die Wahrscheinlichkeit einer Selektion nach der Freisetzung, die zur Ausprägung unerwarteter und/oder unerwünschter Merkmale bei dem veränderten Organismus führt, zu beachten sei. Dieselbe Formulierung wurde auch in der „neuen“ Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG aufgenommen, allerdings nur für die Anmeldung gentechnisch veränderter Organismen mit Ausnahme höherer Pflanzen. Mit solchen unerwarteten Effekten ist somit vor allem ein Fitnessvorteil gemeint, der unter bestimmten Umweltbedingungen auftritt.

² 2002/623/EG, L 200/27.

³ Der Titel des Dokuments lautet „Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed.“ Auch wenn das Dokument von dem wissenschaftlichen Ausschuss der EFSA stammt und die EFSA dafür in letzter Zeit nicht die Verantwortung übernehmen möchte, wird im im folgenden auch der Kürze halber auf das Guidance Document der EFSA (2004) Bezug genommen.

die Möglichkeiten der unbeabsichtigten Effekte sehr allgemein dar. Danach ist alles, was über das eingeführte Genkonstrukt und dessen Produkte, bzw. dessen Primäreffekte hinausgeht, als unbeabsichtigter Effekt zu verstehen.⁴ Mit unbeabsichtigten Effekten können also unterschiedlichste Beobachtungen gemeint sein, die unterschiedlichste Auswirkungen auf die Umwelt und die menschliche Gesundheit haben können.

In den Zusammenfassungen der Zulassungsdossiers (SNIFs = Summary Notifications) wird meistens der Begriff des unerwarteten Effekts („unexpected effects“) verwendet.⁵ Im Englischen wird teilweise auch der Begriff „unanticipated effects“ = unerwartete / unvorhergesehene Effekte verwendet. Auch im Deutschen wird häufig der Begriff „unerwartete Effekte“ verwendet. Unerwartet (unexpected / unanticipated) hat allerdings eine weiterreichende Bedeutung als unbeabsichtigt (unintended) und impliziert, dass solche Effekte eigentlich gar nicht untersucht werden können. Für unbeabsichtigte Effekte hingegen, also alle Effekte außer dem beabsichtigten Effekt, lassen sich durchaus Konzepte für eine Überprüfung erstellen.

Bislang gibt es keine detaillierte Zusammenstellung und Darstellung der verschiedenen Ursachen unbeabsichtigter Effekte bei gentechnischer Veränderung in Pflanzen. Darüber hinaus werden solche Effekte sehr unterschiedlich bewertet. Auch im praktischen Vollzug werden unbeabsichtigte Effekte nur begrenzt und ohne erkennbares Konzept berücksichtigt.

Das vorliegende Gutachten soll einen Beitrag dafür leisten, unbeabsichtigte Effekte bei transgenen Pflanzen darzustellen und die Einteilung in epigenetische Effekte, Positionseffekte und pleiotrope Effekte zu klären. Das Gutachten will die Ergebnisse unbeabsichtigter Effekte analysieren, um einen Beitrag dazu zu leisten, in der Risikobewertung transgener Pflanzen differenzierter damit umzugehen.

1.2 Vorgehen

Im ersten Teil des Gutachtens wird auf Basis von Literaturrecherchen die Begrifflichkeiten zu epigenetischen Veränderungen und unbeabsichtigten Effekten bei transgenen Pflanzen geklärt.

Im zweiten Teil des Gutachtens wird dargestellt, welche Ergebnisse zu unbeabsichtigten Effekten bisher bei transgenen Pflanzen in wissenschaftlichen Fachzeitschriften veröffentlicht wurden, und ergänzt durch Informationen, die durch eine allgemeine Internetrecherche gewonnen wurden.

⁴ Seite 13 f: “Unintended effects are considered to be consistent differences between the GM plant and its appropriate control lines, which go beyond the primary expected effect(s) of introducing the target gene(s). Unintended effect(s) could potentially be linked to genetic rearrangements or metabolic perturbations. They may be evident in the phenotype or composition of the GM plant when grown under the same conditions as the controls. Unintended effects may be predicted or explained in terms of our current knowledge of plant biology and metabolic pathway integration and interconnectivities.”

⁵ http://gmoinfo.jrc.it/gmc_browse.asp.

Gegenstand der recherchierten Arbeiten war die Stabilität der inserierten DNA-Sequenzen, Umordnungen und Rekombinationen, sowie deren Auswirkungen auf Regel- und Stoffwechselkreisläufe und letztendlich auf Inhaltsstoffe, Morphologie und Fitness der transgenen Pflanzen. Besonderes Augenmerk wurde auf Ergebnisse gelegt, die unter dem Begriff der pleiotropen Effekte bei transgenen Pflanzen zusammengefasst werden. Die Auswertung wurde auf transgene Pflanzen zur Lebens- oder Futtermittelverwendung beschränkt. Transgene Pflanzen, die Pharmazeutika produzieren sollen, wurden bei den Recherchen nicht berücksichtigt.

Auf der Grundlage der Literaturrecherche werden die Auswirkungen epigenetischer Effekte bei transgenen Pflanzen auf Natur und Umwelt sowie die menschliche Gesundheit dargestellt und Empfehlungen, wie epigenetische und pleiotrope Effekte künftig geprüft und bei der Risikobewertung berücksichtigt werden können, erarbeitet. Dabei wurde das Guidance Document der EFSA (2004) als Referenz verwendet. Die Empfehlungen der EFSA werden diskutiert und Ergänzungen vorgeschlagen.

Die Ergebnisse und Empfehlungen des Gutachtens wurden mit fünf Experten diskutiert, damit sowohl konsensuale Elemente als auch divergierende Meinungen der wissenschaftlichen Gemeinschaft hinsichtlich der Bewertung epigenetischer Effekte in transgenen Pflanzen deutlich werden. Dazu wurde mit den Experten ein Leitfragen gestütztes Interview durchgeführt.

2. Epigenetik und epigenetische Effekte, Begriffe und Erklärungen

In der Diskussion darum, was an Stelle des Paradigmas vom genetischen Determinismus treten kann, schlugen verschiedene Wissenschaftler die Epigenetik vor. Venter et al. (2001) zogen in ihrer Veröffentlichung eines ersten Entwurfes des menschlichen Genoms den Schluss, dass aufgrund der wenigen Gene, die gefunden wurden, die Genregulation offensichtlich nicht-linear ist. Die Epigenetik als über (= epi) der Genetik stehend, müsse helfen, die Nicht-Linearität der Genregulation aufzuklären.

In der Biologie verwendete als erster Waddington (1942) den Begriff der Epigenetik. Waddington (1942) beschrieb damit den Prozess, durch den ein Genotyp sich zum Phänotyp ausprägt. Nach Haig (2004) sind vor allem Morphologen mit dieser Definition von Epigenetik vertraut. Molekularbiologen hingegen werden eher mit den folgenden Definitionen vertraut sein: Epigenetische Effekte sind Änderungen in der Morphologie oder in der Physiologie, die auftreten, ohne dass dabei eine Änderung in kodierenden Sequenzen oder im Promotorbereich stattgefunden hat (Rapp & Wendel 2005). Für Russo et al. (1996) ist zusätzlich der Aspekt der Weitergabe der Änderungen wichtig: Danach ist Epigenetik das Studium von Effekten, die mitotisch und/oder meiotisch vererbbar sind und nicht auf eine Änderung der DNA zurückgeführt werden können (Russo et al. 1996). Nach Meins & Binns (1979) sind epigenetische Änderungen stabile, potentiell reversible Änderungen in der Genexpression. Solche Vorgänge führen zur Aktivierung (oder Inaktivierung) eines Gens, setzen einen zellulären Prozess in Gang und können schließlich zur Ausbildung eines bestimmten Phänotyps führen und die ökologischen Eigenschaften eines Organismus verändern. Derlei Definitionen von Epigenetik beziehen sich zunächst auf Änderungen, die direkt die Genexpression beeinflussen, wie die Methylierung der DNA oder die Modifikation von DNA-assoziierten Proteinen. Es gibt allerdings noch zahlreiche andere Faktoren im epigenetischen System, beispielsweise sich eigenständig vermehrende Proteine oder Proteinsequenzen, die unterschiedlich gefaltet, sich jeweils anders verhalten (Grant-Downton & Dickinson 2005). Strohmam (2001) fasste unter den Begriff Epigenese das sich selbst steuernde komplexe Regulationsnetzwerk zusammen, in welchem die Auswahl, das An- oder Abschalten und das Ausmaß des Ablesens von Genen durch das Zusammenschalten/Vernetzen von Signalen, die „von außen kommen“, mitbestimmt wird. Insgesamt besteht allerdings keine Einigkeit unter zeitgenössischen Biologen über die genaue Definition von Epigenetik (Jablonka & Lamb 1999).

Epigenetische Effekte spielen bei der Entwicklung und beim Wachstum der Pflanzen eine entscheidende Rolle (Steimer et al. 2004). Zwar ist generell die epigenetische Kontrolle der Genexpression für die Entwicklung eines Organismus von großer Bedeutung, da viele Gene nur zu bestimmten Zeitpunkten in einem spezifischen Zelltyp aktiv sein dürfen und ansonsten stabil unterdrückt werden müssen (Stichwort differentielle Genaktivität). Bei Pflanzen kommt epigenetischen Effekten allerdings eine besondere Bedeutung zu, weil allgemein angenommen wird, dass das pflanzliche

Genom plastischer ist als das tierische. Auch die Anpassung von Pflanzen an wechselnde Umweltbedingungen funktioniert über epigenetische Änderungen (Grant-Downton & Dickinson 2006).

Außerdem sind Pflanzen zur Weitergabe von erworbenen Eigenschaften besonders befähigt. Pflanzen besitzen nämlich kein gesondertes Keimzellenmeristem. Vielmehr teilen sich die Keimzellen immer wieder aus einer Gruppe undifferenzierter Zellen ab (Weigel & Jürgens 2002). Durch diese späte Differenzierung zwischen somatischen Zellen und Keimbahnzellen⁶ ist es den Pflanzen möglich, erworbene Eigenschaften über epigenetische Effekte oder Mutationen weiterzugeben (Reyes et al. 2002). Bisher sind allerdings nur wenige Fälle nachgewiesen und dokumentiert, in denen Pflanzen Anpassungen, die sie im Laufe ihres Wachstums erlebt haben, etwa nach Krankheiten oder Mangelzuständen, als erworbene Eigenschaften an die Nachkommen weiter geben (Grant-Downton & Dickinson 2006).

2.1 Chromatinstruktur und ihr Einfluss

Im Zellkern wird die DNA durch Histon-Proteine zu einem hochkondensierten Komplex⁷, dem Chromatin, verpackt. Durch die Chromatinstruktur wird bestimmt, welche Genomabschnitte transkribiert, das heißt abgelesen werden können (Jenuwein & Allis 2001). Nur eine bestimmte Chromatinstruktur ermöglicht den transkribierenden RNA-Polymerasen den Zugang zur DNA. Änderungen der Chromatinstruktur beeinflussen auch die synergistische oder antagonistische Interaktion des Chromatins mit Chromatin-bindenden Proteinen (Jenuwein & Allis 2001, Pennisi 2001). Eine Änderung der Chromatinstruktur wird durch chemische Modifikation der Histon-Proteine erreicht, insbesondere durch Methylierung und Acetylierung. In der Literatur ist auch die Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Histonen beschrieben, wobei deren Rolle und Regulation noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Die Modifizierungen der Histone wirken genregulatorisch und damit epigenetisch. Außerdem stehen sie miteinander in Wechselwirkung, wobei die Einzelheiten der Interaktionen noch größtenteils unklar sind (Rapp & Wendel 2005). Die Abfolge der modifizierten Histone wird „Histone-Code“ genannt.

⁶ Bei Tieren hingegen werden die Keimzellen in der frühen Embryogenese gebildet.

⁷ In eukaryotischen Zellen ist die DNA im Zellkern durch Proteine zu einem hochkondensierten Komplex verpackt, dem Chromatin. Hauptbestandteil des Chromatins auf Proteinebene sind die Histone (H1, H2A, H2B, H3 und H4). Histone schließen sich mit chromosomaler DNA zu Nukleosomen zusammen, der kleinsten Struktureinheit des Chromatins. Nukleosomen bestehen aus einem Oktamer, das jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 enthält, und circa 146 Basenpaare DNA, die zweimal um das Oktamer gewickelt werden.

Im Transmissionselektronenmikroskop sind bei der Chromatinstruktur das Euchromatin und das Heterochromatin unterscheidbar. Das Euchromatin zeichnet sich durch eine hellere, lockere Struktur aus und findet sich größtenteils auf den Chromosomenarmen, wo auch die Gen-reichen Regionen liegen. Das Heterochromatin, eine hochkondensierte Chromatinstruktur, findet sich besonders nahe der Centromere im Bereich der hoch repetitiven DNA-Sequenzen. Es gibt aber auch „funktionelles“ Heterochromatin, in bestimmten Zellen oder Geweben, in denen bestimmte Genbereiche still gelegt sind.

Eine wichtige Eigenschaft Chromatin-bindender Proteine, besonders der sogenannten Polycomb- oder Thiritorax-Proteine, ist, dass sie zum zellulären Gedächtnis von Pflanzen gehören (Köhler & Grossniklaus 2002).

Während in Tieren die Chromatinstruktur früh in der Entwicklung festgelegt wird, findet in Pflanzen eine ständige Änderung der Chromatinstruktur durch Regulatoren statt. Diese Änderungen sind für die phänotypische Plastizität der Pflanzen verantwortlich (Wagner 2003). Mutationen, die die Chromatinstruktur verändern, haben in der Regel subtile, komplexe und pleiotrope Effekte, so dass sie schwer zu identifizieren sind (Reyes et al. 2002). Die Rolle des Chromatins in der Entwicklung ist noch nicht abschließend geklärt.

2.2 Methylierung und Imprinting in Pflanzen

Von den vier in der DNA vorkommenden Basen kann das Cytosin an seinem 5. Kohlenstoffatom methyliert werden. Eine Methylierung der Cytosine beeinflusst die Transkription, also das Ablesen der DNA und die Synthese der Boten RNA (mRNA). In Pflanzen werden CG-Sequenzen⁸, aber auch CXG-Sequenzen methyliert. CG-Inseln sind häufig mit Genen assoziiert. Am häufigsten sind sie in den Promotorsequenzen zu finden (Jones & Takai 2001). Die Methylierung der Cytosine verändert die Chromatinstruktur (Matzke & Matzke 1998) und ist so entscheidend an der (transkriptionellen) Stilllegung von Genen, dem Gene Silencing, beteiligt. Der Begriff Imprinting beschreibt die genomweite Methylierung, die von der elterlichen Abstammung bestimmt wird. Während bei Tieren das Imprinting in der frühen Embryogenese festgelegt wird, ist die Methylierung bei Pflanzen flexibler (Alleman & Doctor 2000).

Nach Rapp & Wendel (2005) hat die Methylierung von Cytosinen mutagenes Potential, da das methylierte Cytosin mit hoher Rate spontan zu Thymin deaminiert.

2.3 RNA-Interferenz

Der Begriff RNA-Interferenz beschreibt die regulatorische Wirkung von RNA-Molekülen, insbesondere solcher, deren Funktionen noch nicht vollständig erforscht sind. Nicht kodierende (= non coding) RNA (ncRNA) mit einer Länge von 20 bis 28 Nucleotiden haben sich in letzter Zeit als entscheidender epigenetischer Regulator der Genexpression erwiesen. Sie spielen allgemein eine Rolle bei der Transkriptionskontrolle und besonders beim Gene Silencing. Somit sind sie wesentlich an der Entwicklung und der Reaktion auf Umwelteinflüsse und Stress beteiligt. In Pflanzen können mindestens zwei Kategorien der kleinen RNA unterschieden werden, nämlich siRNA und miRNA (Baulcombe 2004; Mallory & Vaucheret 2004; Meister & Tuschl 2004; Pickford & Cogoni 2003; Tijstermann et al. 2002).

⁸ Wiederholungen der Basen Cytosin und Guanin.

Kurze interferierende (= short interfering) RNA (siRNA) können aus Viren, Transgenen oder Transposons stammen, generell also aus Sequenzen oder Genen, die bidirektional (in beide Leserichtungen) transkribiert werden (Matzke & Birchler 2005). Besondere Erwähnung fanden kurze interferierende RNA, die durch Wiederholungssequenzen entstehen (= repeat associated short interfering RNA, rasiRNA). siRNA vermitteln einen Abbau der mRNA, sie können aber auch auf die Chromatinstruktur einwirken und post-transkriptionelles Gene Silencing auslösen. Dies ist ein Vorgang über mehrere Schritte, der eine Bindung der siRNA und eines hochmolekularen, den Abbauprozess katalysierenden Enzyms, dem „RNA-Inducing Silencing-Complex“-Protein (RISC), voraussetzt. Durch die Bindung aktiviert, erkennt das RISC die Ziel-mRNA, die anschließend gespalten wird (Reynolds et al. 2004). Neben dem RISC-Komplex spielen auch RNA-abhängige RNA-Polymerasen eine Rolle im post-transkriptionellen Gene Silencing. Indem sie doppelsträngige RNA aus kleinen RNA Stücken synthetisieren, verstärken sie den Prozess der siRNA vermittelten RNA-Interferenz enorm.

Einzelsträngige micro RNA (miRNA) mit einer Länge von 20 bis 22 Nukleotiden stammen aus Genomabschnitten, die zwischen zwei Genen liegen, und nicht für Proteine kodieren. Die entsprechenden DNA-Abschnitte werden transkribiert, bilden imperfekte RNA-Haarnadeln und werden daher in miRNA gespalten (Matzke & Birchler 2005).

miRNA wirken auf verschiedenen Ebenen der Genregulation. Vor allem wirken sie auf der Ebene der Translation, indem sie die Umsetzung der mRNA in die Aminosäureabfolge und letztendlich das Protein unterdrücken und einen Abbau der mRNA bewirken. Sie können aber auch auf die DNA einwirken und die Transkription unterdrücken. Das geschieht, indem kleine, etwa 21 bis 24 Nukleotide lange RNA-Moleküle, die homolog zu Promotorregionen sind, deren Methylierung auslösen. Der Methylierungseffekt breitet sich nicht auf benachbarte Sequenzen aus. miRNA können aber auch die Modifikation von Histonen und eine Änderung des Heterochromatins bewirken (Matzke & Birchler 2005). In Pflanzen scheinen miRNA zu überwiegen, die die Spaltung und den Abbau von mRNA verursachen (Llave et al. 2002). miRNA binden sehr spezifisch an die mRNA und beeinflussen damit nur bestimmte mRNA-Moleküle (Schwab et al. 2005).

miRNA treten zeitlich und räumlich sehr spezifisch auf (Mallory & Vaucheret 2004; Baulcombe 2004), das heißt sie kommen jeweils nur in bestimmten Geweben und in bestimmten Entwicklungsphasen vor. miRNA spielen damit eine wichtige Rolle in der Entwicklung (Palatnik et al. 2003; Rhoades et al. 2002).

Andere kleine RNA-Moleküle erfüllen eine Reihe weiterer Funktionen, zum Beispiel sind sie am Spleißvorgang (= splicing) beteiligt, also der Bearbeitung des primären mRNA-Transkripts. Bei höheren Organismen liegt die Information für ein Protein auf der DNA oft als ein Strang vor, der aus kodierenden (= Exons) und nicht-kodierenden (= Introns) Abschnitten zusammengesetzt ist. Das erfordert einerseits, dass aus dem primären mRNA-Transkript die nicht-kodierenden Abschnitte herausgeschnitten

werden und eröffnet andererseits über alternatives Spleißen die Möglichkeit, dass aus einer mRNA unterschiedliche Proteine gebildet werden. Das Spleißen ist ein wichtiger Vorgang, der das Ineinander-Schachteln von Genen erlaubt und eine wichtige Ergänzung zur vermeintlich fehlenden Komplexität auf der DNA-Ebene darstellt. Spleißen ist bei höheren Organismen weit verbreitet: Mehr als die Hälfte der menschlichen Gene sollen alternativ gespleißt werden (Sharp 2005). Nach Johnson et al. (2003) werden sogar 75 % der menschlichen Gene alternativ gespleißt. Bei Vertebraten sollen durchschnittlich fünf verschiedene Transkripte aus einem Gen entstehen. Dabei sollen den verschiedenen gespleißten mRNA-Formen teilweise wichtige Funktionen zukommen, die aber selten genauer untersucht wurden (Sharp 2005). Alternatives Spleißen und seine Regulation sind also ein Thema, das noch längst nicht abschließend bearbeitet ist und zu dem die EU das Forschungsnetzwerk EURASNET (European Alternative Splicing Network) eingerichtet hat.

Neben den wichtigen Regulationsfunktionen durch RNA-Interferenz, können RNA-Moleküle auch Informationen speichern. So wurde bei bestimmten Mutanten von *Arabidopsis thaliana* eine nicht-Mendel'sche Vererbung festgestellt, die auf einer extragenomische Informationsspeicherung und -übertragung durch RNA-Moleküle beruht. Ein solcher RNA-Speicher muss nicht in den Eltern ausgeprägt vorliegen, d.h. tatsächlich genutzt werden, sondern kann von vorherigen Generationen stammen und mitvererbt worden sein. Er kann dann in späteren Generationen und unvorhergesehen auf die DNA einwirken (Lolle et al. 2005).

2.4 Positionseffekte

Die Expression eines Gens hängt nicht nur von den unmittelbar mit ihm verbundenen regulatorischen Elementen ab, wie dem Promotor oder Enhancer, sondern auch von seiner Lage bzw. Position im Genom. Ein Gen besetzt im Genom in der Regel einen distinkten physikalischen Abschnitt.

Das Genom ist in spezifische Domänen aufgebaut. Es gibt Gen-reiche Bereiche, Euchromatin, und Gen-ärmere Bereiche, Heterochromatin. Früher galt Heterochromatin im Vergleich zu Euchromatin als genetisch völlig inaktiv, inzwischen wurden dort ebenfalls transkriptionell aktive Bereiche entdeckt (Dimitri et al. 2005).

Im Zellkern sind die Chromosomen räumlich so angeordnet, dass sich nicht-kodierende DNA und repetitive Elemente vorwiegend im Inneren befinden, während die kodierende DNA an der Peripherie liegt. Die Lage bzw. Ausrichtung der Chromosomen im Zellkern ist insgesamt noch wenig verstanden, sie scheint aber einen wichtigen Einfluss auf die Expression zu haben (Taddei et al. 2004).

Weiterhin gibt es spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte Scaffold- oder Matrix-Attachement Regionen (S / MAR). Sie können zwischen 300 bp und mehreren Kilobasenpaaren lang sein, kommen in allen Eukaryoten vor und binden an die nukleäre Matrix, einem Netzwerk aus Proteinfasern, die den Zellkern durchziehen (Allen et al. 2000). Die S / MARs kommen häufig in Chromatin-Abschnitten vor, die

Merkmale für Genfunktionen aufweisen. S / MAR werden zudem als in cis-agierende⁹ Elemente gesehen, die außerhalb der transkribierten Regionen und innerhalb von Introns gefunden werden. Unter bestimmten Umständen erhöhen sie die Transkription (Rudd et al. 2004), was bedeutet, dass die Höhe der Genexpression nicht allein vom lokalen Promotor und Enhancer abhängen kann. Die Bindung der Matrix- und Scaffold-Attachment Regionen an die nukleäre Matrix kann durch Modulatoren und Interaktionen mit Enhancern und lokalen Kontrollregionen verändert werden (Bode et al. 2003).

Abgesehen vom Einfluss auf die Expression ist nach Copenhaver et al. (1998) die physikalische Position eines Gens im Genom auch deshalb wichtig, weil es auf den Chromosomen Orte mit hohem und niedrigem Rekombinationspotential gibt („hot and cold spots“).

2.5 Pleiotrope Effekte

Unter Pleiotropie versteht man das Phänomen, dass ein Gen zwei oder mehrere voneinander unabhängige Merkmale beeinflussen kann (IUPAC 1997). Ein Beispiel hierfür ist der Transkriptionsfaktor 2 in *Arabidopsis thaliana*, der durch Auxin reguliert wird und die Transkription unterschiedlicher Gene aktiviert oder unterdrückt (Okushima et al. 2005).

Ein pleiotroper Effekt liegt demnach vor, wenn sich eine Mutation in einem Gen auf mehrere voneinander unabhängige Merkmale auswirkt. Der Begriff wird recht allgemein verwendet und das eigentliche Phänomen ist nur unzureichend verstanden.

Ergänzend zu der allgemeinen Definition und Verwendung des Pleiotropiebegriffs beschreibt Burian (2004) die Möglichkeit einer molekularen Pleiotropie, bei der aus einem Gen mehrere Proteine mit unterschiedlichen Funktionen hervorgehen. Interne zelluläre und externe (Umwelt-) Einflüsse entscheiden hierbei, welche Funktion das Gen schlussendlich ausübt.

2.6 Unterschiede zwischen Tieren und Pflanzen

Nach unserem bisherigen Wissensstand und Verständnis unterscheiden sich die Genome von Pflanzen und Tieren nicht grundsätzlich voneinander, sondern sind in Bezug auf die Anzahl der Gene, die genetische Diversität und Komplexität relativ ähnlich. Zwischen der Genomgröße und der Komplexität eines Organismus besteht kein direkter Zusammenhang.

Pflanzliche Genome sind in der Regel größer als tierische Genome. Die Größe pflanzlicher Genome variiert stark, bei Angiospermen zum Beispiel um den Faktor 2000 (Stöcklin 2004). Die größeren Genome von Pflanzen sind auch darauf zurückzuführen, dass bei Pflanzen vermehrt Polyploidie oder Genomduplikationen

⁹ Eine cis-Wirkung liegt dann vor, wenn ein DNA-Abschnitt lediglich auf andere Abschnitte einwirkt, die auf dem gleichen DNA-Molekül liegen; cis-Wirkungen gehen zum Beispiel von Promotoren aus.

auftreten (Soltis 2005). Mehr als 70 % der Blütenpflanzen weisen eine oder mehrere Episoden einer Chromosomenverdoppelung oder Genduplikation auf (Masterson 1994), was die besondere Flexibilität pflanzlicher gegenüber tierischer Genome verdeutlicht.¹⁰

Im Allgemeinen weisen pflanzliche Genome mehr Wiederholungssequenzen (repetitive Sequenzen) sowie mobile genetische Elemente, sogenannte Transposons, auf (Kumar & Bennetzen 1999).¹¹ Pflanzen unterscheiden sich von Tieren zudem in der Chromatinstruktur.

Auch die Regulationsmechanismen der Genexpression können in Pflanzen sehr flexibel reagieren, was sich an der Vielzahl an Transkriptionsfaktoren und dem veränderbaren Histone-Code in Pflanzen zeigt, Dies macht die hohe Anpassungsfähigkeit von Pflanzen aus und ermöglicht ihre Existenz als sessile, ortsggebundene Organismen, die auf wechselnde Umweltbedingungen reagieren müssen. Auch die phänotypische Plastizität¹² der Pflanzen weist darauf hin, dass besonders in den Regulationsmechanismen der Genexpression Unterschiede zu Tieren zu suchen sind und verweist darauf, dass die pflanzliche Genregulation und Entwicklung in besonderem Maße durch Einflüsse von außen mitgesteuert werden können.

Dem eher graduellen Unterschied auf genetischer Ebene zwischen Pflanzen und Tieren stehen allerdings grundlegend unterschiedliche Organisationsformen gegenüber. Die Hauptunterschiede der Organisationsform sind in Tabelle 1 nach Stöcklin (2004) zusammengefasst.

Tabelle 1: Unterschiede zwischen Tier und Pflanze auf der Organisationsebene, nach Stöcklin (2004)

PFLANZE	TIER
Autotroph	Heterotroph
Modularer Aufbau	Unitärer Aufbau
Hohe Regenerationsfähigkeit → totipotente Zellen	Begrenzte Regenerationsfähigkeit
Maximale äußere Oberfläche	Maximale innere Oberfläche
Sessilität	Beweglichkeit; rasche Reaktionsfähigkeit
Metapopulation von Teilen	Individuum

¹⁰ Die Vorteile von Polyploidie oder Genduplikationen werden mit dem Vorteil eines permanenten Hybridstatus und der Heterozygotie beschrieben. Polyploidie kann einen Allel-Dosis Effekt bewirken, denn gerade bei quantitativen Merkmalen kann gelten: Je mehr Allele desto höher die Genexpression. Eine solche Addition wird auch als Erklärung für den Heterosis-Effekt angenommen (Osborn et al. 2003).

¹¹ Allerdings werden Transposons beispielsweise in Mais schon seit 30 Jahren untersucht. Im Zuge der Entschlüsselung des menschlichen Genoms wurde festgestellt, dass Transposons auch hier einen großen Teil des Genoms ausmachen. Diese Transposons sind allerdings still gelegt (Meins pers. Mitteilung 2004).

¹² Phänotypische Plastizität bezeichnet die Fähigkeit eines Organismus, auf Reize seiner Umwelt mit einer Veränderung des Phänotyps zu reagieren (nach Stöcklin 2004), das heißt, dass ein bestimmter Genotyp unterschiedliche Phänotypen in Abhängigkeit von wechselnden Umweltbedingungen ausbilden kann.

3. Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen

Das vorliegende Gutachten bezieht sich auf die Definition von Epigenetik nach Waddington (1942), der unter Epigenetik den Prozess verstand, wie ein bestimmter Genotyp zu einem möglichen Phänotyp gelangt. Das bedeutet, dass in transgenen Pflanzen alle Effekte - außer dem gewünschten Effekt – als epigenetische Effekte verstanden werden können.

Einigen der für dieses Gutachten befragten Experten war es sehr wichtig zu betonen, dass epigenetische Effekte nicht nur in (transgenen) Pflanzen, sondern generell in allen Organismen auftreten. Allerdings ist die epigenetische Pflanzenforschung deutlich weniger ausgeprägt als jene in der Humanmedizin (Freitag 2005). Das bedeutet alles in allem, dass epigenetische Effekte in Pflanzen weniger untersucht sind.

Prinzipiell stellen transgene Pflanzen eine gute Möglichkeit dar, die skizzierte Komplexität der Genregulation näher zu untersuchen und das Wissen darüber zu erweitern. Eine systematische Erforschung unbeabsichtigter Effekte und ihrer Grundlagen gibt es allerdings noch nicht. Die Fragestellungen der publizierten Untersuchungen sind meistens sehr eng gefasst und lassen keine Analyse der unbeabsichtigten Effekte zu. Es werden überwiegend nur Angaben und Daten zu den gelungenen Versuchen und den erwünschten Veränderungen veröffentlicht. Bisweilen werden unbeabsichtigte Effekte erwähnt, eine systematische oder weitere Untersuchung wird aber nicht vorgenommen, obschon, zum Beispiel auf Tagungen und Workshops, die Ansicht geäußert wird, dass hier eine Fülle wertvoller Informationen verborgen liegt.

Der erste epigenetische Effekt, der bei einer transgenen Pflanze beobachtet wurde, war das Gene Silencing, also die Stilllegung eines Gens.¹³ Bei transgenen Petunien wurde das eingeführte Chalcone-Synthase-Gen, das eine lachsrote Färbung der Blüten bewirkte, stillgelegt und nicht exprimiert. Zusätzlich wurden auch identische endogene Sequenzen stillgelegt (Napoli et al. 1990).

Andere epigenetische Effekte neben dem Gene Silencing, die morphologische oder physiologische Veränderungen darstellen, werden meist als pleiotrope Effekte bezeichnet. Eine systematische Übersicht zu pleiotropen Effekten in transgenen Pflanzen gibt es bisher nicht. Auch in diesem Gutachten kann dieses Thema nicht abschließend behandelt werden.

3.1 Gene Silencing

Gene Silencing ist der am meisten untersuchte epigenetische Effekt in transgenen Pflanzen. Der Grund dafür ist schlicht, dass eine instabile Transgenexpression einem kommerziellen Erfolg der transgenen Pflanze im Wege steht. Das Silencing des

¹³ Das Phänomen des Gene Silencing wurde an transgenen Pflanzen entdeckt. Später wurde herausgefunden, dass es auch in nicht-transgenen Pflanzen als Abwehrmechanismus gegen Pflanzenviren auftritt (Waterhouse et al. 2001).

Transgens lässt sich zudem einfach feststellen, nämlich darüber, ob und wie die gewünschte Eigenschaft ausgeprägt wird. Bei der Herstellung der transgenen Pflanzen werden meistens einfach nachweisbare Eigenschaften, wie Antibiotika- oder Herbizidresistenz, oder die Fähigkeit, bestimmte Nährsubstanzen zu nutzen oder einen Farbstoff herstellen zu können, mit eingeführt. Schwieriger ist der Nachweis bei komplexeren Eigenschaften wie etwa beim Goldenen Reis, bei dem zwei Gene aus *Narcissus pseudonarcissus* (Phytoen Synthase und eine Lycopon β -Cyclase) und ein bakterielles Gen (Phytoen Desaturase) eingeführt wurden, damit im Reisendosperm Provitamin A synthetisiert wird.

Häufig begnügen sich Untersuchungen zum Gene Silencing mit der Feststellung, dass die gewünschte Eigenschaft bei einer transgenen Pflanze nicht ausprägt und nicht nach den Mendel'schen Regeln vererbt wurde. Auch sonst beschränken sich die Untersuchungen zumeist darauf, die Mengen der synthetisierten transgenen mRNA und des transgenen Proteins zu messen. Den molekularbiologischen Ursachen des Silencing wird nicht näher nachgegangen.

Tabelle 2 gibt eine Übersicht über festgestelltes und publiziertes Gene Silencing bei verschiedenen transgenen Nutzpflanzen. Prinzipiell können bei transgenen Pflanzen transkriptionelles (TGS) und post-transkriptionelles Gene Silencing (PTGS) unterschieden werden.

3.1.1 Transkriptionelles Gene Silencing

Beim transkriptionelles Gene Silencing (TGS) findet keine Transkription des betroffenen Gens statt. Auslöser des TGS sind Interaktionen zwischen homologen Sequenzen, die eine Methylierung bewirken. Die Methylierung soll sich bei TGS auf den Promotorbereich beschränken (Meng et al. 2003). Die DNA Methylierung ist aber nicht unbedingt eine Voraussetzung für ein TGS (Kapoor et al. 2005). Wahrscheinlich kann sich Gene Silencing auch über eine Veränderung des Chromatins einstellen.

Mehrfach inserierte Kopien eines Transgens sind, da sie homolog zueinander sind, also ein typischer Auslöser für TGS. Dabei müssen die homologen Sequenzen nicht nahe beieinander liegen, sondern können vermutlich über DNA-DNA-Paarung das Silencing bzw. die Methylierung der homologen Sequenzen verursachen (Wolffe & Matzke 1999). Das Signal zur Stilllegung eines Gens kann statt durch DNA-DNA-Paarung auch durch Paarung von DNA mit anormaler homologer RNA erfolgen (Matzke & Matzke 1998). Bei Yang et al. (2005) stellte eine Umordnung im Promotorbereich den Auslöser für TGS dar. Durch die Umordnung kam es zur Transkription sogenannter aberranter (irrtümlicher) mRNA, die eine Stilllegung des Promotorbereiches vermittelte.

Charrier et al. (2000) zeigten, dass bereits zwei Transgenkopien an verschiedenen Orten im Genom genügen, um Gene Silencing auszulösen. Das Silencing konnte nicht durch Einfügen eines Introns innerhalb der kodierenden Sequenz oder durch Verwendung eines anderen Promoters oder Terminators ausgeschlossen werden. Das

bedeutet, dass das Silencing durch die Sequenzhomologien, also DNA-DNA-Interaktionen ausgelöst wurde. Die Effizienz des Co-Silencing wurde durch die Expressionshöhe der ersten Transgenkopie nicht beeinflusst (Charrier et al. 2000).

Ein weiteres Signal für TGS können komplexe Transgeninsertionen sein, das sind Insertionen, bei denen es zu Umordnungen, inversen (Wiederholungs-)Sequenzen, Deletionen oder dem Einbau überflüssiger DNA¹⁴ gekommen ist (Elomaa et al. 1995; Jakowitsch et al. 1999; Pawlowski et al. 1998; Vaucheret et al. 1998). Komplexe Transgeninsertionen wurden bei zahlreichen Nutzpflanzen, die mit der Agrobakterium-Methode oder durch Particle Bombardment verändert wurden, beschrieben (siehe etwa Wilson et al. 2004).

3.1.2 Post-transkriptionelles Gene Silencing

Beim post-transkriptionellen Gene Silencing (PTGS) wird das entsprechende Gen zwar transkribiert, die mRNA wird aber abgebaut und die Translation verhindert. PTGS wurde bisher seltener an transgenen Pflanzen beschrieben, unter anderem wegen der komplexen Wirkmechanismen. PTGS wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) als wichtigstes Zwischenprodukt bzw. als Substrat ausgelöst. Wenn die dsRNA in das Cytoplasma gelangt, wird im Anschluss jede homologe RNA und auch die dsRNA selbst abgebaut. Der genaue Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt. Er beinhaltet vermutlich die Bildung von kleinen interferierenden RNA-Stücken (Van Eldik et al. 1998; Di Serio et al. 2001). Transgenkonstrukte, die in umgekehrter Richtung in das Genom eingefügt sind, können doppelsträngige RNA bilden, die dann den Abbau der transgenen mRNA auslösen (Chen et al. 2005; Ma & Mitra 2002).

Co-Suppression ist die Hemmung von Genen, die an verschiedenen Orten im Genom liegen. Co-Suppression stellt eine Form von PTGS dar, da es auf die Interferenz von RNA zurückgeführt werden kann (Stevenson & Jarvis 2003). Der Mechanismus der Co-Suppression wurde an transgenen Petunien entdeckt (Napoli et al. 1990).

Auslöser für eine RNA-Interferenz können auch einfach große Mengen an synthetisierter mRNA sein (Dehio & Schell 1994; Elmayan & Vaucheret 1996), die zum Beispiel auf die Aktivität des 35S CaMV-Promoters zurückzuführen sind. Dabei ist nicht klar, ob es hierbei einen bestimmten Schwellenwert gibt, das heißt eine bestimmte Transkriptmenge, ab der ein PTGS ausgelöst wird. Falls dies so ist, stellt sich die Frage, in welcher Größenordnung der Schwellenwert liegen könnte (Iyer Lakshminarayan et al. 2000). Xia et al. (2005)¹⁵ erklärten eine beobachtete

¹⁴ Überflüssige DNA ist sogenannte Füll-DNA (Filler DNA), die bei der Insertion des Genkonstruktes auftreten kann (Mayerhofer et al. 1991). Solche Füll-DNA kann aus dem Genom aber auch aus dem Rückgrat, dem Backbone, des Plasmids stammen (Gorbunova & Levy 1997). Bei Mayerhofer et al. (1991) bestand bei Untersuchungen an *Arabidopsis* die Füll-DNA aus Sequenzen des pflanzlichen Genoms, die allerdings mehr oder weniger weit entfernt von der Insertionsstelle entstammten. Makarevitch et al. (2003) fanden bei transgenem Hafer ebenfalls Füll-DNA von entfernten Stellen im Pflanzengenom. Müller et al. (1999) fanden Füll-DNA mit unbekannter Herkunft. Ülker et al. (2002) fanden in einer von zehn transgenen Tabaklinien ein 260 bp langes Fragment aus *E. coli*, obwohl eine gute Laborpraxis eingehalten wurde und Kontamination des Plasmids vermieden wurde.

¹⁵ Publikation nur als Abstract verfügbar.

abnehmende Insektenresistenz von Bt-Baumwolle über die Vegetationsperiode in Asien mit zunehmendem PTGS, das seinerseits durch die hohe Expression des Bt-Gens ausgelöst wurde und zu einer zunehmenden Methylierung des 35S CaMV-Promotors führte. PTGS soll auch mit einer Methylierung im transkribierten Bereich des Transgenkonstruktes verknüpft sein (Meng et al. 2003).

PTGS kann unabhängig voneinander in mehreren Generationen auftreten und ist daher für eine nicht den Mendel'schen Regeln entsprechende Vererbung der transgenen Eigenschaft verantwortlich (Matzke et al. 2001; Mitsuhashi et al. 2002). Das PTGS eines Transgens kann während der Entwicklung einer Pflanze zunehmen (Ohrend et al. 1991), allerdings auch wieder vollständig zurückgehen (Morino et al. 1999). Es kann auch homologe endogene Sequenzen des Pflanzengenoms betreffen (Dubois et al. 2005).

TGS und PTGS scheinen nicht immer streng getrennt voneinander aufzutreten. In Untersuchungen von Fojtova et al. (2003) überwog in transgenem Tabak anfangs PTGS, weil nur der Mittelteil des Transgenkonstruktes eine Hypermethylierung aufwies. Nach mehreren Zellzyklen allerdings zeigte sich das gesamte Transgenkonstrukt einschließlich des 35S-Promotors methyliert. Fojtova et al. (2003) schlossen daraus, dass ein Wechsel von PTGS zu TGS stattgefunden hat.

Am Rande sei noch erwähnt, dass RNA-Interferenz die Grundlage für die Antisense-Methode ist, die auch bei der Herstellung transgener Pflanzen benutzt wird. In der transgenen Kartoffel der Firma Amylogene etwa wird mithilfe der Antisense-Methode die Synthese der Amylosesynthetase gehemmt, ein Enzym, das an der Stärkesynthese beteiligt ist. Auch die so genannte Antimatsch-Tomate Flavr Savr der Firma Calgene wurde mit der Antisense-Methode hergestellt, die eine Suppression des Enzyms Polygalacturonase, das direkt an dem Abbau der Zellwand beteiligt ist, vermittelte.

Tabelle 2: Übersicht über Untersuchungen zum unerwünschten Gene Silencing von Transgenen in Nutzpflanzen; TGS= transkriptionelles Gene Silencing, PTGS = post-transkriptionelles Gene Silencing¹⁶

NUTZPFLANZE	TYPUS DES GENE SILENCING	UNTERSUCHUNG
Gerste	Nicht bestimmt TGS	Bregitzer & Tonks (2003) Meng et al. (2003)
Hafer	Nicht bestimmt	Pawlowski et al. (1998)
Hirse	TGS und PTGS	Emani et al. (2002)
Kartoffel	Nicht bestimmt	Dymock et al. (1991)
Mais ¹⁷	Nicht bestimmt Nicht bestimmt	Mehlo et al. (2000) Register et al. (1994)
Reis	TGS Nicht bestimmt TGS PTGS Wahrscheinlich TGS, nicht abschließend geklärt TGS	Yang et al. (2005) Kathuria et al. (2003) Chareonpronwattana et al. (1999) Morino et al. (1999) Kohli et al. (1999) Kumpatla & Hall (1998)
Roggen	TGS und PTGS	Popelka et al. (2003)
Salat	PTGS	Dubois et al. (2005)
Soja	TGS	Reddy et al. (2003)
Tabak	Von PTGS zu TGS wechselnd PTGS PTGS „Homologie-abhängige Stilllegung“ PTGS PTGS TGS TGS und Co-Suppression PTGS Nicht abschließend geklärt	Fojtova et al. (2003) Ma & Mitra (2002) Mitsuhara et al. (2002) Charrier et al. (2000) Balandin & Castresana (1997) Elmayan & Vaucheret (1996) Brandle et al. (1995) Dorlhac de Brone et al. (1994) Ingelbrecht et al. (1994) Neuhuber et al. (1994)
Tomate	PTGS PTGS	Mishra & Handa (2005) Lee et al. (1997)
Weizen	TGS TGS	Anand et al. (2003) Demeke et al. (1999)

¹⁶ Die Aufzählung berücksichtigt nicht Untersuchungen mit mehrjährigen transgenen Pflanzen, da diese wegen ihres besonderen Verbreitungspotentials und der komplexen Ökosysteme, in denen sie vorkommen, in der Risikodebatte gesondert behandelt werden müssen. Die Aufzählung berücksichtigt auch keine transgenen Pflanzen mit Virusresistenz, da hierbei Gene Silencing zusätzlich als Abwehrreaktion gegen die Virusinfektion der Pflanze auftritt.

¹⁷ Es gibt auffallend wenige Untersuchungen zu Gene Silencing bei Mais. Gründe hierfür können auch Iyer Lakshminarayan et al. (2000) nicht angeben.

3.1.3 Gene Silencing und Umwelteinflüsse

Gene Silencing kann nicht nur transformationsbedingt sein, sondern es wird auch durch schwankende oder Stress auslösende Umwelteinflüsse, wie etwa Kulturbedingungen, Licht und Temperatur, ausgelöst.

Ein bekanntes Beispiel ist der bereits erwähnte Petunienversuch, bei dem in Deutschland 1990 zum ersten Mal transgene Pflanzen im Freiland getestet wurden. Nach einer Hitzewelle mit bis zu 36°C veränderte sich die Blütenfarbe. Waren vorher 92 % der Blüten aufgrund der transgenen Veränderung lachsrot gefärbt, zeigten nach der Hitzewelle nur noch 37 % der Blüten eine stark lachsrote Farbe. Die Reduktion des lachsroten Phänotyps konnte auf eine Methylierung des 35S-Promotors nach dem Hitzestress zurückgeführt werden (Meyer et al. 1992).

Auch in transgenem Tabak fanden Neumann et al. (1997) und Köhne et al. (1998), dass die Expression des Transgens nach hohen Temperaturen reduziert war. Bei transgenem Reis zeigten Pflanzen derselben Linie im Sommer stärkeres Gene Silencing des Transgens als im Winter (Morino et al. 1999). Morino et al. (1999) führten dies auf die höheren Temperaturen im Sommer zurück. Es kann aber auch am stärkeren Lichteinfall im Sommer gelegen haben, denn bei transgenem Tabak wurde gezeigt, dass höhere Lichtintensitäten das Silencing des Transgens beschleunigten (Dorlhac De Borne et al. 1994; Lips 1998; Pickardt & De Kathen 2002). Auch in herbizidresistenter Gerste trat bei Stress durch hohe Temperaturen von über 30°C, die im Sommer regelmäßig in Glashäusern vorkommen können, eine wesentlich niedrigere Transgenexpression auf (Bregitzer & Tonks 2003).

Auch die Anbaubedingungen können für das Gene Silencing eine Bedeutung haben. Bei Kartoffeln hing die Transgenexpression stark von der Kultivierung ab und war bei der Aufzucht im Boden höher als bei der Aufzucht in Kulturgefäßen mit Nährmedium (Dymock et al. 1991). Bei transgenem Tabak hing die Stilllegung des Transgens davon ab, wie die Keimlinge umgesetzt wurden (Brandle et al. 1995). Palauqui & Vaucheret (1995) berichteten, dass die Keimungsbedingungen das Ausmaß der Transgenstilllegung bestimmten.

3.1.4 Ansätze zur Stabilisierung der Transgenexpression

In der Forschung gibt es die Überlegung, die Transgenexpression durch die Einführung einer Sequenz in das Transgenkonstrukt, die für Scaffold- oder Matrix Attachment-Regionen (S / MAR) kodiert, zu stabilisieren. Durch die Bindung an die nukleäre Matrix soll das Transgenkonstrukt unabhängig von möglichen Positionseffekten werden.

Auch wenn ein inseriertes Transgen von S / MAR-Sequenzen flankiert wird, kann Gene Silencing auftreten (Ülker et al. 1999). Allen et al. (2000) und Vaucheret et al. (1998) stellten trotz solcher Sequenzen PTGS fest.

Durch die Einführung von S / MAR-Sequenzen variierte die Transgenexpression zwischen verschiedenen Transformationslinien mitunter weniger stark (Mlynarova et al. 1995; Oh et al. 2005) oder die Transgenexpression war generell erhöht (Allen et al.

1996; Ülker et al. 1999; Vain et al. 1999; Xue et al. 2005). S / MAR-Sequenzen bewirkten teilweise, dass die Transgenexpression direkt von der Anzahl der inserierten Kopien abhing (Oh et al. 2005). Liu & Tabe (1998), Sidorenko et al. (2003) und De Bolle et al. (2003) erzielten hingegen keine Effekte mit flankierenden S / MAR-Sequenzen, also keine Erhöhung der Genexpression in Abhängigkeit der Kopienanzahl und keine Stabilisierung der Transgenexpression.

Der Versuch, die Transgenexpression mit S / MAR-Sequenzen zu stabilisieren, ist über einzelne Untersuchungen noch nicht hinausgekommen. Limitierend sind offensichtlich die verfügbaren und funktionierenden S / MAR-Sequenzen. Verwendet werden MAR-Sequenzen aus Tabak (Allen et al. 1996; Ülker et al, 1999), SAR- Sequenzen aus Hefe (Allen et al. 1996), SAR- Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana*, Erbsen und *Drosophila melanogaster* (Liu & Tabe 1998) und SAR- Sequenzen aus Hühnchen (Mlynarova et al. 1995 und 2002).

Mit den S / MAR-Sequenzen werden zusätzliche Sequenzen in ein Transgenkonstrukt eingefügt. Das steht dem Ziel entgegen, dass das Transgenkonstrukt nur essenzielle Elemente enthält und die Pflanzen nur mit minimaler transgener DNA transformiert werden.¹⁸ S / MAR-Sequenzen sind ziemlich groß: Die MAR-Sequenz aus Tabak ist 1,17 kb groß (Allen et al. 1996; Ülker et al. 1999), die SAR- Sequenz aus Hefe 838 bp (Allen et al. 1996), die aus *Arabidopsis thaliana* 2,3 kb (Liu & Tabe 1998), die aus Erbsen 2,5 kb (Liu & Tabe 1998) und die aus *Drosophila melanogaster* 1,2 kb (Liu & Tabe 1998).¹⁹

3.1.5 Fazit

Gene Silencing in transgenen Pflanzen ist keinesfalls ein Problem, das als aufgeklärt und überwunden gelten kann. In der Literatur finden sich zahlreiche Aufsätze, die Gene Silencing bei verschiedenen transgenen Nutzpflanzen beschreiben, ohne dass die bestimmenden Faktoren bekannt, geschweige denn kontrollierbar sind. Dem Phänomen wird sehr unterschiedlich detailliert nachgegangen. Gene Silencing ist zugleich ein Mechanismus, mit dem Pflanzen auf natürliche Weise pathogene Viren abwehren. Es wäre zu berücksichtigen, ob die natürliche Virenabwehr von Pflanzen durch das Gene Silencing der Transgene unterdrückt werden kann.

In der praktischen Anwendung erfolgt die Herstellung von transgenen Pflanzen nicht systematisch, sondern vielmehr nach dem Schrotschuss- und dem anschließenden Selektionsprinzip: Es wird eine sehr hohe Anzahl an Transformanten hergestellt und anschließend werden die Linien mit der gewünschten Expressionshöhe ausgewählt (Bregitzer & Tonks 2003; Butaye et al. 2005). Die Ursachen für die unterschiedliche Transgenexpression liegen unter anderem in der Anzahl der inserierten

¹⁸ Im Guidance Document der EFSA ist als Grundsatz erwähnt, dass das Transgenkonstrukt nur die essenziellen Elemente enthalten soll (EFSA 2004).

¹⁹ Als Vergleich: Transgenkonstrukte sind in der Regel zwischen 2 und bis zu 7 Kilo Basenpaare (kbp) groß (transgener Raps GT 73: 2,7kbp; transgener Mais MON 810: 4,6 kbp; transgener Mais Bt 11: 6,2 kbp).

Transgenkonstrukte sowie im Ausmaß der Umordnungen, Deletionen und der Integration überflüssiger DNA (Butaye et al. 2005).

In transgenen Pflanzen mit angestrebter kommerzieller Nutzung wird durch wiederholtes Rückkreuzen die Kopienzahl des Transgens verringert, um so die Transgenexpression zu stabilisieren. Rückkreuzung mit der Elternpopulation wird in der Züchtung häufig durchgeführt, um eine anfängliche Variation einzuschränken sowie unerwünschte Merkmale zu vermeiden. Wie oft Rückkreuzungen mit transgenen Ausgangslinien durchgeführt werden, ist von Art zu Art unterschiedlich (Wilson et al. 2004). Im Detail gibt es keine Übersicht über die Anzahl der Rückkreuzungen bei verschiedenen transgenen Nutzpflanzenarten.

Ein weiterer Aspekt, der bei Gene Silencing und damit dem Methylierungsmuster des pflanzlichen Genoms betrachtet werden sollte, ist die Tatsache, dass die Kultivierung der Zellen genomweite Mutationen auslösen kann.²⁰ Durch Zellkultur können genomweite epigenetische Veränderungen, etwa im Methylierungsmuster, auftreten. Bisher wurde eine Methylierung von endogenen Pflanzengen in transgenen Pflanzen als Nebeneffekt gentechnischer Veränderung nicht belegt. Allerdings wurden die Methylierungsmuster auch nicht genomweit untersucht und miteinander verglichen. Durch unterschiedliche Methylierung können beispielweise Transposons aktiviert werden. Epigenetische Veränderungen können über Generationen auch in Änderungen auf genetischer Ebene münden (Phillips et al. 1994). Das heißt, dass genomweite Untersuchungen auf Methylierung der transgenen Pflanzen im Vergleich zur Ausgangslinie als Aspekt der Risikobewertung diskutiert werden sollten.

Um kultivierungsbedingte Änderungen zu vermeiden, gibt es Ansätze, nicht mehr die isolierten/vereinzelten Zellen zu transformieren, sondern Transformationen an der ganzen Pflanze (= *in planta*) vorzunehmen (Katavic et al. 1994), oder aber an Embryonen, Keimlingen und allgemein an solchen Geweben, die in der Zellkultur nicht dedifferenziert werden müssen. Entsprechende Methoden gibt es bislang nur für

²⁰ Pflanzenzellen, die für die gentechnische Veränderung in Zellkultur gehalten werden, können sogenannte somaklonale Variationen ausprägen. Ein Insertionsprozess kann somaklonale Variationen auch verstärken (Veilleux & Johnson 1998). Unerwünschte genetische Effekte der gentechnischen Transformation können im allgemeinen nicht von somaklonaler Variation unterschieden werden. Folgende Ereignisse in transgenen Pflanzen werden unter somaklonale Variationen zusammengefasst (Veilleux & Johnson 1998, Sala et al. 2000):

- Chromosomale Abweichungen, zum Beispiel Änderungen der Chromosomenanzahl oder -struktur, Änderungen im Ausmaß der Polyploidie, Translokationen oder Chromosomenbrüche
- Aktivierung von transposablen Elementen (Dies kann sich unterschiedlich auswirken, zum Beispiel als Verstärkung der Transkription).
- Punktmutation, Sequenzänderungen
- Daneben können aber auch Änderungen im Methylierungsmuster und andere epigenetische Änderungen auftreten.

einzelne Nutzpflanzen (siehe Wilson et al. 2004).²¹ Von solchermaßen hergestellten transgenen Pflanzen liegen noch keine Zulassungsanträge vor.

3.2 Positionseffekte

Die Insertion der Transgenkonstrukte scheint nicht völlig zufällig über das Genom verteilt zu erfolgen, sondern vermehrt in transkribierten Regionen, in AT-reichen²² Regionen und in endogenen Pflanzengenen (Ingelbrecht et al. 1991, Jeong et al. 2002; für eine Zusammenfassung siehe auch Wilson et al. 2004). AT-reiche Regionen sind charakteristisch für Matrix-Attachement-Regionen, die zu den Gen-reichen Regionen zählen (Cellini et al. 2004). Das bedeutet, dass eine recht hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die gentechnische Veränderung genomische Sequenzen in der Pflanze trifft, die eine Funktion ausüben.

Analysen bei Retroviren aber auch bei Transgenen zeigten, dass die Integration besonders von der Chromatinstruktur und auch von den DNA-Sequenzen und den damit einhergehenden räumlichen Strukturen abhängen kann (Pryciak & Varmus 1992; Müller & Varmus 1994). Retrotransposons in Reis, durch Gewebekultur aktiviert, inserierten ebenfalls bevorzugt in Gen-reichen Regionen, und zwar besonders in palindromische²³ Sequenzen (Miyao et al. 2003). Müller et al. (1999) zeigten, dass besonders an palindromischen Sequenzen und AT-reichen Regionen illegitime Rekombinationen, also Transgeninsertionen, stattfinden. AT-reiche Regionen begünstigen vermutlich die Transgeninsertion, weil ein hoher Adenosin-Anteil in der DNA eine Krümmung verursacht und die DNA dadurch besonders exponiert ist (Matzke & Matzke 1998; Müller et al. 1999). Palindromische Sequenzen können ebenfalls eine räumlich exponierte Krümmung, eine sogenannte Haarnadel, bilden.

Die umgebende DNA bestimmt mit, wie stabil ein Transgen exprimiert wird (Meyer 1993). Die Expression ist stabiler, wenn die Transgene in AT-reiche Regionen des pflanzlichen Genoms inserieren, die an die nukleäre Matrix gebunden sind und die an den distalen Enden von Chromosomen liegen. Die distalen Enden von Chromosomen gelten als Gen-reich (Matzke & Matzke 1998). Die Expression ist eher instabil, wenn die Transgene in der Nähe des Centromers inseriert sind (Matzke & Matzke 1998).

Genkonstrukte zeigen sich in unterschiedlichem Maße methyliert, je nach dem, wo sie im Genom inseriert sind. Meyer et al. (1993) sprechen in diesem Zusammenhang von einer „Positionsabhängigen Determination der Methylierung“. Ist die umgebende Region im Genom generell sehr AT-reich und weicht das Transgen in seiner

²¹ *In planta* Transformationen finden ebenfalls Agrobakterium-vermittelt statt, allerdings an ganzen Pflanzen, mindestens aber an Blütenknospen. Die Pflanzenteile werden in eine Lösung mit entsprechend modifizierten Agrobakterien getaucht oder über Vakuuminfiltration damit behandelt. Ziel ist es, dass die Pollen und Samenanlagen der Blütenknospen transformiert werden, so dass nach einer generativen Phase, das heißt der Befruchtung der Eizellen durch Pollen in den behandelten Blüten, transgene Pflanzen gewonnen werden.

²² AT: Adenosin und Thymin

²³ Unter einem Palindrom wird eine DNA-Sequenz verstanden, die auf beiden Strängen die gleiche Sequenz ergibt, in 5' -> 3' Richtung gelesen, vergleichbar mit einem Wort, das auch rückwärts gelesen werden kann.

Nukleotidzusammensetzung davon ab, kann auch dies eine Methylierung auslösen (Matzke & Matzke 1998). Das heißt, dass die Umgebung im Genom auch mitentscheidend dafür ist, ob Gene Silencing auftritt. Der Methylierungsstatus beeinflusst die Höhe der Expression. Es ist aber umstritten, ob und inwiefern der Insertionsort (im Genom) die Höhe der Transgenexpression direkt beeinflusst, etwa über Zugangsmöglichkeiten der RNA-Polymerasen (Fujiwara & Beachy 1993; Nagaya et al. 2005).

Es gibt Forschungsansätze, die unter anderem wegen möglicher Positionseffekte anstreben, den Ort der Transgeninsertion mittels homologer Rekombination zu kontrollieren (z. B. Terada et al. 2002). Allerdings sind diese Ansätze weit davon entfernt, anwendungsreif zu sein.

3.3 Pleiotrope Effekte

Der Begriff „pleiotrope Effekte“ wird als Beschreibung für die unterschiedlichsten unbeabsichtigten Veränderungen in transgenen Pflanzen benutzt. Tabelle 3 gibt einen Überblick über in der Literatur erwähnte pleiotrope Effekte in transgenen Pflanzen. Diese Beispiele für pleiotrope Effekte sind häufig nicht über Literaturdatenbanken recherchierbar, da sie nur beiläufig erwähnt werden und nicht als Schlagwort oder in den Zusammenfassungen der Aufsätze auftauchen. Insofern erhebt Tabelle 3 auch keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Zunächst nur mittelbar relevant für die aktuelle Diskussion um eine Risikobewertung sind solche gentechnischen Veränderungen, bei denen das transgene Protein gewollt und vielfältig in die Physiologie der Pflanzen eingreift. Gleichwohl sind sie für das vorliegende Gutachten von Interesse. Bei solchen Transgenen sind regelmäßig pleiotrope Veränderungen zu beobachten. Ein Beispiel hierfür sind die Untersuchungen von Tiehle et al. (1999) an Kartoffeln, in die ein für Phytochrom B kodierendes Gen eingebracht wurde, um die Photosyntheseleistung zu verbessern. Alle transgenen Pflanzen wiesen Kleinwüchsigkeit, eine verminderte Apikaldominanz, eine erhöhte Anzahl von kleineren aber dickeren Blättern und erhöhte Pigmentierung auf. Zudem wurde das Chlorophyll langsamer abgebaut, so dass die transgenen Pflanzen gegenüber den Ausgangslinien länger lebten. Insgesamt kam es dadurch zu einer höheren Biomasseproduktion. Solche pleiotropen Effekte können dem Transgen, bzw. dem transgenen Protein und seiner wichtigen physiologischen Funktion zugeschrieben werden.

Andere Beispiele liefern die von der britischen Food Standards Agency untersuchten transgenen Pflanzen, die in Tabelle 4 zusammengefasst sind. Da die pleiotropen Effekte oft auch die Wüchsigkeit und andere agronomisch wichtige Eigenschaften betreffen, sind Zulassungsanträge von solchen transgenen Pflanzen vorerst nicht in der EU zu erwarten.

Für eine Übersicht zu pleiotropen Effekten in Tabelle 3 wurden vor allem solche Untersuchungen zusammengetragen, die keinen direkten Zusammenhang mit dem

Transgen aufweisen, wie beispielsweise die erhöhte Samenproduktion bei insektenresistenten Sonnenblumen (Snow et al. 2002) oder der erhöhte Ligningehalt im Stängel von insektenresistentem Mais (Poerschmann et al. 2005). Es stellt eine Herausforderung dar, wie derartige unbeabsichtigte Effekte in der durch Annahmen geleiteten Risikobewertung erkannt werden können.

Pleiotrope Effekte sind für die Landwirtschaft von Bedeutung, weil sie zu Ertragsminderungen führen können, verursacht durch Fitnessverluste der transgenen Pflanzen oder durch veränderte ökologische Eigenschaften. Weiterhin können sich pleiotrope Effekte auf die Produktsicherheit auswirken, etwa wenn sie dazu führen, dass bislang unbekannte Proteine oder andere Stoffwechselprodukte gebildet werden.

Der zuletzt genannte Aspekt hat bisher die größte Aufmerksamkeit im Zusammenhang mit pleiotropen Effekten erregt, nämlich dass sich die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe ändern oder dass neue Inhaltsstoffe gebildet werden könnten. Dies hätte vor allem Einfluss auf die Lebensmittelsicherheit und wurde im Zusammenhang mit dem Prinzip der substantiellen Äquivalenz diskutiert, das unter der Novel Food Verordnung 258/97 die Grundlage für eine einfache Anmeldung von Produkten aus transgenen Pflanzen bildete.²⁴

Die Datenlage zu pleiotropen Effekten ist insgesamt zu dünn, um Schlussfolgerungen über das Ausmaß oder die Wahrscheinlichkeit ihres Auftretens zu ziehen. Vielmehr stehen nach wie vor einzelne Ergebnisse wie Puzzlestücke nebeneinander. Ein Grund, weshalb pleiotrope Effekte nicht weiter untersucht werden, ist vor allem der Dissens um die Bewertung bisheriger Ergebnisse.²⁵

²⁴ Zur Feststellung der substantiellen Äquivalenz werden die Produkte einer transgenen Pflanze mit konventionellen Produkten verglichen. Die Erzeugnisse gelten als gleichwertig, wenn sie sich hinsichtlich ihrer Zusammensetzung, ihres Nährwertes, ihres Stoffwechsels, ihres Verwendungszweckes sowie ihres Gehaltes an unerwünschten Stoffen nicht wesentlich unterscheiden.

²⁵ Teilweise werden Ergebnisse auch angezweifelt, etwa Jung & Sheaffer (2004) über Saxena & Stotzky (2001).

Tabelle 3: Übersicht über beobachtete pleiotrope Effekte bei transgenen Pflanzen²⁶

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETENER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Bergelson et al. (1996)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Untersuchung von Fitnessverlusten bei herbizidresistenten Pflanzen	Acetolaktat-Synthase Gen, Herbizidresistenz (Chlorsulfuron-Resistenz)	Samenproduktion bei der transgenen Pflanzen um 34 % vermindert	Fitnessverlust der transgenen Pflanzen eher durch pleiotrope Effekte des eingeführten Fremdgens verursacht als durch Transformation selbst
Bergelson et al. (1996)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Untersuchung von Selbstbefruchtung und Auskreuzung im Vergleich zu einer <i>Arabidopsis</i> -Mutante mit natürlicher Chlorsulfuronresistenz	Acetolaktat-Synthase Gen, Herbizidresistenz (Chlorsulfuron-Resistenz)	Transgene <i>Arabidopsis</i> -Pflanzen kreuzten verstärkt aus (5,98 % im Vergleich zu 0,3 % der natürlichen chlorsulfuron-resistenten <i>Arabidopsis</i> -Mutante	Die Autoren schlossen, dass der Unterschied nicht an der Eigenschaft, sondern an anderen prinzipiellen Unterschieden zwischen transgenen und den natürlichen Mutanten-Pflanzen liegen muss.
Bettini et al. (2003)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Auswirkungen des Gens roID aus <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	RoID aus <i>Agrobacterium rhizogenes</i> , kodiert für eine Ornithin Cyclodeaminase	Frühere Blüte, mehr Infloreszenzen, höhere Ernte, erhöhte Resistenz gegen Fusarium	Eventuell mittelbarer Effekt des Transgens
Beyer et al. (2002)	Reis (<i>Oryza sativa</i>)	Etablierung eines Stoffwechselfades zur Provitamin A-Synthese (β -Carotin) im Reisendosperm („Golden Rice“)	Phytoen- und Lycopren- β -Cyclase der Gelben Narzisse (<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.)	Unerwartete Carotinoid-Muster in den transgenen Samen	Bisher unbekannte Rückkopplungseffekte der bakteriellen Promotorgene nicht auszuschließen

²⁶ Die Tabelle ist das Ergebnis einer Literaturrecherche nach pleiotropen Effekten, die als Schlagworte oder in den Zusammenfassungen von Aufsätzen erwähnt wurden. Sie erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Bovy et al. (2002)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Etablierung von Flavonoiden im Tomatenfruchtfleisch	Mais-Transkriptionsfaktor Gene LC und C1	Je nach Transformation erhöhte rötlich bis violette Anthocyanin-Färbung in den Nodien und Blättern mancher LC/C1 Pflanzen. Erhöhte Anthocyanin-Gehalte durch Lichtstress hervorgerufen	Vorhersagen zu bestimmten Auswirkungen schwierig; generell beträchtliche Variation zwischen Pflanzenarten und -sorten; Transformation kann großen Einfluss auf die Stoffwechselfade ausüben
Cortina & Culiániz-Macià (2005)	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Machbarkeit einer gentechnischen Veränderung zur Verbesserung der Stressreaktion durch Trehalose	TPS1 (Trehalose-6-Phosphat Synthase) aus Hefezellen	Verdickte Triebe, steife dunkelgrüne Blätter, aufgestellte Zweige, abweichende Wurzelentwicklung; erhöhter Chlorophyll- und Stärkegehalte	Verbesserte Stressreaktion der transgenen Tomaten; Produktivität der transgenen Tomaten als nicht vermindert bewertet
Datta et al. (2003)	Reis (<i>Oryza sativa</i> ssp. <i>indica</i>)	Weiterentwicklung der Transformation bei Beyer et al. (2002); z.B. neuer Promoter	Phytoen-Synthase (psy), Lycopon β -Cyclase (lcy) und Phytoen Desaturase (crt), Provitamin A-Synthese (β -Carotin) im Reisendosperm („Golden Rice“)	Phänotypische Abweichungen bei 10 % der transgenen Pflanzen; kürzerer Wuchs, dunklere Färbung, spätes Blüten, z.T. geringere Samenbildung	Phänotypische Variation möglicherweise aufgrund von gemeinsamen Zwischenprodukten der Carotinoid- und der Gibberellinsynthese oder durch Gewebekultur bedingt
Delhaize et al. (1999)	Weizen (<i>Triticum aestivum</i>)	Untersuchung der Phosphatidylserin Synthaseregulierung und Auswirkungen u.a. auf mögliche Aluminium-Resistenz	Phosphatidylserin Synthase-Gen aus Weizen	Akkumulation von Phospholipiden führte zu nekrotischen Läsionen in den Blättern	Erhöhte Akkumulation von Phospholipiden an der äußeren Oberfläche der Plasmamembran, tritt bei Apoptose auf und wirkt vermutlich als Signal

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Gertz et al. (1999)	Sojabohne (<i>Glycine max</i>)	Vergleich von zwölf Sojavarietäten (sechs mit Glyphosat-resistenz, eine mit Glufosinat-resistenz, eine mit Sulfonylurea-toleranz und vier konventionelle Varietäten) bei verschiedenen Temperaturen (25/20°C; 35/30°C; 45/30°C)	Glyphosat-Resistenz, Glufosinat-Resistenz, Sulfonylurea-Toleranz	Roundup Ready Sojabohnen empfindlicher bei Hitzestress (Verminderung von Wuchs, Chlorophyllgehalt und Frischmasse); 12-13 % erhöhter Ligningehalt (bei 25/20°C); Ligningehalt möglicherweise Ursache für das vermehrte Aufspießen der Stängel (90-100 %); bei höheren Temperaturen schlechtere Ertragsleistung	Möglicherweise veränderte Verteilung der Stoffwechselprodukte beim Shikimatsäureweg
Lappe et al. (1999)	Sojabohne (<i>Glycine max</i>)	Zusammensetzung der biologisch aktiven Inhaltsstoffe der Sojabohnen	Herbizidresistenz	Reduktion des Phytoöstrogen-Gehaltes in den transgenen Sojabohnen um 12-14 %	Ausschluss der Umweltbedingungen als Ursache für den veränderten Phytoöstrogengehalt
Le Gall et al. (2003) ²⁷	Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Evaluation der ¹ H-NMR Spektroskopie transgener Tomaten mit erhöhtem Flavonoid-Gehalt	Mais-Transkriptionsfaktoren LC und C1	Signifikante Erhöhung von sechs Flavonoid-Glykosiden (beabsichtigt); außerdem Unterschiede an 15 weiteren Metaboliten (Zitronensäure, U1, Phenylalanine, Trigonelline); kein Unterschied überstieg das 2fache.	¹ H-NMR Spektroskopie erweist sich als funktionstüchtig; Unterschiede müssen in einem weiteren Kontext untersucht werden (mehr Linien, unterschiedliche Umwelteinwirkungen)

²⁷ Die Arbeit steht im Kontext der FSA-Projekte.

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Lehesranta et al. (2005) ²⁸	Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	Vergleich des Proteinmusters von 32 konventionellen Sorten, Landsorten und transgenen Linien 32 tetraploide Sorten 8 Landrassen 3 diploide Genotypen „A range of GM potato lines“ u. a. Mal1, Sam35 ²⁹	Keine Angaben!	Kein Nachweis eines neuen (Fusions)-Proteins; bei 9 von 730 Proteinen traten signifikante Unterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Kartoffeln auf; 7 Proteine „could be tentatively identified“	Generell große Unterschiede zwischen Zuchtsorten und den Landsorten; im Vergleich dazu transgene und nicht-transgene nicht innerhalb der Variation
Lukasiewicz & Szopa (2005)	Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	Einfluss einer Veränderung des Flavonoidegehaltes	Verschiedene Gene, die an der Flavonoid-Synthese beteiligt sind.	Bei Veränderung mit Glycosyltransferase-Gen wuchsen transgene Pflanzen schneller und waren resistenter gegen Krankheitsbefall, die Ernteerträge waren höher	Die Autoren vermuten, dass weniger die Menge an Flavonoiden als vielmehr ihre chemische Struktur, in dem Fall die Glykosylierung, für ihre Funktion in der Pflanze ausschlaggebend ist.

²⁸ Dieses Arbeit Projekt steht im Kontext der FSA-Projekte.

²⁹ Das MAL1-Gen aus Kartoffel kodiert für eine Glykoprotein-prozessierende α -Glucosidase. Die Hemmung des MAL1-Gens durch Antisense führte bei den Pflanzen im Feldversuch zu phänotypischen Abweichungen, nämlich reduziertes Wachstum und eingedrehten Blättern, die unter dem Elektronenmikroskop im Mesophyll große Interzellularen aufwiesen und Plasmolyse zeigten. Die Ernte der Antisense-Pflanzen war um 90 % reduziert. Diese Unterschiede zeigten sich aber nicht, wenn die Pflanzen im Glashaus unter optimalen Bedingungen kultiviert wurden.

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Mathews et al. (2005)	Kartoffel (<i>Solanum tuberosum</i>)	Untersuchung der Gehalte an toxischen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen (Sesquiterpene und Glykoalkaloide) in transgenen Kartoffeln	Verschiedene transgene Linien mit einem oder beiden Genkonstrukte (PFW 14000 und PATC05034) in den Knollen exprimiertes Anti-Invertase Gen (geringere Verminderung des Zuckergehaltes bei niedrigen Temperaturen) und/oder verbesserte Resistenz gegenüber Zystenematoden	Unterschiedliche Gehalte der toxischen sekundären Metabolite (Sesquiterpene und Glykoalkaloide) bei verschiedenen Wachstumsbedingungen: Transgene Kartoffeln (Anti-Invertase) mit vermindertem Glykoalkaloiden-Gehalt; teilweise reduzierte, teilweise erhöhte Gehalte an sekundären Inhaltsstoffen	Möglicherweise wird der Kohlenhydratstoffwechsel mit verändert; Gewebekultivierung oder gemeinsame Nutzung von Stoffwechselzwischenprodukten möglicherweise Ursache bzw. Auslöser für die pleiotropen Effekte
Meyer et al. 1992	Petunie (<i>Petunia hybrida</i>)	A1-Gen aus Mais	Veränderte Blütenfarbe	Nach Hitzeinwirkung unempfindlicher gegenüber Pilzbefall; mehr Blätter und Triebe; weniger fruchtbar	Keine Bestimmung
Momma et al. (1999)	Reis (<i>Oryza sativa</i>)	Verbesserung der ernährungsphysiologischen Werte von Reis	Gen für Glycinin aus Sojabohne; Promotor und Terminator des Reis Glutelin Gens	Höherer Gesamtporteingehalt; Vitamin B6-Gehalt (um 50 % höher als in der Kontrolllinie) und höherer Gehalt einiger Fettsäuren	Positionseffekt oder metabolische Interferenz als Ursachen
Novak & Haslberger (2000)	Raps (<i>Brassica napus</i>)	Übersichtsartikel, Auswertung von nicht vertraulichen Dokumenten aus den USA und der EU	Herbizidresistenz oder verändertes Fettsäuremuster	Signifikant höhere Glucosinolatgehalte in transgenen Pflanzen (Quelle: Plant Genetic Systems 1996)	Unterschiede im Glucosinolatgehalt abhängig von Umwelteinflüssen; die festgestellten Gehalte bei transgenen Pflanzen liegen im Bereich der biologischen Varianz

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Poerschmann et al. (2005)	Mais (<i>Zea mays</i>)	Vergleich der transgenen Linien Novellis T und Valmont T mit den nicht-transgenen Linien Nobilis und Prelude	cry1Ab von <i>Bacillus thuringiensis</i> , Insektenresistenz	Höhere Lignin-Konzentrationen in den Stängeln der transgenen Mais-Linien (18 - 28 %fach), in den Blättern nur marginale Unterschiede im Lignin-Gehalt; Lignin unterschiedlich zusammengesetzt: bei transgener Linie vermehrt der monomere Baustein des G-Typus, bei nicht-transgener Linie vermehrt S-Typus)	Die Autoren vermuten, dass das Genkonstrukt in Gene, die an der Ligninsynthese beteiligt sind, integriert wurde.
Rang et al. (2004)	Sojabohne (<i>Glycine max</i>)	Untersuchung der funktionellen Bedeutung eines strangabwärts lokalisierten Basenfragmentes bei RR-Sojabohnen	EPSPS (Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase), Glyphosat-Resistenz (Roundup Ready Sojabohne)	Strangabwärts vom Terminator: 250 Basenpaare langes Fragment des EPSPS-Genkonstrukt lokalisiert. Wenigstens 150 Basenpaare dieses DNA-Abschnittes werden in der transgenen Sojabohne abgelesen. Veränderungen am Ableseprodukt: vier verschiedene RNA-Varianten (entfernte Terminatorregion)	Bisher unbekannte EPSPS Fusionsproteine können durch die gebildete RNA kodiert werden.
Saxena & Stoltzky (2001)	Mais (<i>Zea mays</i>)	Bewertung des Einflusses des Transgens auf die Lignin-Konzentrationen in der Pflanze	cry1Ab von <i>Bacillus thuringiensis</i> , Insektenresistenz	erhöhter Lignin-Gehalt in den transgenen Linien im Vergleich zu nicht transformierten Pflanzen (um 33 – 97 % erhöht)	Da Lignin eine Hauptkomponente für den Zellaufbau darstellt, könnte der erhöhte Gehalt ökologische Auswirkungen haben.

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Shewmaker et al. (1999)	Raps (<i>Brassica napus</i>)	Regulation der Carotinoid-Produktion	Bakterielle Phytoene Synthese in einer Napin-Expressionskassette (-> Samenspezifische Expression)	Multiple metabolische Veränderungen, insbesondere erniedrigter Chlorophyll-Gehalt und verändertes Fettsäure-Muster (höherer Olein-Anteil, erniedrigter Linol und Linolen-Anteil)	Keine Erklärung für die völlig unerwartete Veränderung des Fettsäuremusters
Shu et al. (2002)	Reis (<i>Oryza sativa</i>)	Agronomische und morphologische Untersuchungen der transgenen Pflanzen	Bt-Transgen cry1Ab und cry1Ac	Zwergwuchs bei einer Reisinie, wenn diese homozygot transgen war, bei Heterozygotie des transgenen Merkmals – normaler Wuchs; teilweise erniedrigte Fruchtbarkeit der Samen sowie unterschiedlich starker Chlorophyllmangel, allerdings ohne eindeutige Korrelation wie bei Zwergwuchs	Die Autoren vermuten somaklonale Variation hinter den „tremendous“ agronomischen und morphologischen Unterschieden der Bt-Reispflanzen.
Snow et al. (2002)	Sonnenblume (<i>Helianthus annuus</i>)	Untersuchung der Rückkreuzung einer transgenen Bt-Linie mit Wildformen der Sonnenblume, Modell für mögliche Auswirkungen eines Gentransfers zwischen transgenen Pflanzen und verwandten Wildformen	Bt-Transgen Cry1Ac, Insektenresistenz	erhöhte Samenproduktion (55 % mehr auf Standort in Nebraska und 14 % mehr auf Standort in Colorado), bei Gewächshausversuchen unter Einbeziehung von Wasser- und Nährstoffmangel keine Veränderung in der Samenproduktion	Erhöhung der Fitness von Wildpflanzen durch eingekreuzte Fremdgene von transgenen Kulturpflanzen

AUTOREN	PFLANZE	FRAGESTELLUNG	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	AUFGETRETERER PLEIOTROPER EFFEKT	HINTERGRÜNDE ZUM BEOBACHTETEN EFFEKT, SCHLUSSFOLGERUNGEN
Vencill (1999)	Sojabohne (<i>Glycine max</i>)	Vergleich Glyphosat-resistenter (H5164, H5566), Glyphosat-empfindlicher (H5164) und konventioneller (Haskell) Sojabohnen bei Wasser- und Hitzestress	Glyphosat-Resistenz	Frischmasse der transgenen Sojabohnen bei Wasserstress um 48 % reduziert, bei konventioneller Sojabohne nur um 24 %. Bei Hitzestress nicht-transgene Sojabohnen 28 % bzw. 26 % mehr Frischmasse.	Erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Umweltbedingungen von bestimmten Roundup Ready resistenten Sojabohnen
Ye et al. (2000)	Reis (<i>Oryza sativa</i>)	Produktion von Vitamin A im Reis-Endosperm	Phytoen-Synthase (aus Narzisse), Phytoen Desaturase (<i>Erwinia uredovora</i>), Lycopen β -Cyclase (Narzisse)	Bildung unerwarteter Carotinoid-Derivate, wie Lutein und Zeaxanthin	Überlegung ob Mischung aus Carotinoid-Derivaten möglicherweise besser für Aufnahme und Verwertung durch den Menschen
Ye et al. (2001)	Weidelgras (<i>Lolium multiflorum</i>)	Möglichkeiten zur Änderung der Fructan-Akkumulation	<i>Bacillus subtilis</i> sacB-Gen	Vermindertes Wachstum der transgenen Pflanzen mit Beginn der Blüte. Entwicklungshemmung der blühenden Pflanzen, schmalere Blätter, schlecht entwickeltes Wurzelsystem.	Störung des pflanzlichen Fructansyntheseweges

3.3.1 Profiling-Methoden oder Omics-Technologien

Um mögliche Veränderungen bei Inhaltsstoffen zu prüfen, wurde bereits im 5. Europäischen Forschungsrahmenprogramm das Projekt „GMOCARE - New methodologies for assessing the potential of unintended effects in genetically modified food crops“ initiiert.³⁰ GMOCARE fokussiert die Bewertung unbeabsichtigter Effekte auf Aspekte der Lebensmittelsicherheit. Deshalb wurde das Programm auf die Entwicklung neuer Technologien, die das Konzept der substantiellen Äquivalenz überprüfen können, zugeschnitten. Die neuen Technologien sollen genauere Kompositionsanalysen als bisher erlauben. Das Ziel ist, mit diesen Methoden „nicht-zielgerichtet“ vorzugehen, das heißt, dass mit ihnen nicht bestimmte festgelegte Inhaltsstoffen quantifiziert werden, sondern dass alle Moleküle einer Klasse (RNA, Proteine, Metabolite) identifiziert und quantifiziert werden und so ein Molekülprofil aufgenommen wird. Deshalb heißen diese Methoden auch „Profiling“-Methoden oder Omics-Technologien (Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics).

Beim GMOCARE-Projekt³¹ wurden Kartoffeln, Tomaten, Tabak und *Arabidopsis thaliana* (Ökotyp *Wassilewskija*) gentechnisch so verändert, dass mithilfe der Omics-Technologien explizit Unterschiede gefunden werden sollten. Beispielweise wurde in Kartoffeln die Glykoprotein-Prozessierung gentechnisch derart verändert, dass sich die Pflanzen phänotypisch stark verändert, nämlich klein und verkümmert, entwickelten.

Die britische Food Standards Agency (FSA) förderte zusätzliche Untersuchungen an transgenen Pflanzen (teilweise mit den für GMOCARE produzierten Pflanzen), um die Eignung der Omics-Technologien für die Sicherheitsbewertung transgener Pflanzen zu evaluieren (FSA 2005 a, b, c, d, e, f).³² Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 (am Ende von Kapitel 3.3.1) zusammengefasst.

Aus der Arbeitsgruppe GMOCARE stammt ein umfangreicher Review-Artikel (Cellini et al. 2004), der den bisherigen Stand bei den Omics-Technologien darstellt und bewertet:

Transcriptomics

Das Ziel bei Transcriptomics ist eine Parallelanalyse der Genexpression, das heißt ein quantitativer Nachweis der jeweiligen RNA(-Transkripte) im dem untersuchten Gewebe. Die isolierte RNA wird mit Hilfe von Chips, sogenannten Microarrays,

³⁰ GMOCARE ist im Europäischen Themen-Netzwerk „Entransfood“ eingegliedert, das mehrere Forschungsprojekte aus dem 5. Europäischen Forschungsrahmenprogramm bündelte (<http://www.entransfood.com>).

³¹ <http://www.entransfood.com/RTDprojects/GMOCARE/summaryGMOCARE30monthsprogress.doc>.
Der Zwischenbericht liegt nur in einer knappen Zusammenfassung vor, der aber trotz der Kürze Beobachtungen zu unbeabsichtigten Effekten enthält, denen leider nicht weiter nachgegangen wurde. Bei transgenen Tomatenpflanzen mit veränderter Carotinoid-Synthese hatte nur eine Linie einen stark veränderten Phänotyp, eine andere Linie zeigte eine verstärkte Samenruhe und ein langsames Wachstum.

³² <http://www.food.gov.uk/science/research/researchinfo/foodcomponentsresearch/novelfoodsresearch/g02programme/g02projectlist/>

untersucht.³³ Es gibt zwar bereits eine Reihe von Arrays für bestimmte Organismen, aber Referenz-Arrays sind noch stark limitiert (Kuiper et al. 2003).³⁴

Damit Microarrays den Anspruch erfüllen können, nicht zielgerichtet die Art und Höhe der Genexpression zu untersuchen, sollten nach Cellini et al. (2004) Microarrays folgende Anforderungen erfüllen:

- die größtmögliche Zahl an Sequenzen enthalten, wobei die Sequenzen möglichst nur einmal auftauchen sollten (nicht redundant);
- möglichst alle Gewebetypen der Pflanze widerspiegeln;
- auch Sequenzen von Stoffwechselkreisläufen enthalten, die normalerweise nicht im untersuchten Gewebe vorkommen.

Generell besteht allerdings das Problem, dass sich aus der Menge an mRNA nur bedingt eine Aussage über die Menge an Protein, die daraus gebildet wird, ableiten lässt. mRNA kann unterschiedlich lange in der Zelle verbleiben und somit als Matrize für die Proteinbiosynthese dienen. Unter anderem bestimmt die Länge des angehängten PolyA-Schwanzes über die Lebensdauer einer mRNA.

Proteomics

Unter Proteomics versteht man die Analyse der gesamten in einer Probe vorhandenen Proteine. Hierbei werden die Proteine zunächst aus dem Probenmaterial extrahiert, dann wird das Proteingemisch mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese (2DGE) aufgetrennt und anschließend die einzelnen Proteine identifiziert und quantifiziert. Hierfür werden die Proteine im Gel angefärbt und die erhaltenen Bilder analysiert. Die eigentliche Identifizierung und Quantifizierung der Proteine erfordert einen Abgleich mit einer entsprechenden pflanzenspezifischen 2DGE-Referenzdatenbank, die zuvor aufgebaut werden muss. Das Ergebnis ist stark von der Art der Extraktion und der Elektrophorese abhängig (Cellini et al. 2004). Um die Genauigkeit zu erhöhen, können einzelne Protein-Spots aus dem Gel herausgeschnitten und nach Proteinase-Verdau massenspektrometrisch identifiziert und quantifiziert werden (Kuiper et al. 2003).

³³ Der Chip besteht zumeist aus von mRNA abgeleiteter komplementärer (c)DNA auf einer festen Phase. Auf diese wird die RNA aus der zu untersuchenden Probe aufgetragen; die extrahierte RNA wird vorher entweder direkt mit einem markierten Nukleotid und unter Zugabe von reverser Transkriptase markiert oder indirekt, indem ein markiertes reaktives Molekül mit dem Rückgrat der RNA reagiert. Die cDNA auf dem Chip repräsentiert also die transkribierten Gene, die „Expressed Sequence Tags“ (ESTs) genannt werden. Ausschlaggebend für die Ergebnisse ist also, welche mRNA-Population für die Erstellung eines Chips ausgewählt wurde.

Bei Affymetrix- oder Agilent-Chips sind die Oligonukleotide standardgemäß 25 Nukleotide lang.

³⁴ So wurden innerhalb des GMO-CARE-Projektes und im Projekt der FSA (2005b) tomatenspezifische Arrays hergestellt, um die Genexpression im grünen und roten Reifestadium von transgenen Tomaten und deren Ausgangslinien vergleichen zu können. Die für das rote Reifestadium spezifische Genexpression spiegelt zudem die Synthese von ernährungsphysiologisch günstigen Stoffen wieder, wie Vitamine oder Flavonoide. Die Genexpression im grünen Reifestadium gibt eher Aufschluss über die Produktion von antinutritiven Stoffen, etwa Toxinen wie Tomatin, Chaconin und Solanin. Mit dem Projekt sollte auch untersucht werden, in welcher Bandbreite die Zusammensetzung von Tomaten im grünen oder im roten Reifestadium variierte. Die Ergebnissen sollten zudem zeigen, ob sich Microarrays dafür eignen, unerwartete Effekte in transgenen Pflanzen festzustellen (Kuiper et al. 2003).

Eine Proteom-Analyse soll idealerweise alle Proteine in einer Probe erfassen und identifizieren. Bei jedem methodischen Schritt aber können Proteine verloren gehen oder übersehen werden, insbesondere dann, wenn sie vom Gros der Proteine abweichen. Schwachstellen sind dabei die Extrahierbarkeit der Proteine, ihre ausreichende Expression und möglicher Verlust der Proteine bei der Elektrophorese aufgrund ungewöhnlicher Größe oder Ladung (Cellini et al. 2004). So verwundert auch nicht, dass die Anzahl der mit 2DGE gefundenen pflanzlichen Proteine hinter den Schätzungen von den gesamten pflanzlichen Proteinen zurückbleibt. Corpillo et al. (2004) untersuchten in transgenen Tomaten die Expression von 40 Proteinen näher. Lehesranta et al. (2005) analysierten immerhin die Expression von 500 bis 1200 Proteinen in transgenen Kartoffelknollen.

Thiellement et al. (2002) sehen als große Limitierung weiterhin an, dass das zumeist untersuchte Proteom sich auf das gesamtlösliche Protein bezieht. Die dafür notwendigen Extraktionsmethoden erfassen damit nicht die Zellkern-Proteine sowie die hydrophoben Membran-assoziierten Proteine. Thiellement et al. (2002) schlagen deshalb vor, dass Proteom-Untersuchungen auch zelluläre Kompartimente (Organellen-Proteome) durch entsprechende Extraktionen erfassen sollten. Die Untersuchungen der FSA (2005d) kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass bei Blattextrakten von *Arabidopsis thaliana* Chloroplasten-Proteine derart stark vorhanden waren, dass sie die restlichen Proteine überlagerten. Deshalb musste die Extraktion so angepasst werden, dass in einem ersten Extraktionsschritt die Chloroplasten-Proteine entfernt wurden.

Wie das Transkriptom ist auch das Proteom gewebspezifisch. Gewebsspezifische Proteine unterliegen einer höheren Variabilität zwischen Genotypen als Gewebsunspezifische Proteine. Grund dafür könnte sein, dass Gene, die für Gewebsspezifische Proteine kodieren, durch eine große Anzahl an Genen reguliert werden (Thiellement et al. 2002).

Für eine allgemeine Auswertung und Nutzung von Proteomics in Bezug auf transgene Pflanzen fehlen bisher ausreichende Referenzdatenbanken. Die derzeit entwickelten und angebotenen Proteomics-Methoden lassen sich bei transgenen Pflanzen dazu verwenden, chimäre Proteine (neue Fusionsproteine), die aus einem neuen Open Reading Frame³⁵ am Insertionsort und neuen mRNA-Varianten hervorgehen, zu detektieren.

Zusätzlich schlagen Kuiper et al. (2003) vor, sich bei der Bewertung von transgenen Pflanzen auf solche Proteine zu konzentrieren, die an wichtigen Stoffwechselkreisläufen beteiligt sind. Wenn sich bei solchen Proteinen Änderungen ergeben, sollten genauere Untersuchungen folgen.

³⁵ Ein Open Reading Frame (ORF) ist ein Abschnitt der DNA-Sequenz zwischen dem Translation-Startsignal ATG (oder AUG) und dem terminierenden Kodon, der potentiell in eine Polypeptidsequenz translatiert werden kann. Wenn ein solcher ORF gestört wird, besteht die Möglichkeit, dass auch eine kodierende Sequenz, also ein echtes Gen, gestört werden kann.

Metabolomics

Metabolomics ist die Parallelanalyse einer Bandbreite primärer und sekundärer Stoffwechselprodukte und wird mithilfe hochauflösender Methoden durchgeführt. Die Stoffwechselprodukte werden aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften mithilfe der Gaschromatographie, Flüssighochdruckchromatographie oder Kapillarelektrophorese aufgetrennt und anschließend mithilfe der Massenspektrometrie oder Nuklear-Magnetik-Resonanz-Spektroskopie identifiziert. Um den Nachweis, die Identifizierung und Quantifizierung von einer großen Bandbreite an Substanzen zu führen, wird zumeist eine Kombinationen aus zwei Methoden eingesetzt (Kuiper et al. 2003).

Bei einzelnen Methoden sind jeweils unterschiedliche limitierende Faktoren zu beachten. Für die Nuklear-Magnetik-Resonanz-Spektroskopie beispielsweise weisen Defernez & Colquhoun (2003) darauf hin, dass einzelne Substanzen derart schnell interagieren, dass sie einen anderen Peak auslösen können. Auch imperfekte Signalregistrierung und mangelnde Auflösung können das Ergebnis eines metabolischen Profils verfälschen.

Primäre Stoffwechselprodukte, wie Einfachzucker, Aminosäuren, häufige Fette, allgemeine Stickstoff- oder Phosphorverbindungen sind relativ einfach zu analysieren, da sie in hohen Konzentrationen vorkommen und in der Regel auch Vergleichsdaten vorliegen. Möglicherweise prägen sich signifikante Unterschiede im primären Stoffwechsel auch in der Morphologie oder Physiologie, etwa der Wachstumsrate, der Pflanze aus (Firn 2006). Metabolite des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels sind schwieriger zu analysieren, da jede Pflanzenart ein eigenes Spektrum aufweist. Entwickelte Methoden sind daher nicht unbedingt für jede Pflanze zu verwenden, sondern nur für einzelne Pflanzenarten und nahe Verwandte anwendbar. Wenn nun ein Enzym des Sekundärstoffwechsel, die häufig unspezifische Reaktionen katalysieren, in einer transgenen Pflanze durch einen epigenetischen Effekt betroffen ist, können am Ende mehrere neue Produkte entstehen, deren Bestimmung eine Herausforderung darstellt (Firn 2006).

Eine besondere Herausforderung besteht zudem in der Verarbeitung der riesigen Datenmenge und dem fehlenden Wissen über die natürliche Variation (Kuiper et al. 2003). Grundsätzlich fehlen zudem meistens standardisierte Extraktionsprotokolle und Messverfahren. Um diesen Mangel an Standardisierung zu beheben, erfolgte aus dem FSA-Projekt (2005f) ein Vorschlag für ein standardisiertes Verfahren zur Dokumentation, Archivierung und Analyse bei Metabolomics-Experimenten (ArMet - architecture of metabolomics, Jenkins et al. 2004).

Einige Methoden, die das pflanzliche Metabolom näher charakterisieren, mögen sich bereits jetzt für ausgewählte Fragen der Lebensmittelsicherheit eignen. Wenn damit Fragen der Umweltsicherheit untersucht werden sollen, müssten die Methoden aber erneut daraufhin evaluiert und eventuell angepasst werden. Beispielsweise müssten dann auch andere als die als Lebensmittel verwendeten Pflanzenteile untersucht

werden. Tatsächlich erwies sich im Projekt der FSA (2005c) der Blätterextrakt von Weizen in seinem metabolomischen Profil als wesentlich komplexer als das Weizenmehl.

Tabelle 4: Forschungsprojekte der britischen Food Standards Agency (FSA): Analysemethoden zur Detektion unerwarteter Effekte, Laufzeit der Projekte: 2001-2005.

PROJEKT	UNTERSUCHTE PFLANZENTEILE	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	ERGEBNISSE
FSA 2005a G02001: Transcriptome, proteome and metabolome analysis to detect unintended effects in genetically modified potato	Kartoffelknollen aus zwei unabhängigen Feldversuchen in 2002	W2GBSS-Linien (Verzweigungsenzym-Gen der Stärkesynthese Glucan Branching Enzym unter der Kontrolle eines GBSS-Promoters) MAL1-Linien: Antisense-Gen des MAL1 unter der Kontrolle des 35S CaMV-Promotors	Metabolomics: hohe biologische Variabilität, Trend der transgenen Linien zu niedrigeren Glykoalkaloid-Gehalten (dies auch bei den Kontrollen, die nur Vektor enthalten oder Gewebekultur durchlaufen hatten) und zu einem höheren Vitamin C-Gehalt; Vektor-Linien und Gewebekultur-Linien deutlich unterschiedliche Chaconine; Solanin Verhältnisse. Proteomics: Datenbasis für Pflanzen nicht ausreichend für eine Auswertung der Ergebnisse aus diesem Ansatz; FSA empfiehlt 2DGE-Methode Transcriptomics: Suppression des endogenen Granule-bound Starch Synthetase-Gens; hervorgerufen durch den GBSS Promoter des Transgens; mehrere deutliche Unterschiede, aber Aussagekraft des Ansatzes muss verbessert werden (besonders Datenverarbeitung und technische Verbesserung des Arrays selbst)
FSA 2005b G02002: Methods for the analysis of GM wheat and barley seed for unexpected consequences of the transgenic insertion	Samen von Weizen und Gerste	Unterschiedliche Genkonstrukte: Ubiquitin oder 35S CaMV-Promotoren sowie folgende Gene und Kombinationen: - GUS - Luciferase / Amylase- Glykoamylase - DapA / Hygromycin-Resistenz - Hygromycin-Resistenz / GFP	Genomics: bei transgenen Gerstenlinien Gen-Insertion zumeist in Genreichen Regionen (-> Unterbrechung von Genen); bei transgenen Weizenlinien Insertion häufig in ein Retrotransposon, außerdem häufige Integration von DNA außerhalb der T-DNA Border Transcriptomics: in einer Linie signifikante Unterschiede in der Expression von 58 Genen (erhöhte oder verminderte Genexpression), dabei Erhöhung in der allergenen Gen-Familie Proteomics: keine neuen/chimären Proteine; teilweise Unterschiede in der Intensität der Proteinsynthese insgesamt oder von einzelnen Proteinen; eine transgene Linie mit starker Reduktion hochmolekularer Proteinuntereinheiten (könnte eher die Samenkeimung beeinträchtigen); in Gerstensamen Variation in den Speicherproteinen häufiger als in Weizensamen; dieselben Änderungen in der Intensität der Speicherproteine bei Linien, die mit demselben Konstrukt transformiert worden waren (Art des Konstrukt ist hierbei ausschlaggebender als der Ort der Insertion) Metabolomics: große Unterschiede in den Metaboliten insgesamt; Einflüsse der Gewebekultur erheblich; gentechnische Veränderung selektiert bei

Gutachten des Öko-Instituts „Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen: Auswirkungen auf die Risikobewertung“

<p>FSA 2005c G02003: Comparison of the metabolome and proteome of GM and non-GM wheat: defining substantial equivalence</p>	<p>Weizenmehl von drei Anbaujahren und von zwei unterschiedlichen Standorten für Metabolomics-Untersuchungen; Keimlingsgewebe und Weizenblätter</p>	<p>Änderung der Molekülmasse von Glutenin ³⁶</p>	<p>Gerste eine Teilmenge an Metaboliten; bei Weizen einige Unterschiede aufgrund gentechnischer Veränderung (widerspricht der Hypothese, dass hexaploider Weizen gentechnische Veränderung besser abpuffert als diploide Gerste)</p> <p>Proteomics: eine transgene Linie (B73-6-1) konnte von der Elternlinie über Proteom-Analysen deutlich unterschieden werden; die Ergebnisse, welche der Proteine abweichend sind, sind noch nicht veröffentlicht.</p> <p>Metabolomics: bei 1 von 4 transgenen Weizenlinien (B73-6-1) starke Abweichungen: 1999 von zwei Standorten und 2000 von einem Standort erhöhter Maltose-Gehalt; 2000 von dem anderen Standort erhöhter Sucrose-Gehalt; 2001 allerdings keine Unterschiede; auch Blätter dieser Linie weisen erhöhten Sucrose-Gehalt auf, sowie niedrigeren Gehalt an Glucose, Glutaminen und GABA; Unterschiede durch Umwelteinflüsse auf den Kohlehydratstoffwechsel größer als zwischen transgener und Ausgangslinie; sowie geringer als Unterschiede von verschiedenen Standorten und verschiedenen Jahren</p>
<p>FSA 2005d G02004: Development and comparison of molecular profiling methods for improved safety evaluation using GM brassicas</p>	<p>Blätter, Stamm und Blütenknospen von <i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Brassica oleracea</i></p>	<p>Gentechnische Veränderung mit: Vektor allein, beta-Glucuronidase (neutral) Ornithin-Decarboxylase (limitierter Einfluss auf Metabolome) Hydroxy-Cinnamoyl CoA Hydratase /Lyase (HCHL, signifikanter pleiotroper Effekt) Spermine Acetyltransferase (unbekannter Effekt)³⁷</p>	<p>Transcriptomics: minimale Effekte auf der Transkriptionsebene, signifikant lediglich im Fall des HCHL (signifikanter pleiotroper Effekt); in verschiedenen Linien unterschiedlich viele Gene hoch-, generell aber mehr Gene herunterreguliert (Stressreaktion auf das HCHL); Genexpression je nach Linie in der Regel unterschiedlich</p> <p>Proteomics: Datenset von 112 Protein bei Ultrazentrifugation und 309 bei normal extrahierten Proben</p> <p>Metabolomics: Lediglich Untersuchung der HCHL-Linien; Detektion von Unterschieden, die auf das transgene Protein zurückgeführt wurden</p> <p>In allen untersuchten Pflanzen größerer Einfluss durch Umweltstress auf die Transkription, das Proteinmuster und die Stoffwechselprodukte als durch die Insertion des Fremdgens</p>

³⁶ Siehe dazu auch: Barro et al. (1997); Rooke et al. (1999); Popineau et al. (2001); Darlington et al. (2003).

PROJEKT	UNTERSUCHTE PFLANZENTEILE	GENTECHNISCHE VERÄNDERUNG	ERGEBNISSE
FSA 2005e G02005: The application of metabolic profiling to the safety assessment of GM foods	Tomate; Kartoffel; Sojabohne	Tomaten: Transkriptionsfaktoren aus Mais, die den Isoprenoid-Stoffwechsel verstärken; Kartoffel: mit Carotinoid-Biosynthese Genen, nicht näher dargestellt; Roundup Ready-Sojabohne	Gas-Chromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) die robusteste und zuverlässigste Methode im Projekt; bei Sojabohnen jedoch erheblicher Einfluss durch Probenvorbereitung auf das Analyseergebnis; Identifizierung von unbekanntem Metaboliten möglich; sehr geringe unerwartete Veränderungen, im allgemeinen von Änderungen der Aminosäuregehalte verursacht
FSA 2005f G02006: Metabolome technology for the profiling of GM and conventionally bred plant materials	Kartoffel	Gene zur Fructan-(Fructosylfructose-Transferase) und Inulin-Synthese (Sucrose-Sucrose-Transferase)	Unterscheidung von transgenen und konventionellen Kartoffeln möglich; Variation zwischen den Ausgangslinien vergleichbar mit Unterschieden zwischen transgen und nicht-transgen

³⁷ Siehe auch Burtin & Michael (1997); Mayer & Michael (2003).

Fazit

Die Projekte der FSA (FSA 2005a, b, c, d, e, f) kommen durchgehend zu dem Ergebnis, dass die jeweiligen Methoden durchaus den Zweck erfüllen, die transgenen Pflanzen von den Kontrollproben zu unterscheiden. Auch konnten alle entwickelten und angewandten Methoden gewisse unbeabsichtigte Effekte feststellen. Weiterhin kamen alle Projekte zu dem Ergebnis, dass die natürliche Variation der untersuchten Parameter zumeist größer ist als die Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und Kontrolllinien. Sorteneigenschaften wie auch Umweltbedingungen lösten teilweise einen größeren Unterschied aus, als die Unterschiede, die zwischen transgenen Pflanzen und Kontrolllinien festzustellen waren. Die unbeabsichtigten Effekte wurden deshalb als nicht relevant für die Lebensmittelsicherheit eingestuft.

Generell wird die Untersuchung des Metaboloms als am meisten zielführend eingeschätzt. Zu diesem Schluss kommt auch die FSA (2005c): In den Untersuchungen an transgenem Weizen wurden Unterschiede zwischen transgenen Pflanzen und Kontrollpflanzen am ehesten auf der Ebene des Metaboloms sichtbar und nachweisbar. Der Nachweis war bei den Proteomen schwieriger und bei den Transkriptomen am wenigsten erkennbar.

Firn (2006) zweifelt generell daran, dass mit Proteomanalysen die Funktionsweise der Zelle abgeschätzt werden kann, da unbekannte Enzyminhibitoren das Analyseergebnis verfälschen können. Stattdessen hält er es für zielführender, über die Produkte der Enzyme die Zellfunktionen abzuschätzen. Allerdings kritisiert Firn (2006), dass bei Metabolomics-Untersuchungen ausschlaggebend ist, wie sensitiv die Analysen sind (level of sensitivity).

In einzelnen Modellpflanzen mögen einige Methoden der Omics-Technologien schon weit entwickelt zu sein. Microarrays für *Arabidopsis thaliana* beispielsweise scheinen sehr sensitiv zu funktionieren und liefern quantitative Daten, die Vergleiche zwischen Wildformen und bestimmten Mutanten oder transgenen Linien erlauben (Weigel 2005).

Insgesamt aber stecken die Profiling-Methoden noch in den Anfängen der Entwicklung, so dass sie höchstens mittelfristig eine Hilfe bei der Analyse von unbeabsichtigten Effekten bieten werden. Auch Cellini et al. (2004) weisen darauf hin, dass die Methoden weitere Evaluationen benötigen.

Unter anderem besteht das Problem darin, dass die untersuchten Parameter, die Genexpression, Proteinsynthese und der Metabolismus, nicht nur gewebsspezifisch sind, sondern auch von der Entwicklung und dem Alter des Gewebes abhängen und zusätzlich je nach Umwelteinflüssen stark schwanken können. Was Nutzpflanzen angeht, gibt es zudem erhebliche sortenspezifische Unterschiede. Das bedeutet, dass die Profiling-Methoden zunächst einen „Schnappschuss“ des Transkriptoms, des Proteoms oder des Metaboloms liefern. Hier stellt sich daher auch die Frage, welche weiteren Pflanzen oder Sorten in den Vergleich miteinbezogen werden, um zu einer Bewertung der transgenen Linie zu gelangen. Das Problem des Komparators wird deshalb gesondert im folgenden Abschnitt besprochen.

Bei den Omics-Technologien entstehen zudem sehr große Datenmengen, so dass passende Datenverarbeitungssysteme entwickelt werden müssen.

Möglichkeiten, Profiling-Methoden zu kombinieren, um zusätzliche Erkenntnisse zu gewinnen, stecken noch in den Anfängen der Entwicklung. So bietet beispielsweise die Kombination von Proteomics und Metabolomics die Chance, die physiologischen Funktionen von Enzymen weiter zu erforschen. Schließlich ist die Funktion von einzelnen Substanzen im sekundären Stoffwechsel nicht immer bekannt. Das heißt, dass nur sehr beschränkt eine Voraussage getroffen werden kann, welche Unterschiede bei bestimmten Substanzen beispielsweise eine Veränderung im Phänotyp hervorrufen würden.³⁸ Der Erfolg von Omics-Methoden kann also nur dann gelingen, wenn die Ergebnisse in Zukunft auch mit dem Wissen aus anderen Bereichen der Biologie verknüpft werden.

Kuiper et al. (2003) sehen den Einsatz der Profiling-Methoden vor allem bei transgenen Pflanzen, die einen verbesserten Nährwert oder gesundheitsfördernde Eigenschaften haben sollen. Bei solchen transgenen Pflanzen werden explizit die Inhaltsstoffe verändert. Solche Veränderungen sollen mit den Profiling-Methoden überprüft und kontrolliert werden.

Generell werden Omics-Technologien zur Untersuchung von transgenen Pflanzen entwickelt, um eine Bewertung nach dem Konzept der substantiellen Äquivalenz zu verbessern. Auf kürzere Sicht könnten die Profiling-Methoden im Kontext der Lebensmittelsicherheit eingesetzt werden. Dabei ist aber nicht unbedingt vorgesehen, dass nicht-zielgerichtet vorgegangen und ein Parameter bzw. eine Stoffklasse in ihrer Gesamtheit erfasst wird. Vielmehr wird selektiv vorgegangen, etwa wenn beim Design der Arrays, eine bestimmte mRNA-Population ausgewählt wird. Oder es wird lediglich ein Ausschnitt des Proteoms auf die Bildung von Fusionsproteinen analysiert.

Soweit für einzelne Nutzpflanzen Profiling-Methoden zur Verfügung stehen, sollten sie auch in einer Risikobewertung eingesetzt werden. Da die Anwendung der Omics-Technologien für eine Risikobewertung transgener Pflanzen noch in den Anfängen steckt, sollten Unterschiede, die mit Omics-Technologien detektiert werden, grundsätzlich weiter verfolgt werden, um ihre Bedeutung aufzuklären. Denn selbst wenn die Unterschiede im ersten Schritt nicht als relevant eingestuft werden, können sie einen Biomarker für weitere Veränderungen darstellen.

Der Möglichkeit, Omics-Technologien auch im Bereich der Umweltverträglichkeitsprüfung einzusetzen, sollte verstärkt nachgegangen werden.

³⁸ Beispielsweise fanden Defernez et al. (2004) in zwei von vier transgenen Kartoffellinien, deren Polyamin-Stoffwechsel modifiziert wurde, signifikante Unterschiede bei Prolin und Trigonellin und einigen phenolischen Stoffen. Vor allem aber wiesen diese zwei Kartoffellinien unerwarteterweise einen sehr stark veränderten Phänotyp auf.

3.3.2 Problem des Komparators

Bei transgenen Pflanzen gilt üblicherweise, dass als Vergleichspartner möglichst isogene Ausgangslinien heranzuziehen sind. Die Freisetzungsrichtlinie 2001/18/EG sagt hierzu: „Alle Merkmale der GVO, die mit der genetischen Veränderung in Verbindung stehen und schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt haben könnten, sind zu ermitteln. Der Vergleich der Merkmale der GVO mit denen des unveränderten Organismus unter gleichen Bedingungen für die Freisetzung oder Nutzung erleichtern die Ermittlung spezifischer schädlicher Auswirkungen, die aufgrund der genetischen Veränderung auftreten können. Wichtig dabei ist, dass keine etwaigen schädlichen Auswirkungen deshalb außer Acht gelassen werden, weil deren Auftreten als unwahrscheinlich angesehen wird.“³⁹

Bezüglich der Biologie der Pflanze gibt das Guidance Document der EFSA (2004) direkt vor, dass zu prüfen ist, ob die transgene Pflanze von der Elternlinie oder einer isogenen Linie abweicht.⁴⁰ Für die Analyse der Inhaltsstoffe wird in dem Guidance Document (EFSA 2004) allerdings darauf hingewiesen, dass andere konventionelle Sorten in den Vergleich miteinbezogen werden sollen.⁴¹ Auch die Empfehlungen der britischen FSA gehen dahin, dass bei Omics-Technologien der Vergleichspartner nicht mehr die isogene Ausgangslinie allein sein sollte. Vielmehr sollen noch weitere konventionelle Sorten hinzugezogen werden. Auch andere Forschungsprojekte verfolgen den Ansatz, die Änderung der Inhaltsstoffe bei konventioneller Züchtung und bei gentechnischer Veränderung miteinander zu vergleichen (z.B. SAFE FOODS⁴²).

Denkbar wäre es, zusätzlich weitere Kontrolllinien einzubeziehen. Das GMOCARE-Projekt etwa berücksichtigte in seinen Analysen neben den transgenen Linien auch

³⁹ 2001/18/EG, Anhang II, C2; L 106/20. Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften 17.04.2001.

⁴⁰ Seite 21: „The applicant should identify whether the GM plant differs from the parental or near isogenic non-GM plant in its biology. This should include information on biological features that affect fitness and environmental sensitivity (e.g. multiplication, dormancy, survivability, dispersal, outcrossing ability, stress tolerance, and sensitivity to specific agents). The information provided should be linked to environmental risk assessment including interaction with other organisms and the environment [...]“

⁴¹ Seite 22 f: „Choice of the comparator

In the case of vegetatively propagated crops, comparative analyses should include the non-genetically modified isogenic variety used to generate the transgenic lines. In the case of crops that reproduce sexually, comparators would include appropriate non-GM lines of comparable genetic background. Since many crops used to produce food and feed are developed using back-crossing, it is important that in such cases, tests for morphological, agronomical and chemical similarity use the most appropriate controls and do not simply rely on comparisons with the non-genetically modified material originally used for the genetic modification. For example, non-GM parental lines may be used in crosses to generate the final product.

Evaluation of the extent of equivalence will be greatly enhanced by additional, valid compositional comparisons between the genetically modified plant and commercial varieties of the crop species in question (which have a known history of safe use). The data for the commercial varieties used in the comparison may be generated by the applicant and/or compiled from the literature. The databases used for comparison should be specified. When using literature data, however, they have to be adequately assessed for their quality (e.g. type of material analyzed, analytical method used). Ranges as well as mean values should be reported and considered. These data would indicate whether the GM lines fall within the natural range in component concentrations found in non-GM counterparts. It should be noted that the soil composition might influence levels of compounds in plants and should be taken into consideration when comparing analytical data from field studies with literature data. Where events are combined by the interbreeding of GM lines, the appropriate comparator will be the non-GM equivalent. Where this is not possible (e.g. in vegetatively propagated crops) the GM parental lines are appropriate comparators.“

⁴² <http://www.onderzoekinformatie.nl/en/oi/nod/onderzoek/OND1309603/>

Linien, die einen „leeren“ Vektor enthielten und solche, die nicht-transformiert den Schritt der Gewebekultur durchlaufen hatten. In den Untersuchungen der FSA wiesen die Kontrolllinien, die eine Phase der Zellkultur durchlaufen hatten, ebenfalls Unterschiede im Vergleich zu nicht behandelten Ausgangslinie auf. Die FSA vertritt deshalb die Meinung, dass die Unterschiede bei transgenen Pflanzen grundsätzlich eher durch die Gewebekultur als durch die genetische Modifikation ausgelöst wurden, und dass die Gewebekultivierung einen bislang unterschätzten Einfluss auf die Zusammensetzung der Inhaltsstoffe hat.⁴³ In der Tat kann die Gewebekultur zahlreiche genomische Veränderungen auslösen (siehe Abschnitt 3.1.5).

Aber nicht nur bei den Omics-Technologien sondern auch in anderen Bereichen stellt sich das Problem des Komparators, bzw. die Frage, welcher Zustand als Ausgangspunkt oder Baseline genommen wird.

Auch bei Untersuchungen, die die genetische Ebene betreffen, wird die Ansicht vertreten, dass die möglichen Unterschiede mit den genetischen Veränderungen, die im Zuge konventioneller Züchtung entstehen, verglichen werden sollen (Bradford et al. 2005). Dafür müssten allerdings verschiedene Züchtungsmethoden der sogenannten konventionellen Züchtung grundlegend untersucht werden, um ihre Eingriffstiefe und das Ausmaß ihrer genomischen Veränderungen bewerten zu können (siehe auch 4.1.1).⁴⁴

Bei der Umweltverträglichkeitsprüfung gibt es Überlegungen, ob beispielsweise bei den Auswirkungen auf Nicht-Zielorganismen und allgemein auf die Biodiversität der Anbau transgener Pflanzen nur mit dem konventionellen intensiven Anbau verglichen werden sollte, oder ob zusätzlich Vergleichsdaten zur Biodiversität aus dem integrierten und ökologischen Anbau aufgenommen werden sollten.

Die Fragen, bei welchen Untersuchungen welcher Komparator eingesetzt werden sollte, bedarf allgemein einer ausführlichen Diskussion und Klärung, die nicht nur in der EFSA und ihren Ausschüssen geführt und entschieden werden sollte.

3.3.3 Fazit

Die derzeitige Diskussion um unbeabsichtigte pleiotrope Effekte durch gentechnische Veränderungen konzentriert sich auf die Untersuchung von Inhaltsstoffen. Hierzu findet eine konzentrierte und systematische Forschung statt.

Problematisch bei pleiotropen Effekten ist letztendlich aber die Bewertung von Fällen, bei denen signifikante Unterschiede zwischen der transgenen Pflanze und den Vergleichspflanzen nachgewiesen wurden. Das Guidance Document der EFSA (2004)

⁴³ Die Tatsache, dass Gewebekultur Veränderungen auf genetischer Ebene auslöst, sogenannte somaklonale Variation, ist wie gesagt keine neue Erkenntnis. Dennoch wäre ein Review und Vergleich von molekularen Züchtungstechniken, wie Protoplastenfusion oder Mutationsinduktion durch Strahlung, und deren unerwartete Auswirkungen interessant.

⁴⁴ In Kanada fallen Pflanzen, die aus Mutationszüchtung hervorgehen, unter dieselbe Regulierung wie GVO auch (<http://agbios.com/main.php>).

weist wiederholt darauf hin, bei der Kompositionsanalyse die natürliche Varianz zu bedenken. Lediglich bei Unterschieden, die außerhalb dieser Bandbreite liegen, sollen weitere Untersuchungen folgen.⁴⁵ Einstimmige Bedenken, die im Zulassungsverfahren einer transgenen Pflanze zum Tragen kommen könnten, sind zurzeit lediglich im Falle einer sehr starken Erhöhung anti-nutritiver Stoffe zu erwarten.

Nach Seralini (2006) allerdings sind die Untersuchungen zur Zusammensetzung und die Analysen zur substantiellen Äquivalenz bei weitem nicht ausreichend, um transgene Pflanzen auf Toxizität zu testen. Seralini (2006) fordert deshalb, dass mit der gesamten transgenen Pflanze obligatorische Toxizitätstest nach der Richtlinie über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln 90/414/EWG durchgeführt werden. Diese Richtlinie sieht Tests mit drei Säugetierarten über 90 Tage vor, sowie mit einer Säugetierart über ein Jahr und mit einer anderen Art über zwei Jahre. Schubert (2005) fordert Fütterungsstudien an Nagetieren, die über mehrere Generationen gehen. Auf diese Weise könnten Effekte, die möglicherweise zu Fehlbildungen führen oder Entwicklungsstörungen hervorrufen, festgestellt werden. Eine solche Forderung wird auch von Pusztai (2002 und Pusztai et al. 2003) unterstützt, der bisherige Fütterungsstudien auch deshalb kritisiert, weil sie ausschließlich an ausgewachsenen Tieren, zumeist Ratten, durchgeführt werden.

Allerdings sollten aus Tierschutzgründen alternative Methoden zum Test von langfristigen und nicht akut-toxischen Wirkungen auf die menschliche Gesundheit stark gefördert werden. Tests an Zellkulturen sind bisher aber nicht mit den komplexen Mischungen, wie sie Pflanzenteile darstellen, möglich. Auch Tests an Zellkulturen, die mit unterschiedlichen Konzentrationen eine Dosis-Wirkung-Beziehung ableiten, können mit den komplexen Mischungen der Pflanzen nicht erzielt werden.

Ob pleiotrope Effekte, die mit Omics-Technologien festgestellt werden, schädliche Auswirkungen auf die Umwelt haben können, ist aufgrund des lückenhaften Verständnisses der komplexen Interaktionen, die für die ökologisch relevanten Charakteristika verantwortlich sind, bisher kaum möglich. Sorgfältige Bio-Tests im Labor und im Gewächshaus bleiben deshalb unerlässlich. Auch Poerschmann et al. (2005), die einen erhöhten Bt-Gehalt in den Stängeln von transgenen Maispflanzen fanden, verweisen darauf, dass weitere Untersuchungen zur Relevanz des Ergebnisses nötig sind. In dem Fall wären etwa Versuche zum Abbauverhalten von Maisstängeln im Boden und mögliche Auswirkungen auf im Boden lebende Mikroorganismen und Zersetzer angebracht.

Bei den Hinweisen auf eine direkte, aufgrund von pleiotropen Effekten veränderte Nektarproduktion bei Nektar-produzierenden transgenen Nutzpflanzen, die einen Einfluss auf bestäubende Insekten haben kann (Pierre et al. 2003; Hinweise finden

⁴⁵ Seite 24: "c) the baseline used for consideration of natural variations

Statistically significant differences in composition between the modified crop and its non-genetically modified comparator grown and harvested under the same conditions should trigger further investigations as to the relationship between the identified difference and the genetic modification process. Modifications that fall outside normal ranges of variation will require further assessment to determine any biological significance."

sich auch bei Haughton et al. (2003). So könnte weiterführend beispielsweise das Sammelverhalten von bestäubenden Insekten untersucht werden.

Bei insektenresistentem Mais sollten Hinweise auf eine erhöhte Lignin-Konzentration auf ihre Auswirkungen auf beispielsweise Zersetzer weiter verfolgt werden (Büchs et al. 2004).

Solange es fraglich ist, ob auch die Omics-Technologien genügend sensitiv sind, um relevante Änderungen feststellen zu können, und solange das Wissen, welche Unterschiede in der Konzentration von Inhaltsstoffen relevant sind, lückenhaft ist, sollte weiterhin als Vergleichspartner die Ausgangslinie oder eine isogenen Linie verwendet werden. Werden zwischen den transgenen Pflanzen und der isogenen Ausgangslinie signifikante Unterschiede festgestellt, sollte solchen Unterschieden weiter nachgegangen und zusätzliche Untersuchungen angestellt werden.

4. Empfehlungen für die Risikobewertung

Die folgenden Kapitel enthalten Empfehlungen, wie epigenetische Effekte bei der Risikobewertung transgener Pflanzen berücksichtigt werden könnten und sollten. Dabei werden entsprechende Vorschläge der Anleitung des wissenschaftlichen Ausschusses der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, EFSA, für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen und daraus hergestellten Lebens- und Futtermitteln (EFSA 2004) diskutiert und Erweiterungen vorgeschlagen. In die Empfehlungen für die Risikobewertung sind die Ergebnisse aus der Expertenbefragung eingeflossen.

Die Empfehlungen folgen dem Gedanken des Vorsorgeprinzips, das auch der Europäischen Gesetzgebung zugrunde liegt.⁴⁶ Die Tatsache, dass die Sicherheit transgener Pflanzen nicht abschließend gezeigt ist, macht weitergehende Analysen für eine Zulassung in der EU notwendig.⁴⁷

Das Vorsorgeprinzip sollte sich zum einen im Umfang der Untersuchungen niederschlagen und zum anderen in einer vorsichtigen Bewertung, wenn Unterschiede, zwischen der transgenen Pflanze und den Vergleichspartnern festgestellt wurden. Diese Evaluation der Ergebnisse stellt schließlich einen normativen Schritt in der Risikobewertung dar.

Für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen beschreibt das Guidance Document der EFSA (2004) allgemeine Grundsätze für Untersuchungen der genetischen Ebene als die wichtigste Referenz. Daneben werden allgemeine Grundsätze für die Untersuchungen zur Morphologie und Biologie der transgenen Pflanze und die Untersuchung der Inhaltsstoffe, insgesamt als epigenetische Ebene bezeichnet, empfohlen.

Da die EFSA (2004) nicht von epigenetischen, sondern von unbeabsichtigten Effekten spricht, wird im Folgenden hauptsächlich dieser Begriff verwendet.

4.1 Die Referenz: die genetische Ebene

Den Dreh- und Angelpunkt der Analyse von unbeabsichtigten Effekten sieht die EFSA (2004) in der Analyse auf genetischer Ebene. Tatsächlich ist eine gründliche molekulare Charakterisierung bei dem derzeitigen Stand der Wissenschaft und Technik der wichtigste Ausgangspunkt, um abzuschätzen, ob pleiotrope und epigenetische Effekte eintreten können.

Die EFSA (2004) schreibt vor, dass folgende Informationen über das Insert bzw. die Insertionen und den Insertionsort angegeben werden sollen:

⁴⁶ Mitteilung der Kommission die Anwendbarkeit des Vorsorgeprinzips. KOM (2000) 1 endgültig. Februar 2000. http://europa.eu.int/eur-lex/de/com/cnc/2000/com2000_0001de01.pdf

⁴⁷ Während etwa die US-amerikanische Zulassung bei transgenen Pflanzen nicht davon ausgeht, dass diese mehr Risiken als klassische Hybride bergen, kann der europäische Ansatz mit Aussagen wie „Wir-wissen-es-nicht“ oder einem „Vielleicht“ umschrieben werden (Serralini 2006).

- Anzahl und Größe der inserierten Kopien, sowie deren subzelluläre Lokalisation (ob in den Kern oder in Chloroplasten oder Mitochondrien), wie auch Anzahl und Größe von Teilen des Vektors oder von der Carrier-DNA oder fremder DNA; dies kann bzw. darf über eine Southern Analysis bestimmt werden;
- Organisation der Insertionsorte, d.h. ob Deletionen oder Umordnungen aufgetreten sind;
- im Falle einer Deletion die Größe und Funktion derselben.

Richtlinien, welche Methoden oder welches Methodenset mindestens angewendet werden sollten, fehlen allerdings in dem Guidance Document. Das bedeutet, dass keine Minimalstandards zur molekularen Charakterisierung von transgenen Pflanzen gesetzt werden. Auch in naher Zukunft wird sich dies vermutlich nicht ändern, da beispielsweise keine Bestrebungen bestehen, eine Arbeitsgruppe des GMO Panels der EFSA zu diesem Thema einzusetzen. Auch im Europäischen Komitee für Normung gibt es bisher keine entsprechende Arbeitsgruppe.

Zur Bestimmung der Kopienzahl des Inserts empfiehlt die EFSA (2004) eine Southern Blot Analyse⁴⁸, was auch von Fladung (2005) so unterstützt wird. Die EFSA (2004) schlägt vor, dass die Sonden für die Southern Blot Analyse die komplette Sequenz des Inserts, alle Teile des Vektors und alle Träger fremder DNA abdecken sollen. Wilson et al. (2004) mahnen aber an, dass die Southern Blot Analyse zwar Aufschluss über Anzahl und Größe der inserierten Kopien gibt, unter Umständen aber Fragmente des Transgenkonstruktes nicht nachweist. Zudem gibt eine Southern Blot Analyse nicht immer Aufschluss über Deletionen und Umordnungen am Insertionsort.

Eine Sequenzierung des gesamten Inserts bzw. der Insertionen ist bisher für eine Zulassung nicht vorgeschrieben. Dies wäre als Kontrolle allerdings dringend anzuraten. Nachträgliche Untersuchungen von transgenen Pflanzen, die bereits eine kommerzielle Zulassung in der EU besaßen, zeigten, dass durch oder nach der gentechnischen Veränderung das Transgenkonstrukt nicht mehr dem Ausgangskonstrukt entsprach, welches von den Antragstellern angegeben wurde (Collonnier et al. 2003; Hernandez 2003; Holck et al. 2002; Windels et al. 2001)⁴⁹.

Steinbrecher (2005) hält deshalb eine DNA-Sequenzierung des Transgeninserts für notwendig. Weigel (2005) betont, dass die Sequenzierung des Inserts keinen großen Aufwand darstellt und zudem als Kontrolle durchgeführt werden sollte. Auch für Meins

⁴⁸ Bei einer Southern Blot-Analyse wird die zu untersuchende DNA zunächst mit Restriktionsenzymen „zerschnitten“. Die DNA-Stücke werden anschließend durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt und auf eine Membran (meist Nylon oder Nitrocellulose) übertragen und dort dauerhaft fixiert. Mit einer chemisch oder radioaktiv markierten Gensonde kann die gesuchte Gensequenz auf der Membran sichtbar gemacht werden. Diese Gensonde besteht aus einzelsträngiger DNA und ist komplementär zur Sequenz des Transgens. Es können auch mehrere Sonden nacheinander verwendet werden.

⁴⁹ Diese Untersuchungen hatten eigentlich zum Ziel, Event-spezifische Nachweismethoden zu ermitteln, die für die europäische Kennzeichnung und Rückverfolgbarkeit notwendig sind. Die Forschungsprojekte, QPCRGMOFood, die ebenfalls innerhalb des Verbundes Entransfood zusammengefasst sind, werden aus dem 5. Europäischen Forschungsrahmenprogramm finanziert. Die Event-spezifischen Nachweismethoden müssen nach den neuen europäischen Verordnungen vom Antragsteller geliefert werden.

(2005) gehört die Sequenzierung des Inserts zum Bestandteil der molekularen Charakterisierung eines GVO. Fladung (2005) hält eine Sequenzierung, sofern die Struktur des Transgeninsertionsortes durch Restriktionsversuche überprüft wurde, hingegen nicht für sinnvoll. Restriktionsversuche zeigen, dass sich alle Komponenten der T-DNA in der gleichen Reihenfolge befinden wie im Ausgangskonstrukt. Fladung (2005) hält es aber bei GVO, die in den Verkehr gebracht werden sollen, nicht für unangemessen, einmal exemplarisch das Konstrukt nach Insertion zu sequenzieren.

Steinbrecher (2005) fordert hingegen eine wiederholte Analyse des Inserts über zehn oder mehr Generationen, da die Stabilität von Transgenen noch nicht abschließend geklärt ist (Latham et al. 2006).

Charakterisierung der Umgebung eines Inserts

Das Guidance Document der EFSA (2004) empfiehlt, dass von beiden Insertenden ausgehend die benachbarten Sequenzen der pflanzlichen DNA bestimmt werden. Die Sequenzierung der sogenannten flankierenden Regionen liefert zum einen den Event-spezifischen Nachweis. Zum anderen soll die flankierende Sequenz darüber Aufschluss geben, ob durch die Insertion ein Open Reading Frame⁵⁰ gestört wurde. Potenziell kann durch die Insertion auch ein neuer Open Reading Frame entstehen, so dass neue chimäre Proteine synthetisiert werden können.

Über die Länge der flankierenden Regionen, die sequenziert werden sollten, sagt die EFSA (2004) nichts aus. Nach Steinbrecher (2005) soll sich diese Sequenzierung über mindestens 50 kilo Basenpaare in das pflanzliche Genom hinein erstrecken. Um zu überprüfen, ob ein eventuell vorhandenes pflanzliches Gen gestört wurde, hält Meins (2005) eine Sequenzlänge von 100 bis 200 Basenpaare für ausreichend. Fladung (2005) schlägt eine Länge von 100 bis 300 Basenpaaren vor. Nach Weigel (2005) sollte bei der Frage der Sequenzlänge mit berücksichtigt werden, ob es sich bei der transgenen Pflanze um eine Art mit mehr oder weniger schnell evolvierendem Genom handelt. Da Maissorten sehr unterschiedlich sind, sollte dort zum Beispiel eine längere flankierende Sequenz sequenziert werden.

Steinbrecher (2005) schlägt zudem vor, dass zusätzlich im Genom der nicht-transformierten Ausgangslinie dort, wo das Konstrukt in der transgenen Linie inseriert ist (genomic target sequences), ebenfalls eine Länge von 50 kilo Basenpaare als Referenz sequenziert werden sollte, um vergleichend genomische Mutationen am und um den Insertionsort ermitteln zu können.

Falls ein Open Reading Frame oder ein pflanzliches Gen durch das Insert betroffen sind, sieht die EFSA (2004) vor, dass die mögliche Bildung von Fusionsproteinen durch bioinformatische Analysen ausgeschlossen wird. Nur wenn die bioinformatischen Analysen darauf hinweisen, dass ein Fusionsprotein gebildet werden könnte, sollten

⁵⁰ Siehe Erklärung auf Seite 32.

diese potentiellen chimären Proteine durch toxikologische und allergologische Analysen weiter untersucht werden⁵¹.

Das Konzept, den Open Reading Frame als Anhaltspunkt für die Störung von funktionellen Bereichen des pflanzlichen Genoms zu nehmen, birgt dennoch eine Reihe von Beschränkungen, die in den folgenden Gründen liegen (EFSA 2004):

- Informationen zum Genom der betreffenden Nutzpflanzen sind in Genomdatenbanken nur limitiert vorhanden.
- Nicht alle Funktionen bzw. deren zugrundeliegende Sequenzmuster sind bekannt. Dies gilt insbesondere für nicht-kodierende Sequenzen, z.B. Promotoren und Verstärker und generell regulatorische Sequenzen, die zudem von dem Gen, das sie regulieren, auf dem DNA-Strang weit entfernt liegen können (Bonifer 2000).
- Die Bewertung eines ORF ist kaum möglich. Beispielsweise ist die Störung von multifunktionellen Genen gravierend und schwerer zu detektieren.

Wichtig ist in diesem Zusammenhang auch, dass Insertionen zumeist in AT-reiche und damit Gen-reiche Regionen stattfinden. Das erhöht generell die Möglichkeit, dass Gene bzw. Open Reading Frames unterbrochen werden können (Cellini et al. 2004; FSA 2005b, Salvo-Garrido et al. 2004; siehe 3.2).

Steinbrecher (2005) schlägt deshalb vor, dass die Expression des Transgens dahingehend untersucht wird, ob aberrante (abweichende) Transkripte auftreten. Dies wurde beispielsweise in der transgenen Roundup Ready-Sojabohne festgestellt (Rang et al. 2005). Die Möglichkeit von aberranter mRNA und damit möglicherweise unbekanntem Fusionsproteinen sollte mit praktischen Untersuchungen untermauert und nicht nur über theoretische Konzepte abgedeckt werden.

Genomweite Untersuchungen nach Zellkultur?

Nach Meins (2005) ist es allgemein anerkannt, dass Zellkulturen genetische Veränderungen und epigenetische Effekte auslösen können (siehe auch 3.1.5). Da solche Effekte unerwünscht sind, sollte nach Meins (2005) der Schritt der Zellkultur möglichst vermieden werden. Anwendungsreife Protokolle stehen aber noch nicht für alle Nutzpflanzen zur Verfügung. Das bedeutet, dass bei allen zugelassenen und zur Zulassung beantragten transgenen Pflanzen von einer Phase der Zellkultur ausgegangen werden muss.

⁵¹ Seite 20: "Secondly, flanking sequence data may identify insertion into, and interruptions of, known ORFs or regulatory regions and/or the potential for insertional events to produce novel chimeric proteins. If potential chimeric ORFs are identified bioinformatic analyses should be conducted to investigate the possibility for similarities with known toxins or allergens. Depending on the information gathered, further analyses may be needed to complete the information necessary for a comprehensive risk assessment. For example transcriptional and/or translational data may be required to investigate if novel proteins are synthesised. Where DNA from mitochondria or chloroplasts flanks the insert, as can occur with biolistic delivery methods, sequence data should, wherever possible, extend into the nuclear genome of the parent plant. PCR amplification of the flanking sequences both adjacent to and across the insertion point in the parent plant could be used to demonstrate that this has been achieved."

Transgene Pflanzen, die eine Phase der Zellkultur durchlaufen haben, sollten wegen der Möglichkeit somaklonaler Variationen auf genomweite Mutationen hin untersucht werden, zumal diese induzierten Mutationen vererbbar sind (Latham et al. 2006). Hierfür empfehlen sich verschiedene Analysemethoden wie RFLP, AFLP, RAPID und RAMP⁵². Steinbrecher (2005) fordert ausdrücklich eine genomweite Analyse zur Aufdeckung von DNA-Polymorphismen.

4.1.1 Bewertung der genetischen Ebene

Die möglichst genaue molekulare Charakterisierung der transgenen Pflanzen ist teilweise der Erkenntnis geschuldet, dass die gentechnische Veränderung nicht nur den gewünschten Effekt haben kann. Grundsätzlich gilt, dass je umfangreicher Änderungen im pflanzlichen Genom stattgefunden haben, desto mehr muss mit epigenetischen Effekten in den transgenen Pflanzen gerechnet werden.

Entsprechend dem Guidance Document der EFSA (2004) sollen das Genkonstrukt oder die Insertionen einen möglichst kleinen Umfang haben und keine komplexen Insertionen aufweisen. Auch die befragten Experten äußerten sich ähnlich: Unter anderem von Weigel (2005) wurde angeführt, dass bei einer Transgeninsertion ohne Umordnungen oder Deletionen epigenetische Effekte unwahrscheinlicher sind. Fladung formulierte folgende Vorbedingung für eine stabile transgene Pflanze: Aus der großen Zahl von Primärtransformanten sollte diejenige transgene Ausgangspflanze ausgewählt werden, die lediglich eine Kopie des transgenen Konstruktes aufweist. Auf diese Weise soll ausgeschlossen werden, dass beispielsweise Transgen-Repeats (Wiederholungen) vorliegen. Außerdem darf die Insertion nicht in eine kodierende Region erfolgt sein. Steinbrecher (2005) empfiehlt generell für die Bewertung, dass lediglich solche transgenen Pflanzen für eine Zulassung in Betracht gezogen werden sollten, die eine Insertion des gewünschten Genkonstruktes ohne zusätzliche genomische Umordnungen enthalten.

Gessler (2006) hingegen sieht als Minimalstandards für die gentechnische Veränderung von Pflanzen, dass keine artfremden Gene und Promotoren verwendet werden. Außerdem sollte über homologe Rekombination eine zielgerichtete Insertion erfolgen, die möglichst sogar eine bestimmte Sequenz im Genom ersetzt.

⁵² RFLP (**R**estriktions**F**ragment**L**ängen-**P**olymorphismus): Das Genom wird mit Endonuklease an bestimmten Erkennungsstellen „zerschnitten“. Dadurch entsteht ein charakteristisches Muster an unterschiedlich langen DNA-Fragmenten, den Restriktionslängen. Aufgrund von Mutationen verändert sich ein solches RFLP-Muster, denn Erkennungsstellen für die Endonukleasen können verloren gehen oder neu entstehen.

AFLP (**A**mplified **F**ragment **L**ength **P**olymorphism = Vervielfältigter Fragmentlängenpolymorphismus): Das Genom wird ebenfalls mit Endonukleasen behandelt. Von den DNA-Spaltprodukten werden anschließend mit einer selektiven PCR relativ kurze DNA-Fragmente vervielfältigt, die ein spezifisches DNA-Bandenmuster ergeben.

RAPID (**R**andom **A**mplified **P**olymorphic **D**N = Zufällig Vervielfältigter DNA-Polymorphismus): Kurze (8-13 bp), zufällig zusammengesetzte Oligonukleotide werden in einer PCR als Primer verwendet. Die Wahrscheinlichkeit, dass die unspezifischen Primer an zahlreichen Stellen im pflanzlichen Genom in einer geringen Entfernung binden, ist hoch. So werden zufällig DNA-Fragmente vervielfältigt, die ebenfalls ein spezifisches Bandenmuster ergeben.

RAMP (**R**apid **A**mplified **M**icrosatellite **D**N = Zufällig Vervielfältigte Mikrosatelliten-DNA): Die Primer binden an Mikrosatelliten-DNA und vervielfältigen die spezifischen Genom-Fragmente der Mikrosatelliten-DNA.

Auch wenn sich die befragten Experten einig sind, dass das Insert nur einen minimalen Umfang haben sollte, besteht bei der Bewertung von Deletionen, Umordnungen oder genomweiten Mutationen kein Konsens in der wissenschaftlichen Gemeinschaft. Bradford et al. (2005) etwa fordern, dass genomische Umordnungen, die bei einer gentechnischen Veränderung auftreten können, mit Rekombinationen der traditionellen Züchtungstechniken verglichen werden. Allerdings ist die Forderung, gentechnische Arbeiten in Relation zur konventionellen Züchtung zu setzen durch den aktuell verfügbaren Wissensstand begrenzt.⁵³ Wie groß die genomischen Veränderungen bei Züchtungstechniken, wie beispielsweise der Mutationsinduktion durch Strahlung oder mutagenen Substanzen, tatsächlich sind, ist nicht aufgearbeitet.⁵⁴

4.1.2 Empfehlung für die Risikobewertung

Für Weigel (2005) und Meins (2005) gehört eine Sequenzierung des Genkonstruktes nach Transformation zur guten wissenschaftlichen Praxis. Steinbrecher (2005) fordert dies nachdrücklich.

Mehrfachen Insertionen oder komplexen Insertionsorten stehen die Experten kritisch gegenüber, sei es aus Stabilitätsgründen und möglichem mangelhaften kommerziellen Erfolg (Fladung, Freitag 2005) oder weil sie darin explizit ein Risiko sehen (Steinbrecher 2005).

Über die Länge der flankierenden Sequenzen, die angrenzend zum Insertionsort sequenziert werden sollten, divergieren die Meinungen stark. Weigel (2005) weist darauf hin, dass hier nutzpflanzenspezifisch differenziert werden sollte.

Steinbrecher (2005) rät zu genomweiten Untersuchungen, um DNA-Polymorphismen, die vor allem als Folge der Zellkultur auftreten können, aufzudecken. Dies wird indirekt auch von Meins (2005) unterstützt. Zur Aufdeckung genomischer Mutationen empfiehlt Steinbrecher weiterhin, den erweiterten Insertionsort der transgenen Pflanze zu sequenzieren und mit den Sequenzen der Ausgangslinie zu vergleichen.

4.2 Epigenetische Effekte

Zu epigenetischen Effekten im engeren Sinne, nämlich der Modifizierung der DNA oder DNA-assoziiierter Proteine, nimmt das Guidance Document nicht direkt Stellung. Dies soll sich vermutlich über die stabil exprimierte transgene Eigenschaft zeigen.

Um epigenetische Effekte abzutesten, schlägt Weigel (2005) vor, die Transgenesequenz auf epigenetische Modifikationen zu untersuchen. Die Methylierung der DNA kann

⁵³ Generell werden Abläufe und Effekte bei traditionellen Züchtungstechniken molekularbiologisch immer noch nicht verstanden. Beispielsweise finanziert die Deutsche Forschungsgesellschaft in einem Schwerpunktprogramm ein großes Projekt zu Heterosis in Pflanzen, um die molekularbiologischen Ursachen des Heterosis-Effektes aufzuklären, der die Grundlage für die Hybrid-Züchtung darstellt (http://www.dfg.de/jahresbericht/detail_9_2_AGR_1149.htm).

⁵⁴ Siehe Fußnote 36.

etwa nach der Methode von Clark et al. (1994) untersucht werden.⁵⁵ Fladung (2005) hält die Bestimmung des Methylierungsgrades des Inserts im Abgleich zu den flankierenden genomischen Regionen für erfüllbar und praktikabel. Steinbrecher (2005) hält nicht nur die Untersuchung des Inserts für sinnvoll, sondern genomweite Analysen von DNA-Polymorphismen mit methylierungssensiblen Enzymen (etwa nach Xiong et al. 1999). Grund dafür ist, dass auch endogene Pflanzengene von einer unterschiedlichen Methylierung betroffen sein können.

Auch für eine Untersuchung möglicher Chromatin-Modifikationen gibt es Standardmethoden, etwa Antikörper gegen modifizierte Histone (Kuo & Allis 1999).⁵⁶ Damit kann bereits im Labor geprüft werden, ob das Transgen ein ungewöhnliches Modifikationsmuster aufweist. Nach Meins (2005) ist dafür eine Messung der transgenen RNA-Menge über mehrerer Generationen ausreichend (Northern Blot⁵⁷, Immunoassay). Nach Fladung (2005) soll eine Bestimmung der Transgenexpression durch einen Nachweis des transgenen Proteins über Western Blot⁵⁸, Northern Blot oder Enzymreaktion erfolgen. Diese Bestimmung sollte aber unter verschiedenen klimatische Faktoren, die in Klimakammerversuchen simuliert werden können, sowie in Stressversuchen durchgeführt werden, damit eine Instabilität, bzw. Gene Silencing des Transgens ausgeschlossen werden kann.

Nach Weigel (2005) können Äquivalenzmethoden, also Profiling-Methoden oder Hochdurchsatzmethoden helfen, epigenetische Effekte aufzuspüren. Diese Profiling-Methoden sollten aber mit den für die statistische Auswertung notwendigen Wiederholungen durchgeführt werden. Mit den Hochdurchsatzmethoden kann gezeigt werden, dass die Sequenz sonst keinen Einfluss auf den Stoffwechsel der Pflanze hat. Untersuchungen zum Transkriptom können nach Weigel (2005) ausreichen, da eine hohe Korrelation zwischen Metabolom und Transkriptom festgestellt wurde.

Steinbrecher (2005) hält es ebenfalls für sinnvoll, standardisierte Proteom-, Metabolom- und Microarray-Analysen durchzuführen, um sicher zu stellen, dass alle GVO gleich getestet wurden. Dafür allerdings müssten entsprechende Methoden entwickelt oder die wichtigsten Parameter spezifiziert werden.

4.2.1 Kompositionsanalyse

Insgesamt fokussiert das Vorgehen zur Bewertung der Lebensmittelsicherheit von transgenen Pflanzen auf das neu synthetisierte transgene Protein, für das

⁵⁵ Die Methode basiert darauf, dass Natriumbisulfit Cytosinreste in Uracilreste umformt, während methylierte Cytosinreste nicht reagieren. Bei der Sequenzierung der umgeformten DNA entsprechen alle Cytosinreste in der Zelle methylierten Cytosinresten.

⁵⁶ Dabei binden spezifische Antikörper an DNA-assoziierte Proteine, beispielsweise Histone. Diese Nachweismethode funktioniert auch in intakten Zellen.

⁵⁷ Analog zur Southern Blot Analyse wird hier die RNA durch Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennt, auf eine Membran übertragen und dort dauerhaft fixiert. Mit einer chemisch oder radioaktiv markierten Gensonde kann die gesuchte Gensequenz auf der Membran sichtbar gemacht werden.

⁵⁸ Nach Auftrennung der Proteine in einem Gel werden diese auf eine Trägermembran übertragen, auf der die transgenen Proteine Antikörper-vermittelt und damit spezifisch anfärbt werden können.

Allergenitäts-, wie auch Toxizitätstests durchgeführt werden müssen. Daneben und neben der Analyse der genetischen Stabilität des Genkonstruktes soll nach dem Guidance Document außerdem die Analyse verschiedener Einzelkomponenten einen Aufschluss darüber geben, ob es zu unerwarteten Effekten im Metabolismus der transgenen Pflanzen gekommen ist. Eine solche Bewertung der Lebensmittelsicherheit transgener Pflanzen beruht nach wie vor auf dem Konzept der Substantiellen Äquivalenz (Kok & Kuiper 2003).

Die Kompositionsanalyse stellt aber nicht immer die alleinige Grundlage für eine Bewertung dar, sondern kann in weiterführende Analysen münden.⁵⁹ Weiterführende Analysen sind nach dem Guidance Document dann angeraten, wenn bei der Analyse der wichtigsten Inhaltsstoffe Unterschiede außerhalb der natürlichen Variation auftreten.⁶⁰ Nur dann wird angeraten, eine Fütterungsstudie über 90 Tage an Nagetieren durchzuführen.⁶¹

Bei der Frage, welche Inhaltsstoffe in der Kompositionsanalyse abgedeckt werden müssen, wird auf die Konsensus Dokumente der OECD verwiesen.⁶² Diese Nutzpflanzenspezifischen Dokumente enthalten jeweils eine Liste der wichtigsten Inhaltsstoffe. Bei Mais beispielsweise wird lediglich der durchschnittliche Gehalt von

⁵⁹ Im Gegensatz zur Bewertung der Substantiellen Äquivalenz unter der Novel Food Verordnung 258/97, wo die Feststellung der substantiellen Äquivalenz den Endpunkt der Bewertung darstellte und auf dieser Basis direkt eine Anmeldung des Produktes erfolgen konnte.

⁶⁰ EFSA (2004) Seite 23: „Evaluation of the extent of equivalence will be greatly enhanced by additional, valid compositional comparisons between the genetically modified plant and commercial varieties of the crop species in question (which have a known history of safe use). The data for the commercial varieties used in the comparison may be generated by the applicant and/or compiled from the literature. The databases used for comparison should be specified. When using literature data, however, they have to be adequately assessed for their quality (e.g. type of material analyzed, analytical method used). Ranges as well as mean values should be reported and considered. These data would indicate whether the GM lines fall within the natural range in component concentrations found in non-GM counterparts. It should be noted that the soil composition might influence levels of compounds in plants and should be taken into consideration when comparing analytical data from field studies with literature data.“

⁶¹ EFSA (2004) Seite 29: 7.8.4 Testing of the whole GM food/feed

“If the composition of the GM plant is modified substantially, or if there are any indications for the potential occurrence of unintended effects, based on the preceding molecular, compositional or phenotypic analysis, not only new constituents, but also the whole GM food/feed should be tested. In such a case, the testing programme should include at least a 90-day toxicity study in rodents. Special attention must be paid to the selection of doses and the avoidance of problems of nutritional imbalance. At least two dose levels of the GM and parental test food should be included in the diet. The highest dose level should be the maximum achievable without causing nutritional imbalance, whilst the lowest level should approximate the anticipated human intake. Stability of test diets and nutritional equivalence between control and test diets are other important aspects to consider (König et al., 2004).

Supplemental information on the possible occurrence of unintended effects may be obtained from comparative growth studies conducted with young rapidly growing animal species (broiler chicks as animal model for non-ruminants; lambs for ruminants; or other rapidly growing species). Because of their rapid weight gain such animals are sensitive to the presence of certain undesirable substances in their feed. Studies of this type are, however, limited to those materials suitable for inclusion in their diets and which can be nutritionally matched to a suitable control diet.”

⁶² OECD Consensus Documents for the work on the Safety of Novel Foods and Feeds, OECD. http://www.oecd.org/document/9/0,2340,en_2649_34391_1812041_1_1_1_37437,00.html. Bisher sind zu den folgenden Nutzpflanzen Konsensus Dokumente erarbeitet: Alfalfa und andere Futterleguminosen aus gemässigten Klimazonen, Baumwolle, Gerste, Kartoffel, Mais, Reis, Sojabohne, Weizen, Zuckerrübe und Erucasäurefreier Raps.

Inhaltsstoffen bei Körnern beschrieben.⁶³ Diese Angaben können auch als Referenz dienen. Die OECD Konsensus Dokumente beziehen sich also nicht auf alle bekannten, aber auf die wichtigsten Inhaltstoffe der betreffenden Pflanzenart. Nach ganz neuen oder weiteren Pflanzeninhaltsstoffen wird nicht gesucht. Außerdem kann die Weiterverarbeitung der Pflanzenteile, etwa die Art der Trocknung, entscheidend sein, wie hoch die Werte bestimmter Inhaltstoffe sind (Pusztai & Bardocz 2006). Die Angabe von Inhaltstoffe bezieht sich zudem auf essbare Teile der Pflanzen, also zumeist die Samen. Das vegetative Pflanzengewebe weist zumeist eine andere Komposition auf. Es ist denkbar, dass Unterschiede von Inhaltsstoffen im vegetativen Gewebe Bio-Marker beispielsweise für eine veränderte Biologie der transgenen Pflanze sein können. Eine Kompositionsanalyse des vegetativen Pflanzengewebes sollte deshalb ebenfalls bei transgenen Pflanzen durchgeführt werden.

Insgesamt wird in den OECD Konsensus Dokumenten nicht deutlich, welche der Inhaltstoffe für eine Zulassung einer gentechnisch veränderten Maislinie unbedingt untersucht werden sollten. Das bedeutet, dass die Anforderungen der EFSA an eine Kompositionsanalyse zu wenig präzise sind. Auch hier ist eine Standardisierung wünschenswert, die beschreibt, welche Gewebe, und zwar möglichst nicht nur Samen, sondern auch vegetatives Gewebe, verwendet und welche Inhaltstoffe quantifiziert werden sollten.

Weiterführende Untersuchungen mit Hilfe der Omics-Technologien werden in dem Guidance Document einschränkend für solche transgenen Pflanzen für nötig erachtet, bei denen eine Veränderung der (sekundären) Inhaltstoffe bzw. des sekundären Metabolismus vorgenommen wird.⁶⁴

Da die Kompositionsanalyse, wie sie von dem Guidance Document der EFSA (2004) empfohlen wird, einen begrenzten Ansatz darstellt und subtile Unterschiede im Sekundärstoffwechsels nur in wenigen Fällen entdeckt wurden, sollten generell zusätzlich Fütterungsstudien über einen längeren Zeitraum als bisher durchgeführt werden, um weitere Anhaltspunkte über mögliche negative Auswirkungen für die menschliche Gesundheit zu überprüfen. Gleichzeitig sollte die Forschung an Testverfahren, die keine Tiere verbrauchen, stärker gefördert werden, damit alternative Testverfahren etabliert werden, die langfristige und nicht akut-toxische Wirkungen von transgenen Pflanzenteilen an Zellkulturen untersuchen können.

⁶³ Series on the Safety of Novel Foods and Feeds No. 6. Consensus Documents on Compositional Considerations for New Varieties of Maize (*Zea mays*): Key food and feed nutrients, anti-nutrients and secondary plant metabolites. [http://www.oilis.oecd.org/oilis/2002doc.nsf/43bb6130e5e86e5fc12569fa005d004c/ef5acb7d10c9cd66c1256c1b004323e8/\\$FILE/JT00130429.PDF](http://www.oilis.oecd.org/oilis/2002doc.nsf/43bb6130e5e86e5fc12569fa005d004c/ef5acb7d10c9cd66c1256c1b004323e8/$FILE/JT00130429.PDF)

⁶⁴ Seite 16: "The applicability of metabolomic techniques, such as gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and liquid chromatography (e.g. HPLC) coupled to nuclear magnetic resonance (NMR), for the simultaneous analysis of a broad variety of metabolites in GM plants and their conventional counterparts has been demonstrated. These non-targeted approaches may be of particular relevance for GM food crops with specific metabolic pathways modified e.g. those leading to enhanced nutritional profiles, obtained through the insertion of single or multiple genes."

4.2.2 Biologie der Pflanze

Die Anforderungen an die ökologische Bewertung von transgenen Pflanzen fallen in dem Guidance Document schwach aus, bedenkt man zusätzlich, dass die molekularbiologischen Analysen nur einen kleinen Beitrag dazu leisten können, die Auswirkungen von transgenen Pflanzen auf die Umwelt zu charakterisieren und zu bewerten. Die Untersuchungen zur Biologie transgener Pflanzen können hier aber nicht grundsätzlich diskutiert werden. Es können lediglich Anregungen für die Risikobewertung aus den bisherigen Ergebnissen zu epigenetischen Effekten gegeben werden.

Dem Guidance Document zufolge sollen die Informationen zur Biologie transgener Nutzpflanze mit denen zur "recipient plant", womit die Eltern- oder Ausgangslinie gemeint ist, verglichen werden. Insbesondere soll die Fitness der transgenen Pflanze untersucht werden, sowie mögliche Umweltauswirkungen bedingt durch Änderungen der transgenen Pflanze hinsichtlich Vermehrung, Dormanz, Überlebensfähigkeit, Ausbreitung und Auskreuzung, Stresstoleranz und Sensibilität auf gewisse Agenzien. Da die Transgenexpression prinzipiell nicht vorhersagbar ist, sollte das Wachstum und die Entwicklung transgener Pflanzen generell überwacht werden. Besonders dann, wenn die Pflanzen in der Landwirtschaft zum Einsatz kommen sollen, müssen die Parameter Wachstum und Entwicklung in Freisetzungsversuchen getestet und überprüft werden. Hierfür sollten im Guidance Document minimale Anforderungen formuliert werden, etwa wie groß die Felder der Freisetzungsversuche sein sollen, auf denen Wuchs und Entwicklung der transgenen Pflanzen untersucht werden. Wichtig ist, dass die transgene Pflanze in unterschiedlichen klimatischen und Umweltbedingungen getestet wird (Steinbrecher 2005). Nach Fladung (2005) sollen direkt Stressversuche durchgeführt werden. Nach Steinbrecher 2005 sollten extreme Bedingungen von Hitze, Kälte, Wind, Dürre, Überflutung und Verwundung getestet werden. Dafür sollten spezifische Parameter einheitlich vorgeschrieben werden.

Um darüber hinaus aber auch unbeabsichtigte schädliche Effekte für die Umwelt identifizieren zu können, sollten neben diesen Vorgaben des Guidance Document auch klassische ökologische Untersuchungen, wie in 3.3.3 angedeutet, nicht fehlen.

4.2.3 Bewertung der epigenetischen Ebene

Die Bedeutung epigenetischer Effekte bei GVO sollte nach Fladung (2005) nicht isoliert betrachtet werden, sondern immer in Zusammenhang mit der Ausgangssorte sowie anderen gezüchteten Sorten. Unterschiede zwischen GVO und Nicht-GVO können erst dann richtig eingeschätzt werden, wenn das jeweilige Variationsspektrum in nicht-transgenen Sorten bekannt ist.

Steinbrecher (2005) hingegen fordert, dass die Ausgangslinie der Vergleichspartner sein sollte, und dass GVO, die im Vergleich zur Ausgangslinie Unterschiede im Transkriptom, Proteom oder Metabolom aufweisen, keine Zulassung erhalten sollten. Die einzige akzeptable Änderung sei eine inserierte Kopie des Transgenkonstrukts im

Genom, eine dem transgenen Protein entsprechenden mRNA und das transgene Protein.

Aus den bisherigen Ausführungen wird deutlich, dass es zwei zentrale Fragen gibt, die unterschiedlich beantwortet werden. Zum einen ist es die Frage, welcher Vergleichspartner bei epigenetischen Effekten herangezogen werden soll; zum anderen die Frage, wie mit Unterschieden umgegangen werden soll. Beide Punkte bedürfen einer Klärung, für die eine offene und breit angelegte Diskussion wünschenswert wäre. Da allerdings beide Fragen kurzfristig keine Lösung erwarten lassen, sollten grundsätzlich bei einer Evaluation epigenetischer Effekte die der Evaluation zugrunde liegenden Annahmen und Hypothesen beschrieben werden.

5. Fazit

Die Tatsache, dass die Genomregulation sehr komplex ist und dass Regelkreisläufe auf die DNA einwirken, birgt die Möglichkeit, dass eine gentechnische Veränderung bei Pflanzen unbeabsichtigte Effekte haben kann. Verschiedene Ergebnisse an transgenen Pflanzen haben dies bereits bestätigt. Die unbeabsichtigten Effekte sind unter anderem darauf zurückzuführen, dass durch die Geninsertion die Regulation von anderen Genen beeinträchtigt wird oder dass das Transgen selber unterschiedlich reguliert wird. Diese Erkenntnisse sind allerdings noch nicht angemessen in die Risikobewertung transgener Pflanzen eingeflossen. Vielmehr dominiert in der gegenwärtigen Risikobewertung nach wie vor die Auffassung, dass die Geninsertion einen gewünschten Effekt stabil ausübt.

Für die Risikobewertung ist derzeit das Guidance Document der EFSA (2004) maßgeblich und wurde als Grundlage für Verbesserungsvorschläge verwendet. Insgesamt müssen die Vorgaben des Guidance Document als zu grob bewertet werden, als dass daraus deutlich wird, was als Stand der Wissenschaft und Technik für eine GVO-Zulassung in Europa gelten sollte. Da diese Grundlage fehlt, kann auch keine Anpassung und Fortschreibung der Risikobewertung, wie dies gesetzlich vorgeschrieben ist, stattfinden, um dem Erkenntnisgewinn Rechnung zu tragen.

5.1.1 Vorschläge zur Anpassung der Risikobewertung

Vor diesem Hintergrund stellt das Öko-Institut unter Berücksichtigung des Vorsorgeprinzips folgende Empfehlungen zur Anpassung und Verbesserung der Risikobewertung auf:

- Bei der Herstellung transgener Pflanzen sollten möglichst keine Zellkulturen verwendet werden. Stattdessen sollte generell möglichst eine Transformation an ganzen Pflanzen oder Pflanzenteilen (*in planta*) vorgenommen werden. Wenn aber ein sogenannter Dedifferenzierungsschritt in Zellkultur erfolgt, sollte das gesamte Genom auf mögliche Mutationen untersucht werden.
- Das eingefügte Genkonstrukt (bzw. alle Kopien und Fragmente des Konstruktes) sollte nach der Insertion sequenziert werden.
- Es sollten Untersuchungen, ob aberrante RNA oder Fusionsproteinen gebildet werden, durchgeführt werden.
- Das Transgen sollte auf mögliche epigenetische Modifikationen (Methylierung der DNA, Chromatin-Modifikationen) hin untersucht werden.
- Für Untersuchungen mit Hochdurchsatzmethoden sollten standardisierte Vorgaben gemacht werden ebenso wie Vorgaben zur statistischen Auswertung. Sobald Unterschiede im Transkriptom, Proteom oder Metabolom zwischen der transgenen Pflanze und der Ausgangs- oder isogenen Linie gefunden werden, sollten weiterführende Untersuchungen folgen.

- Da Beispiele zeigen, dass neben dem gewünschten transgenen Protein Proteine oder Metabolite in transgenen Pflanzen verändert produziert werden, sollten Fütterungsversuche, die von der EFSA (2004) durchaus empfohlen werden, verpflichtend sein und möglichst langfristig durchgeführt werden, um nicht nur akut toxische, sondern auch langfristige Effekte feststellen zu können. Minimum sollte ein 90-Tage Fütterungstest mit den transgenen Pflanzenteilen, die als Lebens- oder Futtermittel verwendet werden sollen, darstellen. Die Forderung von langfristigen Fütterungsversuchen geht allerdings einher mit der Forderung, Tests, die keine Tiere verbrauchen, zu fördern. Ziel sollte es sein, alternative Testverfahren zu etablieren, die langfristige und nicht akut-toxische Wirkungen von transgenen Pflanzenteilen an Zellkulturen untersuchen können.
- Generell sollten ausführliche ökologische Untersuchungen vorgegeben werden, die das Ziel haben, pleiotrope Effekte, die sich negativ auf die Biodiversität auswirken können, feststellen zu können.

5.1.2 Forschungs- und Handlungsbedarf

Damit die Vorschläge zur Anpassung und Verbesserung der Risikobewertung transgener Pflanzen umgesetzt werden können, bedarf es dringend standardisierter Methoden. Auf diese Weise könnten auch Ergebnisse der Risikobewertungen der verschiedenen GVO-Anträge besser miteinander verglichen werden. Das Methodenset sollte zudem Gegenstand einer breiten Diskussion sein. Solch ein Methodenset sollte als ein offenes Handbuch angelegt werden, das fortlaufende Ergänzungen erfahren kann und muss.

Ein weiterer Klärungsbedarf besteht darin, dass theoretische Konzepte kontinuierlich diskutiert werden müssen, wie etwa das Konzept des Open Reading Frame oder Konzepte darüber, welche Genomabschnitte prinzipiell durch Insertionen eine besondere Störung erfahren. Solche Konzepte sollten fortlaufend aktualisiert und verbessert werden. Zum anderen sollte geschaut werden, wie die Konzepte zusätzlich durch Experimente abgesichert werden können.

Zu klären gilt es darüber hinaus auch, wie weiträumig die Umgebung des Inserts sequenziert werden soll und ob dies abhängig von der Nutzpflanzenart gemacht werden sollte.

5.1.3 Bewertung von Unterschieden

In der Bewertung von Unterschieden zwischen transgener Pflanze und dem Vergleichsobjekt gibt es zwei offene Fragen, die transparent und mit unterschiedlichen Stakeholdern diskutiert werden sollten. Wünschenswert wäre eine breite und offene Diskussion, an der am besten nicht nur Naturwissenschaftler sondern auch Wissenschaftler anderer Forschungsdisziplinen und gesellschaftliche Gruppen teilnehmen sollten. Hintergrund eines solchen Ansatzes ist, dass eine Bewertung von Unterschieden immer auch normative Aspekte enthält, die nicht allein aus

naturwissenschaftlichen Daten abgeleitet werden können. Die Tagung „Die Rolle des Vorsorgeprinzips in der GVO-Politik“ im April 2006 in Wien etwa zeigte eindrucksvoll, dass Nicht-Naturwissenschaftler die Grenzen von naturwissenschaftlichen Ansätzen, Experimenten und Ausgangshypothesen und damit die Grenzen des Wissens deutlicher beschreiben können. Ein solcher Austausch kann eine Hilfestellung für wissenschaftliche Innovationen bieten.⁶⁵

Insgesamt können Unterschiede zwischen der transgenen Pflanze und der Ausgangs- oder isogenen Linie im Transkriptom, Proteom oder Metabolom nach dem bisherigen Stand des Wissens nicht abschließend beurteilt werden. Wann und auf Basis welcher Annahmen Bewertungen getroffen werden, sollte baldmöglichst geklärt werden. Damit verknüpft ist die Frage des Komparators: Ob und welcher Komparator außer der Ausgangs- oder isogenen Linie in Untersuchungen miteinbezogen werden sollte, sollte derzeit noch offen stehen. Dies gilt nicht nur für Kompositionsanalysen, sondern auch für ökologische Untersuchungen.

⁶⁵ <http://www.umweltbundesamt.at/umweltschutz/gentechnik/gtveranstaltungen/precautionandgmos/>

6. Literatur

- Alleman M, Doctor J (2000): Genomic imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* 43: 147-161.
- Allen GC, Hall GE, Michalowski S, Newmann W, Spiker S, Thompson WF (1996): High-level transgene expression in plant cells: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell* 8: 899-913.
- Allen GC, Spiker S, Thompson WF (2000): Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Mol. Biol.* 43: 361-376.
- Anand A, Trick HN, Gill BS, Muthukrishnan S (2003): Stable transgene expression and random gene silencing in wheat. *Plant Biotech. J.* 1 (4): 241-251.
- Balandin T, Castresana C (1997): Silencing of a beta-1,3-glucanase transgene is overcome during seed formation. *Plant Mol. Biol.* 34 (1): 125-137.
- Barro F, Rooke L, Bekes F, Gras P, Tatham AS, Fido R, Lazzeri PA, Shewry PR, Barcelo P (1997): Transformation of wheat with high molecular weight subunit genes results in improved functional properties. *Nat. Biotech.* (12): 1295-1299.
- Baulcombe D (2004): RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Bergelson J, Purrington CB, Palm CJ, Lopez-Gutierrez JC (1996): Costs of resistance: a test using transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Biol. Sci.* 263 (1377): 1659-1663.
- Bergelson J, Purrington CB, Wichmann G (1998): Promiscuity in transgenic plants. *Nature* 395: 25.
- Bettini P, Michelotti S, Bindi D, Giannini R, Capuana M, Buiatti M (2003): Pleiotropic effect of the insertion of the *Agrobacterium rhizogenes* rolD gene in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Theor. Appl. Genet.* 107 (5): 831-836.
- Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002): Golden rice: Introducing the b-Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency. Presented as part of the symposium „Plant Breeding: A New Tool for Fighting Micronutrient Malnutrition“ given at the Experimental Biology 2001 meeting, Orlando, Florida, on April 1, 2001.
- Bode J, Goetze S, Heng H, Krawetz SA, Benham C (2003): From DNA structure to gene expression: mediators of nuclear compartmentalization and dynamics. *Chromosome Res.* 11 (5): 435-445.
- Bonifer C (2000): Developmental regulation of eukaryotic gene loci - which cis-regulatory information is required? *Trends Genet.* 16 (7): 310-315.
- Bovy A, de Vos R, Kemper M, Schijlen E, Pertejo MA, Muir S, Collins G, Robinson S, Verhoeyen M, Hughes S, Santos-Buelga C, van Tunen A (2002): High-Flavonol Tomatoes Resulting from the Heterologous Expression of the Maize Transcription Factor Genes LC and C1. *Plant Cell.* 14: 2509-2526.
- Bradford KJ, Gutterson N, Parrott W, Van Deynze A, Strauss SH (2005): Regulatory regimes for transgenic crops. Strauss and colleagues respond. *Nat. Biotech.* 12 (7): 787-789.

- Brandle JE, McHugh SG, James L, Labbe H, Miki BL (1995): Instability of transgene expression in field grown tobacco carrying the *csrl-I* gene for sulfonyleurea herbicide resistance. *Bio-Technol.* 13: 994-998.
- Bregitzer P, Tonks D (2003): Inheritance and Expression of the Transgenes in Barley. *Crops Sci.* 43 (1): 4-12.
- Büchs W, Prescher S, Müller A (2004): Potentielle Auswirkungen des Anbaus von Bt-Mais: Entwicklungsverzögerung bei Zersetzern und ihren Räubern nach Aufnahme von MON810 Bt-Maisstreu – Folgen für das Ökosystem? Status Seminar „Sicherheitsforschung und Monitoring 2004, Berlin 16. Juni 2004. <http://www.biosicherheit.de/pdf/statusseminar2004/poster14.pdf>.
- Burian RM (2004): Molecular epigenesis, molecular pleiotropy, and molecular gene definition. *History and philosophy of the Life Science* 26 (1): 59-80.
- Burtin D, Michael AJ (1997): Overexpression of arginine decarboxylase in transgenic plants. *Biochem. J.* 325: 331-337.
- Butaye KMJ, Cammue BPA, Delaure SL, De Bolle MFC (2005): Approaches to minimize variation of transgene expression in plants. *Mol. Breed.* 16 (1): 79-91.
- Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, Constable A, Davies HV, Engel KH, Gatehouse AMR, Karenlampi S, Kok EJ, Leguay JJ, Lehesranta S, Noteborn HPJM, Pedersen J, Smith M (2004): Unintended effects and their detection in genetically modified crops. *Food Chem. Toxicol.* 42 (7): 1089-1125.
- Chareonprongwattana S, Thara KV, Wang L, Datta SK, Panbangred W, Muthukrishnan S (1999): Inheritance, expression and silencing of a chitinase gene in rice. *Theor. Appl. Genet.* 98: 371-378.
- Charrier B, Scollan C, Ross S, Zubko E, Meyer P (2000): Co-Silencing of homologous transgenes in tobacco. *Mol. Breed.* 6: 407-419.
- Chen S, Helliwell CA, Wu LM, Dennis ES, Upadhyaya NM, Zhang R, Waterhouse PM, Wang MB (2005) A novel T-DNA vector design for selection of transgenic lines with simple transgene integration and stable transgene expression. *Function. Plant Biol.* 32 (8): 671-681.
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994): High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res.* 22: 2990-2997.
- Collonnier C, Schattner A, Berthier G, Boyer F, Coue-Philippe G, Diolez A, Duplan MN, Fernandez S, Kebdani N, Kobilinsky A, Romaniuk M, de Beuckeleer M, de Loose M, Windels P, Bertheau Y (2005): Characterization and event specific-detection by quantitative real-time PCR of T25 maize insert. *Journal of AOAC International* 88 (2): 536-546.
- Copenhaver GP, Browne WE, Preuss D (1998): Assaying genome-wide recombination and centromere functions with *Arabidopsis* tetrads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 247-252.
- Corpillo D, Gardini, G, Vaira AM, Basso M, Aime S, Accotto GR, Fasano M (2004): Proteomics as a tool to improve investigation of substantial equivalence in genetically modified organisms: The case of a virus-resistant tomato. *Proteomics* 4: 193-200.

- Cortina C, Culiáñez-Macià FA (2005): Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.* 169 (1): 75-82.
- Darlington H, Fido R, Tatham AS, Jones H, Salmon SE, Shewry PR (2003): Milling and baking properties of field grown wheat expressing HMW subunit transgenes. *J. Cereal Sci.* 38 (3): 301-306.
- Datta K, Baisakh N, Oliva N, Torrizo L, Abrigo E, Tan J, Rai M, Rehana S, Al-Babili S, Beyer P, Potrykus I, Datta SK (2003): Bioengineered 'golden' indica rice cultivars with b-carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant Biotech. J.* 1: 81-90.
- De Bolle MFC, Butaye KMJ, Coucke WJW, Goderis IJWM, Wouters PFJ, Van Boxel N, Broekart WF, Cammue BPA (2003): Analysis of the influence of promoter elements and a matrix attachment region in the inter-individual variation of transgene expression in populations of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 165: 169-179.
- Defernez M, Colquhoun IJ (2003): Factors affecting the robustness of metabolite fingerprinting using H-1 NMR spectra. *Phytochem.* 62 (6): 1009-1017.
- Defernez M, Gunning YM, Parr AJ, Shepherd LVT, Davies HV, Colquoun IJ (2004): NMR and HPLC-UV profiling of potatoes with genetic modifications to metabolic pathways. *J. Agric. Food Chem.* 52: (20): 6075-6085.
- Dehio C, Schell J (1994): Identification of Plant Genetic-Loci Involved in a posttranscriptional Mechanism for Meiotically Reversible Transgene Silencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12): 5538-5542.
- Delhaize E, Hebb DM, Richards KD, Lin K-M, Ryan PR, Gardner RC (1999): Cloning and Expression of a Wheat (*Triticum aestivum* L.) Phosphatidylserine Synthase cDNA Overexpression in Plants Alters the Composition of Phospholipids. *J. Biol. Chem.* 274 (11): 7082-7088.
- Demeke T, Huck P, Baga M, Caswell K, Leung N, Chibbar RN (1999): Transgene inheritance and silencing in hexaploid spring wheat. *Theor. Appl. Genet.* 99: 947-953.
- Di Serio F, Schöb H, Iglesias A, Tarina C, Boulvoire E, Meins F (2001): Sense- and antisense – mediated gene silencing in tobacco is inhibited by the same viral suppressor and is associated with accumulation of small RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 11: 6506-6510.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Verni F (2005): The paradox of functional heterochromatin. *Bioessays* 27 (1): 29-41.
- Dorlhac de Borne F, Vincentz M, Chupeau Y, Vaucheret H (1994): Co-suppression of nitrate reductase host genes and transgenes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 243: 613-621.
- Dubois V, Botton E, Meyer C, Rieu A, Bedu M, Maisonneuve B, Mazier M (2005): Systematic silencing of a tobacco nitrate reductase transgene in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 56 (419): 2379-2388.
- Dymock D, Risotti R, de Pater S, Lancaster J, Tillson P, Ooms G (1991): Regulation of *Agrobacterium tumefaciens* T-cyt gene expression in leaves of transgenic tomato

- (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée) is strongly influenced by plant culture conditions. *Plant Mol. Biol.* 17:711-725.
- EFSA (2004): Guidance Document of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms for the Risk Assessment of Genetically Modified Plants and Derived Food and Feed. *The EFSA Journal* 2004-99: 1-94.
http://www.efsa.eu.int/science/gmo/gmo_guidance/660/guidance_docfinal1.pdf
- Elmayan T, Vaucheret H (1996): Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J.* 9 (6): 787-797.
- Elomaa P, Helariutta Y, Griessbach RJ, Kotilainen M, Seppänen P, Teeri TH (1995): Transgene inactivation in *Petunia hybrida* is influenced by the properties of the foreign gene. *Mol. Gen. Genet.* 248: 649-656.
- Emani C, Sunilkumar G, Rathore KS (2002): Transgene silencing and reactivation in sorghum. *Plant Sci.* 162 (2): 181-192.
- Firn RD (2006): The genetic manipulation of Natural Product composition - risk assessment when a system is predictably unpredictable. In Moch, K. (Ed.) (2006): *Epigenetics, Transgenic Plants & Risk Assessment Proceedings of the Conference at December 1st 2005*, Literaturhaus, Frankfurt am Main, Germany. 2006, Öko-Institut e.V. ISBN-Nr. 3-934490-24-7. <http://www.oeko.de/oekodoc/277/2006-002-en.pdf>
- Fladung M (2005): siehe Anhang 1.
- Fojtova M, van Houdt H, Depicker A, Kovarik A (2003): Epigenetic Switch from Posttranscriptional to Transcriptional Silencing is Correlated with Promoter Hypermethylation. *Plant Physiol.* 133: 1240-1250.
- FSA (2005a): Transcriptome, proteome and metabolome analysis to detect unintended effects in genetically modified potato.
<http://www.foodstandards.gov.uk/scienceresearch/researchinfo/foodcomponentsresearch>
- FSA (2005b): Methods for the analysis of GM wheat and barley seed for unexpected consequences of the transgene.
<http://www.foodstandards.gov.uk/scienceresearch/researchinfo/foodcomponentsresearch>
- FSA (2005c): Comparison of the metabolome and proteome of GM and non-GM wheat: defining substantial equivalence.
<http://www.foodstandards.gov.uk/scienceresearch/researchinfo/foodcomponentsresearch>
- FSA (2005d): Development and comparison of molecular profiling methods for improved safety evaluation using GM Brassicas.
<http://www.foodstandards.gov.uk/scienceresearch/researchinfo/foodcomponentsresearch>
- FSA (2005e): The application of metabolic profiling to the safety assessment of GM foods.

- <http://www.foodstandards.gov.uk/scienceresearch/researchinfo/foodcomponentsresearch>.
- FSA (2005f): Metabolome technology for the profiling of GM and conventionally bred plant materials.
<http://www.foodstandards.gov.uk/scienceresearch/researchinfo/foodcomponentsresearch>.
- Freitag J (2005): siehe Anhang 1
- Fujiwara T, Beachy RN (1993): Expression of soybean seed storage protein genes in transgenic plants. Their effects on expression of a neighbouring gene and position dependency. *Plant Cell Physiol.* 34 (1): 13-20.
- Gertz JM, Vencill WK, Hill NS (1999): Tolerance of Transgenic Soybean (*Glycine max*) to Heat Stress. British Crop Protection Conference – Weeds, 15-19 Nov 1999, Brighton: 835-840.
- Gessler C (2006): Uncertainties and gaps in knowledge regarding genetic engineering of apple trees. In Moch, K. (Ed.) (2006): *Epigenetics, Transgenic Plants & Risk Assessment Proceedings of the Conference at December 1st 2005*, Literaturhaus, Frankfurt am Main, Germany, 2006, Öko-Institut e.V. ISBN-Nr. 3-934490-24-7.
<http://www.oeko.de/oekodoc/277/2006-002-en.pdf>
- Gorbunova V, Levy AA (1997): Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Res.* 25: 4650-4657.
- Grant-Downton RT, Dickinson HG (2005): *Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 1. The Epigenetic Network in Plants.* *Ann. Bot.* 96: 1143-1164.
- Grant-Downton RT, Dickinson HG (2006): *Epigenetics and its Implications for Plant Biology. 2. Epiphany: Epigenetics, Evolution and Beyond.* *Ann. Bot.* 97: 11-27.
- Haig D (2004): The (Dual) Origin of Epigenetics. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. Volume LXIX:* 1-4.
- Houghton AJ, Champion GT, Hawes C, Heard MS, Brooks DR, Bohan SJ, Clark SJ, Dewar AM, Firbank LG, Osborne JL, Perry JN, Rothery P, Roy DB, Scott RJ, Woiwood IP, Birchall C, Skellern MP, Walker JH, Baker P, Browne EL, Dewar AJG, Garner BH, Haylock LA, Horne SL, Mason NS, Sands RJN, Walker MJ (2003): Invertebrate responses to the management of the genetically modified herbicide-tolerant crops. II. Within-field epigeal and aerial arthropods. *Philos. Trans. R. Soc. (Biological Sciences)* 358: 1863-1877.
- Hernandez M, Pla M, Esteve T, Prat S, Puigdomenech P, Ferrando A (2003): A specific real-time quantitative PCR detection system for event MON810 in maize YieldGard (R) based on the 3'-transgene integration sequence. *Transgen. Res.* 12 (2): 179-189.
- Holck A, Va M, Didierjean L, Rudi K (2002): Title: 5'-nuclease PCR for quantitative event-specific detection of the genetically modified Mon810 MaisGard maize. *Europ. Food Res. Technol.* 214 (5): 449-453.
- Ingelbrecht I, Breyne P, Vancompernelle K, Jacobs A, Vanmontagu M, Depicker A (1991): Transcriptional interference in transgenic plants. *Gene* 109 (2): 239-242.

- Ingelbrecht I, Vanhoudt H, Vanmontagu M, Depicker A (1994): Posttranscriptional Silencing of Reporter Transgenes in Tobacco Correlates with DNA Methylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (22): 10502-10506.
- IUPAC (1997): IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition 1997; <http://www.iupac.org/goldbook/P04695.pdf>
- Iyer Lakshminarayan M, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC (2000): Transgene Silencing in Monocots. Plant Mol. Biol. 43: 323-346.
- Jablonka E, Lamb MJ (1999): Epigenetic Inheritance and Evolution. The Lamarckian Dimension. Oxford University Press, New York. ISBN 0 19 854063 9.
- Jakowitsch J, Papp I, Moscone EA, van der Winden J, Matzke M, Matzke AJM (1999): Molecular and cytogenetic characterization of a transgene locus that induces silencing and methylation of homologous promoters in trans. Plant J. 17: 131-140.
- Jenkins H, Hardy N, Beckmann M, Draper J, Smith AR, Taylor J, Fiehn O, Goodacre R, Bino RJ, Hall R, Kopka J, Lane GA, Lange BM, Liu JR, Mendes P, Nikolau BJ, Oliver SG, Paton NW, Rhee S, Roessner-Tunali U, Saito K, Smedsgaard J, Sumner LW, Wang T, Walsh S, Wurtele ES, Kell DB (2004): A proposed framework for the description of plant metabolomics experiments and their results. Nat. Biotech. 22 (12): 1601-1606.
- Jenuwein T, Allis CD (2001): Translating the histone code. Science 293: 1074-1080.
- Jeong, D-H, An S, Kang H-G, Moon S, Han J-J, Park S, Lee HS, An K, An G (2002): T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. Plant Physiol. 130: 1636-1644.
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engle P, Kan ZY, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD (2003): Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. Science 302 (5653): 2141-2144.
- Jones PA, Takai D (2001): The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. Science (293): 1068-1070.
- Jung HG, Sheaffer CC (2004): Influence of Bt Transgenes on Cell Wall Lignification and Digestibility of Maize Stover for Silage. Crop Sci. 44: 1781-1789.
- Kapoor A, Agarwal M, Andreucci A, Zheng XW, Gong ZZ, Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK (2005): Mutations in a conserved replication protein suppress transcriptional gene silencing in a DNA-methylation-independent manner in Arabidopsis. Curr. Biol. 15 (21): 1912-1918.
- Katavic V, Haughn GW, Reed D, Martin M, Kunst L (1994): In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet. 245: 363-370.
- Kathuria H, Mohanty A, Tyagi AK (2003): Analysis of inheritability and expression profile of single and multi-copy transgene(s) in rice over generations. J. Plant Biochem. Biotech. 12 (2): 103-107.
- Köhler C, Grossniklaus U (2002): Epigenetic inheritance of expression states in plant development: the role of Polycomb group proteins. Curr. Opin. Cell Biol. 14: 773-779.

- Kohli A, Gahakwa D, Vain P, Laurie DA, Christou P (1999): Transgene expression in rice engineered through particle bombardment: molecular factors controlling stable expression and transgene silencing. *Planta* (208): 88-97.
- Köhne S, Neumann K, Pühler A, Broer I (1998): The heat treatment induced reduction of the *pat* gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. *J. Plant Physiol.* 153: 631-642.
- Kok EJ, Kuiper HA (2003): Comparative safety assessment for biotech crops. *Trends Biotech.* 21: 439-444.
- Kuiper HA, Kok EJ, Engel KH (2003): Exploitation of molecular profiling techniques for GM food safety assessment. *Curr. Opin. Biotech.* 14: 238-243.
- Kumar A, Bennetzen JL (1999): Plant retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* 33: 479-532.
- Kumpatla SP, Hall TC (1998): Recurrent onset of epigenetic silencing in rice harboring a multi-copy transgene. *Plant J.* 14: 129-135.
- Kuo M-H, Allis CD (1999): *In vivo* cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic protein: DNA associations in a chromatin environment. *Methods* 19: 425-433.
- Lappe MA, Bailey EB, Childress C, Setchell KDR (1999): Alterations in Clinically Important Phytoestrogens in Genetically Modified, Herbicide-Tolerant Soybeans. <http://www.biotech-info.net> [Stand: 20.08.2001].
- Latham JR, Wilson AK, Steinbrecher RA (2006): The Mutational Consequences of Plant Transformation. *J. Biomed. Biotech.* vol. 2006, Article ID 25376, 7 pages.
- Le Gall G, Colquhoun IJ, Davis AL, Collins GJ, Verhoyen ME (2003): Metabolite profiling of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using ¹H NMR spectroscopy as a tool to detect potential unintended effects following a genetic modification. *J. Agric. Food Chem.* 51 (9): 2447-2456.
- Lee KY, Baden C, Howie WJ, Bedbrook J, Dunsmuir P (1997): Post-transcriptional gene silencing of ACC synthase in tomato results from cytoplasmic RNA degradation. *Plant J.* 12 (5): 1127-1137.
- Lehesranta SJ, Davies HV, Sheperd LVT, Nunan N, McNicol JW, Auriola S, Koistinen KM, Suomalainen S, Kokko HI, Kärenlampi SO (2005): Comparison of Tuber Proteomes of Potato Varieties, Landraces and Genetically Modified Lines. *Plant Physiol.* 138: 1690-1699.
- Lips J (1998): Pleiotrope Effekte und genetische Stabilität transgener Pflanzen. In: Schütte G, Heidenreich B, Beusmann V (1998): Nutzung der Gentechnik im Agrarsektor der USA - Die Diskussion von Versuchsergebnissen und Szenarien zur Biosicherheit. UBA-Texte 47/98: 121-156.
- Liu JW, Tabe LM (1998): The influences of two nuclear matrix attachment regions (MARs) on gene expression in transgenic plants. *Plant Cell Physiol.* 39: 115-123.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002): Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *Plant Cell* 14: 1605-1619.

- Lolle SJ, Victor JL, Young JM, Pruitt RE (2005): Genome-wide non-Mendelian inheritance of extra-genomic information in Arabidopsis. *Nature* 434: 505-509.
- Lukaszewicz M, Szopa J (2005): Pleiotropic effect of flavonoid biosynthesis manipulation in transgenic potato plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 27 (2): 221-228.
- Ma CL, Mitra A (2002): Intrinsic direct repeats generate consistent post-transcriptional gene silencing in tobacco. *Plant J.* 31 (1): 37-49.
- Makarevitch I, Svitashv SK, Somers DA (2003): Complete sequence analysis of transgene loci from plants transformed via particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 52: 421-432.
- Mallory AC, Vaucheret H (2004): MicroRNAs: Something important between the genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 120-125.
- Masterson J (1994): Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421-424.
- Matthews D, Jones H, Gans P, Coates S, Smith LMJ (2005): Toxic Secondary Metabolite Production in Genetically Modified Potatoes in Response to Stress. *J. Agric. Food Chem.* 53: 7766-7776.
- Matzke AJ, Matzke MA (1998): Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Curr. Opin.Plant Biol.* 1: 142-148.
- Matzke MA, Birchler JA (2005): RNAi mediated pathways in the nucleus. *Nature Reviews, RNA Interference Collection*, October 2005: 7-18.
- Matzke MA, Matzke AJM (1995): How and why do plants inactivate homologous (trans)genes? *Plant Physiol.* 107: 679-685.
- Matzke MA, Matzke AJM, Kooter J (2001): RNA: Guiding Gene silencing. *Science* 293: 1080-1082.
- Mayer MJ, Michael AJ (2003): Polyamine homeostasis in transgenic plants overexpressing ornithine decarboxylase includes ornithin limitation. *J. Biochem.* 134: 765-772.
- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Crameri A, Angelis K, Redei GP, Schell J, Hohn B (1991): T-DNA Integration: a mode of illegitimate recombination in plants. *EMBO Journal* 10: 697-704.
- Mehlo L, Mazithulela, Twyman RM, Boulton MI, Davies JW, Christou P (2000): Structural analysis of transgene rearrangements and effects on expression in transgenic maize plants generated by particle bombardment. *Maydica* 45: 277-287.
- Meins F (2005): siehe Anhang 1
- Meins F, Binns A (1979): Cell Determination in Plant development. *BioScience* 29 (4): 221-225.
- Meister G, Tuschl T (2004): Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431: 343-349.
- Meng L, Bregitzer P, Zhang SB, Lemaux PG (2003): Methylation of the exon/intron region in the Ubi1 promoter complex correlates with transgene silencing in barley. *Plant Mol. Biol.* 53 (3): 327-340.

- Meyer P (1993): Expression and stability of foreign genes in animals and plants. In: Wöhrmann K, Tomiul J (1993): Transgenic Organisms. Birkhäuser Verlag Basel.
- Meyer P, Linn F, Heidann I, Meyer H, Niedenhof I, Saedler H (1992): Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 231: 345-352.
- Mishra KK, Handa AK (2005): Meiotic reestablishment of post-transcriptional gene silencing is regulated by aberrant RNA formation in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Mill.). *Mol. Breed.* 16 (2): 139-149.
- Mitsuhara I, Shirasawa-Seo N, Iwai T, Nakamura S, Honkura R, Ohashi Y (2002): Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: possible mechanisms for non-inheritance of the silencing. *Genetics* 160: 343-352.
- Miyao A, Tanaka K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K, Shinozuka Y, Onosato K, Hirochika H (2003): Target site Specificity of the *Tos17* Retrotransposon Shows a Preference of Insertion within Genes and against Insertion in Retrotransposon-Rich Regions of the Genome. *Plant Cell* 15: 1771 – 1780.
- Mlynarova L, Loonen A, Mietkiewska E, Jansen RC, Nap JP (2002): Assembly of Two Transgenes in an Artificial Chromatin Domain Gives Highly Coordinated Expression in Tobacco. *Genetics* 160: 727-740.
- Mlyranova L, Jansen RC, Conner AJ, Stiekema WJ, Nap JP (1995): The MAR-mediated reduction in position effects can be uncoupled from copy number-dependent expression in transgenic plants. *Plant Cell* 7: 599-609.
- Momma K, Hashimoto W, Ozawa S, Kawai S, Katsube T, Takaiwa F, Kito M, Utsumi S, Murata K (1999): Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: Analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63 (2): 314-318.
- Morino K, Olsen O-A, Shimamoto K (1999): Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *Plant J.* 17: 275-285.
- Müller AE, Kamisugi Y, Gruneberg R, Niedenhof I, Horold RJ, Meyer P (1999): Palindromic sequences and A plus T-rich DNA elements promote illegitimate recombination in *Nicotiana tabacum*. *J. Mol. Biol.* 291: 29-46.
- Müller H-P, Varmus HE (1994): DNA bending creates favoured sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *EMBO Journal* 13: 4704-4714.
- Nagaya S, Kato, K, Ninomiya Y, Horie R, Sekine M, Yoshida K, Shinmyo A (2005): Expression of randomly integrated single complete copy transgenes does not vary in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 46 (3): 438-444.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene in *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.
- Neuhuber F, Park Yd, Matzke AJM, Matzke MA (1994): Susceptibility of Transgene Loci to Homology-Dependent Gene Silencing. *Mol. Gen. Genet.* 244 (3): 230-241.

- Neumann K, Droege-Laser W, Köhne S, Broer I (1997): Heat treatment results in a loss of transgene-encoded activities in several tobacco lines. *Plant Physiol.* 115: 939-947.
- Novak WK, Haslberger AG (2000): Substantial Equivalence of Antinutrients and Inherent Plant Toxins in Genetically Modified Novel Foods. *Food Chem. Toxicol.* 38: 473-483.
- Oh SJ, Jeong J, Kim EH, Yi N, Yi SI, Jang IC, Kim YS, Suh SC, Nahm BH, Kim JK (2005): Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants. *Plant Cell Rep.* 24 (3): 145-154.
- Ohrend G, Kuhlmann I, Doerfler W (1991): Spreading of DNA methylation across integrated foreign (Adenovirus type 12) genomes in mammalian cells. *J. Virol.* 65: 4301-4308.
- Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A (2005): AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *Plant J.* 43 (1): 29-46.
- Osborn TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Martienssen RA (2003). Understanding mechanisms of novel gene expression in polyploids. *Trends Genet.* 19, 141–147.
- Palatnik J, Allen E, Wu X, Schommer C, Carrington JC, Weigel D (2003): Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257-263.
- Palauqui JC, Vaucheret H (1995): Field trial analysis of nitrate reductase co-suppression. a comparative study of 38 combinations of transgene loci. *Plant Mol. Biol.* 29: 149-159.
- Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA (1998): Irregular pattern of transgene silencing in allohexaploid oat. *Plant Mol. Biol.* 38: 597-607.
- Pennisi E (2001): Behind the Scenes of Gene Expression. *Science* (293): 1064-1068.
- Phillips RL, Kaepler SM, Olhoft P (1994): Genetic instability of plant-tissue cultures - breakdown of normal controls. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12): 5222-5226.
- Pickardt T, de Kathen A (2002): Verbundprojekt "Grundlagen für die Risikobewertung transgener Gehölze". Literaturstudie zur Stabilität transgen-vermittelter Merkmale in gentechnisch veränderten Pflanzen mit dem Schwerpunkt transgene Gehölzarten und Stabilitätsgene. Texte des Umweltbundesamtes 53/02.
- Pickford AS, Cogoni C (2003): RNA-mediated gene silencing. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 871-882.
- Pierre J, Marsault D, Genecque E, Renard M, Champolivier J, Pham-Delegue MH (2003): Effects of herbicide-tolerant transgenic oilseed rape genotypes on honey bees and other pollinating insects under field conditions. *Entomol. Exp. Appl.* 108 (3): 159-168.
- Poerschmann J, Gathmann A, Augustin J, Langer U, Górecki T (2005): Molecular Composition of Leaves and Stems of Genetically Modified Bt and Near-Isogenic Non Bt-Maize – Characterization of Lignin-Patterns. *J. Environ. Qual.* 34: 1508-1518.
- Popelka JC, Xu JP, Altpeter F (2003): Generation of rye (*Secale cereale* L.) plants with low transgene copy number after biolistic gene transfer and production of instantly marker-free transgenic rye. *Transgen. Res.* 12 (5): 587-596.
- Popineau Y, Deshayes G, Lefebvre J, Fido R, Tatham AS, Shewry PR (2001): Prolamin aggregation, gluten viscoelasticity, and mixing properties of transgenic wheat lines

- expressing 1Ax and 1Dx high molecular weight glutenin subunit transgenes. *J. Agric Food Chem.* 49 (1): 395-401.
- Pryciak PM, Varmus HE (1992): Nucleosomes, DNA-binding proteins and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 69: 769-780.
- Pusztai A (2002): Can Science give us the Tools for Recognizing Possible Health Risks of GM Food Nutr. Health 16: 73-84.
- Pusztai A, Bardocz S (2006): GMO in animal nutrition: potential benefits and risks. *Biology of Nutrition in Growing Animals* 513 – 540.
- Pusztai A, Bardocz S, Ewen SWB (2003): Genetically Modified Foods: Potential Human Health Effects. In Mello, J.F.P. (Ed.): *Food Safety: Contaminants and Toxins*. CAB International.
- Rang A, Linke B, Jansen B (2005): Detection of RNA variants transcribed from the transgene in Roundup Ready soybean. *Eur. Food Res. Technol.* 220: 438-443.
- Rapp RA, Wendel JF (2005): Epigenetics and plant evolution. *New Phytol.* 168: 81-91.
- Reddy MSS, Dinkins RD, Collins GB (2003): Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 21 (7): 676-683.
- Register JC, Peterson DJ, Bell PJ (1994): Structure and function of selectable and non-selectable transgenes in maize after introduction by particle bombardment. *Plant Mol. Biol.* 25: 951-961.
- Reyes JC, Hennig L, Gruissen W (2002): Chromatin-Remodeling and Memory Factors. *New Regulators of Plant Development*. *Plant Physiol.* 130: 1090-1101.
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A (2004): Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotech.* 22 (3): 326-330.
- Rhoades MW, Reinhardt BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002): Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 110: 513-520.
- Rooke L, Bekes F, Fido R, Barro F, Gras P, Tatham AS, Barcelo P, Lazzeri P, Shewry PR (1999): Overexpression of a gluten protein in transgenic wheat results in high elastic dough. *J. Cereal Sci.* 30: 115-120.
- Rudd S, Frisch M, Grote K, Meyers BC, Mayer K, Werner T (2004): Genome-wide in silico mapping of scaffold/matrix attachment regions in *Arabidopsis* suggests correlation of intragenic scaffold/matrix attachment regions with gene expression. *Plant Physiol.* 135 (2): 715-722.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996): *Epigenetic mechanisms of gene regulation*. Cold Spring Harbor Press.
- Sala F, Arencibia A, Castiglione S, Yifan H, Labra M, Savini C, Bracale M, Pelucchi (2000) Somaclonal variation in transgenic plants. *Acta Hort.* 530: 411-419.
- Salvo-Garrido H, Travella S, Bilham LJ, Harwood WA, Snape JW (2004): The distribution of transgene insertion sites in barley determined by physical and genetic mapping. *Genetics* 167 (3): 1371-1379.

- Saxena D, Stotzky G (2001): Bt corn has a higher lignin content than non-Bt corn. *Am. J. Bot.* 88: 1704-1706.
- Schubert D (2005): Regulatory regimes for transgenic crops. To the editor. *Nat. Biotech.* 23 (7): 785-787.
- Schwab R, Palatnik JF, Riester M, Schommer C, Schmid M, Weigel D (2005): Specific Effects of microRNA on the plant transcriptome. *Dev. Cell* 8 (4): 517-527.
- Seralini GE (2006): Genome Fluidity and Health Risks for GMOs. In Moch, K. (Ed.) (2006): *Epigenetics, Transgenic Plants & Risk Assessment Proceedings of the Conference at December 1st 2005, Literaturhaus, Frankfurt am Main, Germany. 2006, Öko-Institut e.V. ISBN-Nr. 3-934490-24-7. <http://www.oeko.de/oekodoc/277/2006-002-en.pdf>*
- Sharp PA (2005): The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* (30): 279 – 281.
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S, Ke DY (1999): Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J.* 20 (4): 401-412.
- Shu QY, Cui HR, Ye GY, Wu DX, Xia YW, Gao MW, Altosaa I (2002): Agronomic and morphological characterization of *Agrobacterium*-transformed Bt rice plants. *Euphytica* 127: 345-352.
- Sidorenko L, Bruce W, Maddock S, Tagliani L, Li XG, Daniels M, Peterson T (2003): Functional analysis of two matrix attachment region (MAR) elements in transgenic maize plants. *Transgen. Res.* 12 (2): 137-154.
- Snow A, Pilsen D, Rieseberg L, Paulsen M, Pleskac N, Reagon M, Selbo S, Wolfe D (2002): Effects of a Bt transgene on herbivory and fecundity in BC1 wild flower (*Helianthus annuus*). *ESA 2002 Annual Meeting.*
- Soltis P (2005): Ancient and recent polyploidie in angiosperms. *New Phytol.* 166: 5-8.
- Steimer A, Schöb H, Grossniklaus U (2004): Epigenetic control of plant development: new layers of complexity. *Curr. Opin. Plant Biotech.* 7: 11-19.
- Steinbrecher R (2005): siehe Anhang 1
- Stevenson DS, Jarvis P (2003): Chromatin silencing: RNA in the driving seat. *Curr. Biol.* 13: R13-R15.
- Stöcklin J (2004): *Moderne Konzepte in der Biologie zum Wesen von Pflanzen und ihrer Unterscheidung von Tieren. Literaturstudie erstellt im Auftrag der Eidgenössischen Ethikkommission für die Biotechnologie im Außerhumanbereich. August 2004.*
- Strohman R (2001): A new paradigm for life, beyond genetic determinism. *California monthly* April 2001.
- Taddei A, Hediger F, Neumann FR, Gasser SM (2004): The function of nuclear architecture: A genetic approach. *Annu. Rev. Genet.* 38: 305-345.
- Tappeser B, Hoffmann AK (2004): *Das überholte Paradigma der Gentechnik – Zum zentralen Dogma der Molekularbiologie fünfzig Jahre nach der Entdeckung der DNA-Struktur. Kritischer Agrarbericht 2004: 220-224.*

- Terada R, Urawa H, Inagaki Y, Tsugane K, Iida S (2002): Efficient gene targeting by homologous recombination in rice. *Nat. Biotech.* 20: 1030-1034.
- Thiele A, Herold M, Lenk I, Quail PH, Gatz C (1999): Heterologous Expression of Arabidopsis Phytochrome B in Transgenic Potato Influences Photosynthetic Performance and Tuber Dev. *Plant Physiol.* 120 (1): 73-81.
- Thiellement H, Zivy M, Plomion C (2002): Combining proteomic and genetic studies in plants. *J. Chromatogr.* 782: 137-149.
- Tijstermann M, Ketting RF, Plasterk RHA (2002): The Genetics of RNA Silencing. *Annu. Rev. Genet.* 36: 489-519.
- Ülker B, Allen GC, Thompson WF, Spiker S, Weissinger AK (1999): A tobacco matrix attachment region reduces the loss of transgene expression in the progeny of transgenic tobacco plants. *Plant J.* 18 (3): 253-263.
- Ülker B, Weissinger AK, Spiker S (2002): *E. coli* chromosomal DNA in a transgenic locus created by microprojectile bombardment in tobacco. *Transgen. Res.* 11: 311-313.
- Vain P, Worland B, Kohli A, Snape JW, Christou P, Allen GC, Thompson WF (1999): Matrix attachment regions increase transgenic rice plants and their progeny. *Plant J.* 18 (3): 233-242.
- Van Eldik GJ, Litiere K, Jacobs JJ, Van Montagu M, Cornelissen M (1998): Silencing of β -1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucleic Acids Res.* 26: 5176-5181.
- Vaucheret H, Elmayan T, Thierry D, van der Geest A, Hall T, Conner AJ, Mlynarova L, Nap JP (1998): Flank matrix attachment regions (MARs) from chicken, bean, yeast or tobacco do not prevent homology-dependent trans-silencing in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 259: 388-392.
- Veilleux RE, Johnson AT (1998): Somaclonal variation: molecular analysis, transformation interaction, and utilization. *Plant Breed. Rev.* 16: 229-268.
- Vencill WK (1999): Increased susceptibility of glyphosate-resistant soybean to stress. *British Crop Protection Council (eds.). The Brighton Conference – Weeds.*
- Venter JC et. al. (2001): The sequence of the human genome. *Science* 291: 1340-1351.
- Waddington CH (1942): The epigenotype. *Endeavour* 1: 18–20.
- Wagner D (2003): Chromatin regulation of plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6: 20-28.
- Waterhouse PM, Wang M, Laugh T (2001): Gene silencing as an adaptive defence strategy against viruses. *Nature* 411: 834-842.
- Weigel D (2005): siehe Anhang 1
- Weigel D, Jürgens G (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415: 751-754.
- Wilson A, Latham J, Steinbrecher R (2004): Genome Scrambling – Myth or Reality? Transformation-induced Mutations in Transgenic Crop Plants. (EcoNexus, Brighton, UK, 2004). <http://www.econexus.info>

- Windels P, Taverniers I, Depicker A, Bockstaele EV, Loose MD (2001): Characterisation of the Roundup Ready Soybean insert. *Eur. Food Technol.* 213: 107-112.
- Wolfe AP, Matzke MA (1999): Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* (286): 481-486.
- Xia LQ, Xu QF, Guo SD (2005): Bt insecticidal gene and its temporal expression in transgenic cotton plants. *Acta Agronomica Sinica* 31: 197-202. (Nur Abstract)
- Xiong LZ, Xu CG, Saghai-Maroo MA, Zhang Q (1999): Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Mol. Gen. Genet.* 261: 439-446.
- Xue H, Yang YT, Wu CA, Yang GD, Zhang MM, Zheng CC (2005): TM2, a novel strong matrix attachment region isolated from tobacco, increases transgene expression in transgenic rice calli and plants. *Theor. Appl. Genet.* 110 (4): 620-627.
- Yang GJ, Lee YH, Jiang YM, Kumpatla SP, Hall TC (2005): Organization, not duplication, triggers silencing in a complex transgene locus in rice. *Plant Mol. Biol.* 58 (3): 351-366.
- Ye XD, Al-Babili S, Klöti A, Zhang J, Lucca P, Beyer P, Potrykus I (2000): Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 287 (5451): 303-305.
- Ye X, Wu X, Zhao H, Frehner M, Nösberger J, Potrykus I, Spangenberg G (2001): Altered fructan accumulation in transgenic *Lolium multiflorum* plants expressing a *Bacillus subtilis* sacB gene. *Plant Cell Rep.* 20 (3): 205-212.

Anhang 1

Die im Rahmen des Gutachtens befragten Experten sind:

- Dr. Matthias Fladung, Privatdozent am Institut für Forstgenetik und Forstpflanzenzüchtung, Großhansdorf, der Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft,
- Dr. Jens Freitag, Projektleiter der Genomanalyse im Biologischen System Pflanze (GABI), Max-Planck-Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Golm.
- Dr. Frederick Meins, Leiter der Arbeitsgruppe Epigenetische Regulation und post-transkriptionelles *Gene Silencing* am Friedrich Miescher Institut, Basel
- Dr. Ricarda Steinbrecher, EcoNexus, eine gemeinnützige wissenschaftliche Einrichtung öffentlichen Interesses und Überwachungseinrichtung der Wissenschaft.
- Dr. Detlef Weigel, Max-Planck-Institut für Entwicklungsbiologie, Tübingen, Leiter des Fachbereiches Molekularbiologie

Ihre Aussagen sind im Fließtext als Fladung (2005), Freitag (2005), Meins (2005), Steinbrecher (2005) und Weigel (2005) zitiert.