

Gentechnik-Nachrichten Spezial 6

Februar 2001

unterstützt durch

**Gerling-Stiftung, Triodos-Stichting, Mahle-Stiftung &
Zukunftsstiftung Landwirtschaft**

Pleiotrope und Positionseffekte - ungewollte Effekte der Gentechnik

INHALT

Vorwort.....	1
Begriffserklärung.....	2
Pleiotrope Effekte.....	2
Positionseffekte.....	2
Beispiele aus dem Bereich der Mikroorganismen.....	2
Ende gut, alles gut? <i>E. coli</i> und die industrielle Nutzung von Indigoblau.....	2
Hefen - Mehr Alkohol, mehr schädliche Stoffe?.....	3
Beispiele aus dem Reich der Pflanzen.....	3
<i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Petunien - Lachsfarben im Gewächshaus - gesprenkelt im Freiland.....	3
Herbizidresistente Soja - Hitzeempfindlich.....	4
Roundup Ready Baumwolle - Stressempfindlich.....	4
Transgener Raps - induzierbare Samenruhe.....	4
Transgene Kartoffeln - Änderung morphologischer und phänologischer Eigenschaften.....	4
Transgene Bäume - Frühblüher.....	4
Beispiele aus dem Reich der Tiere.....	5
Transgene Fische - gestörter Hormonhaushalt.....	5
Risikoaspekte.....	5
Literatur.....	6

Vorwort

Während die Abfolge der DNA-Bausteine heute relativ leicht entschlüsselt werden kann, steht man bei der Erforschung und beim Verständnis der komplexen übergeordneten Zusammenhänge und Wechselwirkungen innerhalb der genetischen Information erst am Anfang des Erkenntnisgewinns. Ein und dasselbe Gen kann verschiedene Ausprägungen oder Wirkungen haben (pleiotrope Effekte). Zudem kann ein und dasselbe Gen, abhängig vom Ort seines Einbaus, durch den unterschiedlichen Einfluss der umgebenden Gene unterschiedliche Bedeutung erhalten (Positionseffekte). Das heißt, die gleichen Gene können in unterschiedlichen Organismen und verschiedenem Kontext zu unterschiedlichen Eigenschaftsveränderungen führen. Durch solche Effekte können auch ökologisch wichtige Merkmale von gentechnisch veränderten Organismen verändert werden.

Solchen ungewünschten, zusätzlichen „Nebenwirkungen“ gentechnischer Veränderungen widmet sich dieses Spezial. Allerdings werden pleiotrope und Positionseffekte nicht systematisch in der Literatur aufgeführt. Häufig weisen beispielsweise die gentechnisch veränderten Pflanzen, bei denen pleiotrope oder Positionseffekte auftreten, schlechtere agronomische Werte auf als die nicht-transformierten Ausgangslinien und werden daher im Laufe der Weiterentwicklung im Labor aussortiert. Aufgrund dieser Tatsache können an dieser Stelle nur einzelne Fallbeispiele dokumentiert werden.

Begriffserklärung

Pleiotrope Effekte

Pleiotropie bedeutet, dass ein Gen für die Ausbildung mehrerer verschiedener Merkmale oder Eigenschaften verantwortlich sein kann. Der Begriff pleiotroper Effekt bezeichnet bei transgenen und nicht-transgenen Organismen eine oftmals unvorhergesehene Veränderung mehrerer Merkmale, wenn nur ein Merkmal verändert werden soll. Pleiotrope Effekte können folglich die unterschiedlichsten Erscheinungen oder Prozesse in Organismen beschreiben. Zumeist sind dies Veränderungen im Zellstoffwechsel, die zu phänotypischen¹ Veränderungen der Pflanze führen können (LIPS, 1998).

Unter pleiotropen Effekten wird zum Teil auch das Phänomen des „gene silencing“ aufgeführt, auf das an dieser Stelle aber nicht weiter eingegangen werden soll. Der Grund für ein solches „gene silencing“ ist die Abnahme der Menge der mRNA² des entsprechenden Transgens, d.h. das Transgenkonstrukt ist weiterhin vorhanden, die Expression ist aber stark vermindert oder ganz verloren (MITTELSTEN-SCHIED, 1995).

Positionseffekte

Dieser Begriff beschreibt den Einfluss der Position eines Gens auf seine Aktivität. Es handelt sich also um Effekte, die darauf beruhen, dass ein Gen je nach seiner Lage im Genom eines bestimmten Organismus verschiedene Aktivität und Wirkung auf andere Gene haben kann.

Positionseffekte erfahren in der wissenschaftlichen Literatur eher Aufmerksamkeit als pleiotrope Effekte, da nach bisherigem Kenntnisstand der Integrationsort unter anderem Einfluss auf die Höhe und die Stabilität der Genexpression nimmt.

Bezogen auf messbare Stoffwechselverschiebungen oder phänotypisch sichtbare Veränderungen lässt sich allerdings in der Regel nicht zweifelsfrei entscheiden, ob es sich bei den beobachteten Effekten um Positions- oder Pleiotropieeffekte oder gar eine Kombination von beiden handelt.

Beispiele aus dem Bereich der Mikroorganismen

Zu den Effekten von gentechnisch veränderten Mikroorganismen liegen trotz deren tagtäglichen Verwendung vom Labor bis hin zur industriellen Anlage nur wenige Untersuchungen zu möglichen Umweltwirkungen vor. Insofern sind auch Daten zu Positions- und Pleiotropieeffekten spärlich.

Ende gut, alles gut? *E. coli* und die industrielle Nutzung von Indigoblau

Eines der frühesten Beispiele für pleiotrope Effekte von Transgenen in Mikroorganismen ist für gentechnisch veränderte *Escherichia coli* beschrieben. Bereits 1983 veröffentlichten Wissenschaftler unerwartete Ergebnisse bei der gentechnischen Veränderung von *E. coli* Bakterien. In diese waren Gene eingefügt worden, die einen Naphtalen-Abbau zu Salicylsäure ermöglichen sollten. Zusätzlich zu diesem Abbau produzierten die Bakterien nun Indigoblau, da durch die Integration der neuen Enzyme die Umsetzung des in den Bakterien vorkommenden Indols zu Indigoblau vollzogen werden konnte. Mittlerweile wird diese unerwartete Entdeckung industriell genutzt (AMATO 1991).

¹ Der Phänotyp ist das Erscheinungsbild eines Individuums. Er wird durch die Summe aller Merkmale, die in den Genen verankert sind, und durch äußere Einflüsse geprägt.

² Die mRNA ist eine „Kopie“ des (Trans-)Gens, das in der Zelle zur Informationsweitergabe an den Produktionsort für die Herstellung der Genprodukte benötigt wird.

Hefen - Mehr Alkohol, mehr schädliche Stoffe?

Die Herstellung bestimmter Enzyme zur Steigerung der Alkoholfermentation in transgener Hefe führte zu einer gesteigerten Bildung von Methylglyoxal, einem mutagenen Stoff, der in nicht-transformierten Zellen allenfalls in Spuren vorkommt. Mit der gentechnischen Veränderung wurde offensichtlich ein Stoffwechselweg in Gang gesetzt, der neben der normalen Glykolyse beschriftet werden kann und der durch die erhöhten Enzymkonzentrationen induziert wurde (IMOSE & MURATA 1995).

Beispiele aus dem Reich der Pflanzen

Im Bereich der transgenen Pflanzen sind pleiotrope Effekte vor allem bei herbizidresistenten Pflanzen untersucht und festgestellt worden.

Im Kontext von pleiotropen Änderungen spricht die CALAGENE Inc. (1990) davon, dass ein Drittel aller transgenen Linien pleiotrope Effekte, die nicht direkt mit der Natur des eingefügten Gens bzw. des Genprodukts in Zusammenhang stehen, zeigen. Allerdings gibt es dazu kaum wissenschaftliche Untersuchungen, da die betreffenden Pflanzen in der Regel im Laufe der Herstellung einer transgenen Sorte aussortiert werden.

Arabidopsis thaliana

Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand) gilt als DIE Modellpflanze der Gentechniker. Auch hier gibt es Beispiele für unbeabsichtigte Effekte, die durch gentechnische Eingriffe in das Erbgut bedingt sind. BERGELSON ET AL. (1996) untersuchten die Auswirkungen eines Herbizidresistenzgens auf die Fitness der Pflanze. Dabei diente deren Samenproduktion im Freiland als Fitness-Indikator. Es wurden transgene herbizidresistente *Arabidopsis*-Pflanzen sowohl mit *Arabidopsis*-Pflanzen verglichen, die aufgrund einer Mutation die Herbizidresistenz entwickelt haben, als auch mit Pflanzen der herbizidempfindlichen Ausgangslinie. In der Überprüfung wiesen die transgenen Pflanzen eine erheblich verringerte Fitness auf, die eindeutig pleiotropen Effekten des Herbizidresistenzgens zugeschrieben werden konnte.

Eine weitere beobachtete Veränderung dürfte auf einer Kombination von pleiotropen und Positionseffekten beruhen: Ebenfalls gentechnisch veränderte, herbizidresistente *Arabidopsis*-Pflanzen neigten trotz der normalerweise strengen Selbstbefruchtung in der transgenen Variante zu Fremdbestäubung. Mit der Fremdbestäubung geht gerade bei den Kreuzblütlern, zu denen die Ackerschmalwand gehört, ein erhöhtes Risiko der Ein- oder Auskreuzung von (transgenen) Eigenschaften einher.

Petunien - Lachsfarben im Gewächshaus - gesprenkelt im Freiland

Eines der bekanntesten Beispiele für Pleiotropie- und Positionseffekte sind transgene Petunien, die durch eine eingefügtes Mais-Gen lachsrote Farbe annehmen sollten und die als erste freigesetzte Pflanzen in Deutschland für Schlagzeilen sorgten. Verhielten sich die Petunien im Gewächshaus noch wie geplant, so überraschten die Pflanzen im Freisetzungsvorhaben mit einer ganzen Reihe unvorhergesehener Effekte. Die Petunien blühten überwiegend weiß oder gesprenkelt. Zudem hatten die Pflanzen mehr Blätter und Triebe während ihre Fruchtbarkeit herabgesetzt war. Den Angriffen bestimmter krankheitsauslösender Pilze konnten sie besser widerstehen, als ihre nicht gentechnisch veränderten Elternpflanzen. Mit Hilfe späterer Versuche wurden diese Effekte als „gene silencing“ identifiziert, die zudem abhängig von der Entwicklung und verschiedenen Umwelteinflüssen waren (MEYER ET AL., 1992).

Herbizidresistente Soja - Hitzeempfindlich

Bei Roundup Ready Soja wird vermutet, dass eine bis zu 20% höhere Lignifizierung³ der transgenen Pflanzen darauf zurückzuführen ist, dass das eingeführte bakterielle Enzym ungeplante Wirkungen auf den Ligninstoffwechsel ausübt und damit zu einer „Überlignifizierung“ der Sojapflanzen führt (GERTZ ET AL., 1999; COGLAN, 1999). Unter Stressbedingungen wirkte sich dieser Effekt negativ auf die transgenen Sojabohnen aus. So reduzierte ein herbeigeführter Wassermangel das Frischgewicht der transgenen Sorte um 48% im Vergleich zu 24% bei der nicht-transgenen Sorte. Auch Hitzestress führte zu geringeren Erträgen bei den transgenen Sorten (VENCILL, 1999). Weiterhin konnte bei den transgenen Sojapflanzen ein veränderter Hormonhaushalt festgestellt werden, wobei der Gehalt verschiedener Pflanzenhormone bis zu 14% verringert war (LAPPE ET AL., 1999).

Roundup Ready Baumwolle - Stressempfindlich

Bei Baumwolle, die resistent gegen das Totalherbizid Roundup ist, kam es 1997 im kommerziellen Anbau im amerikanischen Bundesstaat Mississippi zu Kapseldeformationen und -abwürfen. Ungefähr 200 Farmer erlitten dadurch enorme wirtschaftliche Verluste (HAGEDORN, 1997). Allerdings wurde bisher noch keine genaue Ursachenanalyse des Phänomens vollzogen. Dennoch ist es denkbar, dass die herbizidresistente Baumwolle ähnlich wie die transgenen Sojavarianten aufgrund pleiotroper Effekte stressempfindlich reagiert.

Transgener Raps - induzierbare Samenruhe

Bei Untersuchungen von transgenen Sommerrapsorten, die einen erhöhten Stearat- bzw. Lauratgehalt aufwiesen, konnten pleiotrope Effekte festgestellt werden, die für eine Risikobewertung relevant sind: Beide transgene Linien zeigten unter bestimmten Bedingungen eine erhöhte Rate induzierbarer tiefer Samenruhe. Dies kann die Möglichkeit zur Bildung einer Samenbank und damit zu einer Etablierung wilder Populationen verstärken (LINDER, 1998).

Transgene Kartoffeln - Änderung morphologischer und phänologischer Eigenschaften

Bei gentechnischen Veränderungen des Grundstoffwechsels können pleiotrope Effekte auftreten, die sich in Veränderungen von Pflanzeninhaltsstoffen und in veränderten morphologischen und phänologischen Eigenschaften äußern. So zeigten beispielsweise transgene, fructanbildende Kartoffeln, die von BECKER ET AL. (2000) untersucht wurden, u.a. ein verändertes Blühverhalten und veränderte Triebblängen. Zudem wurde ein deutlich verringerter Ertrag verzeichnet. Frühere Versuche mit transgenen Kartoffeln, die im Phosphat- und Kohlenhydratstoffwechsel verändert waren, lieferten ähnliche Ergebnisse (BECKER ET AL., 1998).

Transgene Bäume - Frühblüher

Bei transgenen Bäumen wurden unter Freilandbedingungen relativ häufig Pleiotropie- und Positionseffekte beobachtet. Bereits durch Gewächshausexperimente war bekannt, dass Pappeln, die mit einem bestimmten Promoter⁴ versehen waren, früher blühen können, als nicht-transgene Kontrollgruppen (FLADUNG ET AL., 1999). Als Grund wird ein signifikant erhöhter Phytohormonlevel vermutet, der bei den transgenen Pappeln beobachtet wurde (FLADUNG ET AL., 1997), und der im allgemeinen eng mit dem Blühverhalten von Pflanzen verknüpft wird. Bei einem 1996 begonnenen Freisetzungsversuch wurden dann auch nach 3 Jahren an einer Pflanze weibliche Blütenknospen entdeckt. Natürlicherweise blühen Pappeln erst nach 8 Jahren.

Das Risiko von Ausbreitungsmöglichkeiten bei transgenen Bäumen, das sich bei einem männlichen Blütenstand ergeben würde, ist aufgrund der Hybridisierungsmöglichkeiten bei Pappeln immens. Denn

³ Lignin ist ein Holzstoff, der den Zellen Stabilität verleiht. Seine Einlagerung schränkt aber auch die Versorgung mit Wasser und Nährstoffen sowie insgesamt die Elastizität der Zellen ein.

⁴ Promoter: eine Regulationsregion der DNA, die die Genaktivität mitbestimmt.

insbesondere für die Gattungen Populus, Eukalyptus und Pinus - Gattungen also, die intensiv gentechnisch bearbeitet werden - sind hohe Hybridisierungspotentiale bekannt. Bei Pappeln sind beispielsweise in den nördlichen, gemäßigten Zonen ca. 30 Arten mit zahlreichen Hybriden bekannt (DIFAZIO ET AL., 1999).

Beispiele aus dem Reich der Tiere

Transgene Fische - gestörter Hormonhaushalt

Die diversen bereits vorgenommenen gentechnischen Veränderungen bei Fischen gehen zum Teil mit großen Pleiotropie-Effekten einher. Häufig werden Wachstumshormongene in die Fische eingeführt. Hierdurch wird generell der Wachstumshormonhaushalt verändert. Große Wachstumssteigerungen z.B. bei transgenen Lachsen hatten unter anderem extreme Kopf- und andere Körperdeformationen sowie veränderte Fettablagerungen zur Folge (DUNHAM 1999). Eine Übersicht über körperliche Deformationen bei transgenen Fischen von PANDIAN ET AL. (1999) zählt folgende aufgetretene Veränderungen auf: Tumore, veränderte Flossen- und Wirbelformen, Schädeldeformationen, abnormes Kiemenwachstum, fehlende Körpersegmente sowie verkümmerte Nacken- und Schwanzformen.

Neben den Pleiotropieeffekten treten darüber hinaus bei transgenen Fischen Probleme mit der Stabilität der Genexpression auf. Zudem ist Moaizismus, d.h., dass innerhalb eines modifizierten Individuums sowohl Zellen mit als auch ohne die übertragene Gensequenzen vorkommen, ein bei allen transgenen Fischen vorkommendes Phänomen. Dabei variiert die Anzahl der eingebauten Zielsequenzen von Zelle zu Zelle, Organ zu Organ und von Individuum zu Individuum. Gerade bei übertragenen Wachstumshormongenen gibt es hierfür einige Beispiele. Unter anderem konnte dieses Phänomen bei Welsen, Zebrafischen und Karpfen festgestellt werden.

Risikoaspekte

Pleiotropie- und Positionseffekte sind methodisch bedingte Risiken der Gentechnik, die relativ häufig beobachtet werden, obwohl in der Forschung kein besonderes Augenmerk auf deren Erscheinen gelegt wird.

Die Beschreibung der Effekte ist allerdings stark abhängig von der Intensität der Untersuchungen an den transgenen Organismen. Solche beobachteten und beschriebenen Effekte beinhalten sowohl die Veränderung agronomischer Merkmale als auch dauerhafte Schwankungen des Expressionsniveaus. Werden derartige nachteilige Effekte bemerkt, werden die transgenen Pflanzen in der weiteren Entwicklung in der Regel aussortiert.

Zum Risiko können pleiotrope und Positionseffekte aber dann werden, wenn durch sie neue Ausbreitungseigenschaften, toxische oder allergene Substanzen entstehen (LIPS, 1998).

Risiken, die im Zusammenhang mit pleiotropen und Positionseffekten diskutiert werden:

- das Einschleusen fremder Proteine/Enzyme kann zu unvorhersehbaren Stoffwechselreaktionen und somit zu neuen, möglicherweise toxischen oder allergenen Genprodukten führen;
- das Einschleusen fremder DNA-Sequenzen kann am Integrationsort vorhandene Gene beeinflussen oder zerstören und somit den Gesamtkontext des Genoms aus dem Gleichgewicht bringen oder möglicherweise sogar zu toxischen oder allergenen Metaboliten führen;
- die Organismen sind fähig, die Expression eingeführter Fremdgene zu beeinflussen oder abzuschalten, wodurch ein gleichmäßiges Expressionsniveau nicht mehr gewährleistet scheint (LIPS, 1998);
- Wirkungen auf sekundäre Pflanzenstoffe.

Literatur

- AMATO G (1991) Species hybridization and protection of endangered animals, *Science*, 253: 250.
- BECKER R, AUGUSTIN J, BEHRENDT U, GRANSEE A, HEDTKE C, LÜTTSCHWANGER D, MÜLLER M, ULRICH A (2000) Ökologische Begleitforschung zum Anbau von transgenen Kartoffeln mit Veränderung im Grundstoffwechsel. Landesumweltamt Brandenburg, Müncheberg.
- BECKER R, MARTY B, ULRICH A (1998) Experimentelle Verifizierung von Veränderungen risikorelevanter ökologischer Parameter bei transgenen Kartoffeln mit Veränderungen im Phosphat- und Kohlenhydratmetabolismus. Landesumweltamt Brandenburg, Müncheberg.
- BERGELSON J, PURRINGTON CB, PALM CJ, LOPEZ-GUTIERREZ JC (1996) Costs of resistance: a test using transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the Royal Society of London, B*, 263: 1659-1663.
- CALAGENE INCORPORATED (1990) *Kan^R Gene: Safety and Use in the Production of Genetically Engineered Plants. Request for Advisory*. Calagene Incorporated Vol 1 of 2: 233, 1920 Fifth Street, Davis California 95616 zitiert aus: 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.
- COGHLAN A (1999) Splitting Headache, *New Scientist*, 20. Nov. 1999.
- DIFAZIO SP, LEONARDI S, CHENG S, STRAUSS SH (1999) Gene flow and agriculture; relevance for transgenic crops. *Proceedings of a symposium held at Keele, UK on 12-14 April 1999, BCPC Symposium Proceedings No 72:171-176*.
- DUNHAM RA (1999) Utilization of transgenic fish in developing countries: Potential benefits and risks. *Journal of the World Aquatic Society*, 30(1).
- FLADUNG M, GROSSMANN K, AHUJA MR (1997) Alterations in hormonal and developmental characteristics in transgenic *Populus*. *Journal of Plant Physiology, Germany*, 150: 420-427.
- FLADUNG M, NOWITZKI O, EBBINGHAUS D, SCHELLHORN A, BENTJEN G, AHUKA MR, MUHS HJ (1999) Field release of ROLC-transgenic Aspen-*Populus*. Online: http://users.ox.ac.uk/~dops0022/conference/forest_biotech99_home.html Poster 47, 3.12.1999.
- GERTZ JM (JR.), VENCILL WK, HILL NS (1999) Tolerance of transgenic soybean (*Glycine max*) to heat stress. *British Crop Protection Conference, 15-18 November 1999 - Weeds, Proceedings of an International Conference, Brighton*, 3: 835-840.
- HAGEDORN C (1997) Boll drop problems in roundup-resistant cotton. *Crop and Soil Environmental News*, 12/1997.
- INOSE T, MURATA K (1995) Enhanced accumulation of toxic compound in yeast cells having high glycolytic activity: a case study on the safety of genetically engineered yeast. *International Journal of Food Science and Technology* 30: 141-146.
- LAPPE MA, BAILEY EB, CHILDRESS C, SETCHELL KDR (1999) Alterations in Clinically important phytoestrogens in genetically modified, herbicide-tolerant soybeans. *Journal of Medicinal Food*, 1(4).
- LINDER CR (1998) Potential persistence of transgenes: Seed performance of transgenic canola and wild x canola hybrids. *Ecological Applications* 8: 1180-1195.
- 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.
- 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.
- MITTELSTEN-SCHIED O (1995) Transgene Inactivation in *Arabidopsis thaliana*. In: MEYER P (Ed.) *Gene Silencing in Higher Plants and Related Phenomena in Other Eukaryotes*: 29-43, Springer Verlag Berlin.
- PANDIAN TJ, VENUGOPAL T, KOTEESWARAN R (1999) Problems and prospects of hormone, chromosome and gene manipulation in fish. *Current Science* 76: 369-386.
- VENCILL WK (1999) Increased susceptibility of glyphosate-resistant soybean to stress (abstract). In: *British Crop protection Council 8eds.) The 1999 Brighton Conference - Weeds*.