

Diskussionspapier: Das überholte Paradigma der Gentechnik

Im Auftrag von Greenpeace Deutschland

Freiburg, den 31. August 2004

Katja Moch, Freiburg

Öko-Institut e.V.

Geschäftsstelle Freiburg

Postfach 6226

D-79038 Freiburg

Tel.: 0761 – 452 95 0

Fax: 0761 – 47 54 37

Inhaltsverzeichnis

Allgemein	1
Pflanzengenome – „Size does not matter“	1
Polyloidie.....	2
Epigenetik.....	3
Chromatinstruktur und ihr Einfluss	4
Methylierung und Imprinting in Pflanzen.....	5
Gene Silencing	5
Post-transkriptionelle Regulation	6
Keimzellen – Pflanzen können Erfahrungen weiter geben	6
Transgene Pflanzen	8
Effekte auf genetischer Ebene	8
Insertion des Genkonstrukts und Nebeneffekte	8
Somaklonale Variation	10
Elemente, die Rekombinationen verstärken können	10
Bedeutung für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen.....	11
Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen.....	12
Silencing von Transgenen	12
Positionseffekte	14
Bedeutung für die Risikobewertung transgener Pflanzen	15
Pleiotrope Effekte	16
Beispiel: transgene herbizidresistente Sojabohne	16
Beispiel „Golden Rice“	17
Beispiel transgene virusresistente Kartoffel	18
Umwelteinflüsse	18
Bedeutung für die Risikobewertung transgener Pflanzen	19

Fazit und Forschungsbedarf..... 20

Literatur..... 22

Allgemein

Das Verständnis darüber, wie das Genom strukturiert ist und reguliert wird, hat sich in den letzten Jahren grundlegend geändert. Die Entschlüsselung des Genoms verschiedener Organismen hat eine hohe Übereinstimmung auf der Ebene der DNA gezeigt. Darüber hinaus enthalten die Genome generell weniger Gene als die große Anzahl an Proteinen es zunächst erwarten ließen. Das menschliche Genom enthält etwa mit einer Größe von drei Milliarden Basenpaaren lediglich 30.000 bis 40.000 Gene, die für mehr als 250.000 verschiedene Proteine kodieren. Das ehemalige Paradigma der Molekularbiologie „Ein Gen - ein Protein, bzw. ein Effekt“ ist hinreichend widerlegt. Das Blickfeld der Forschung hat sich in der „Post-Genomics“-Ära auf „Epigenetics“, der Erforschung der Genregulation, sowie auf „Proteomics“, der Analyse sämtlicher Proteine und deren Interaktionen in einem Organismus, erweitert. Hinzu kommt noch das Forschungsfeld „Metabolomics“, die Analyse des Stoffwechsels, das versucht, das Zusammenspiel unterschiedlicher Regulationsebenen in einem Organismus aufzuklären. Die neuen Erkenntnisse zur komplexen und dynamischen Genomregulation sind aber noch nicht in der Risikobewertung transgener Pflanzen eingeflossen. Ein neues Paradigma, zumindest in der Pflanzengentechnik, hat sich bisher noch nicht etabliert.

In diesem Diskussionspapier wird zunächst kurz dargestellt, wie der Wissensstand bezüglich der Genomorganisation bei Pflanzen ist. Anschließend wird eingehend auf die Forschung an transgenen Pflanzen eingegangen.

Pflanzengenome – „Size does not matter“

Der Unterschied zwischen den Genomen von Pflanzen und Tieren oder dem menschlichen Genom sind auf der genetischen Ebene graduell und qualitativ.¹ Pflanzengenome sind generell größer als Genome von Tieren. Dennoch besteht kein Zusammenhang zwischen Genomgröße und Komplexität des Organismus. Innerhalb der Angiospermen variiert die Genomgröße um den Faktor 2000. Im allgemeinen weisen pflanzliche Genome mehr Wiederholungssequenzen (repetitive Sequenzen) sowie mobile genetische Elemente, sogenannte Transposons, auf. Auch Polyploidie tritt bei Pflanzen vermehrt auf. Pflanzen unterscheiden sich von Tieren zudem in der Chromatinstruktur, dem sogenannten Histone-Code und in den darin involvierten Enzymen. Zudem besitzen Pflanzen eine hohe Zahl an Transkriptionsfaktoren.

¹ Das Wissen zu Unterschieden hängt vor allem davon ab, wie lange dazu schon geforscht wird. So wurden zum Beispiel zuerst in Mais Transposons entdeckt (McCLINTOCK 1965). Diese „springenden Gene“ werden an Mais nun 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).

Pflanzengenome verglichen mit tierischen Genomen zeichnen sich durch eine besondere Flexibilität aus, was sich etwa bei Genduplikationen zeigt (siehe unter „Polyploidie“). Auch die Regulationsmechanismen der Genexpression können sehr flexibel reagieren. Dies zeigt die hohe Anpassungsfähigkeit von Pflanzen als sessile, ortsgebundene Organismen an wechselnde Umweltbedingungen. Auch die phänotypische Plastizität² der Pflanzen weist darauf hin, dass besonders in den Regulationsmechanismen der Genexpression Unterschiede zu Tieren zu suchen sind (siehe unter „Epigenetik“). Darüber hinaus unterscheiden sich die Pflanzen von den Tieren darin, dass Pflanzen in einem besonderen Maße Erfahrungen des bisherigen Wachstums und erworbene Eigenschaften an die Nachkommen weiter geben können (siehe unter „Keimzellen“).

Gegenüber Tieren weisen Pflanzen zudem besondere Stoffwechselwege auf, die in den vielen sekundären Inhaltstoffen mündet, die den Pflanzen beispielsweise gegen Herbivore schützen. Die Vielfalt der sekundären Inhaltstoffe konnte bisher nur teilweise auf genetischer Ebene geklärt werden. Eine große Rolle spielt dabei das alternative *Splicing* von mRNA, Proteinprozessierung und Interaktionen von Proteinen in den Stoffwechselwegen. Der Sekundärstoffwechsel wird auch in besonderem Maße durch Einflüsse von außen mitgesteuert. Auf dieses Themenfeld, so wichtig es gerade wegen der Interaktion zwischen Pflanzen und Umwelt ist, wird im weiteren nicht näher eingegangen.

Polyploidie

Besonders Blütenpflanzen besitzen erhebliche Wiederholungen im Genom, die auf Duplikationen des gesamten Genoms zurückzuführen sind. Dieser als Autopolyploidie bezeichnete Mechanismus ist wesentlich weiter verbreitet als jahrzehntelang angenommen (SOLTIS et al. 2003). Allerdings kann nicht immer eindeutig zwischen Auto- und Allopolyploidie³ unterschieden werden. Wenig ist zudem darüber bekannt, ob und wie solche Genomumordnungen periodisch auftreten (KING 2002). Mehr als 70 % der Blütenpflanzen weisen eine oder mehrere Episoden von Chromosomenverdoppelung auf (MASTERSON 1994). Sogar das kleine Genom von *Arabidopsis thaliana* zeigt genomweite Duplikationen, Umordnungen, Deletionen und Inversionen (BLANC et al. 2000). Nach Polyploidisierung treten oft zusätzliche DNA-Fragmente sowie Umordnungen, Deletionen von Chromosomen oder einzelnen Sequenzen, *Genome Downsizing*⁴ oder eine Stilllegung der duplizierten Gene auf (SOLTIS et al. 2003, OSBORNE et al. 2003). Genomduplikationen

² Phänotypische Plastizität bedeutet, dass ein bestimmter Genotyp unterschiedliche Phänotypen in Abhängigkeit von wechselnden Umweltbedingungen ausbilden kann.

³ Bei Allopolyploidie entstammen die mehrfach vorhandenen Chromosomen zwei Arten. Weizen, Hafer, Zuckerrohr, Kaffee, Baumwolle und Raps sind natürliche allopolioide Pflanzen (MATZKE & MATZKE 1998).

⁴ Mit *Genome Downsizing* ist allgemein eine Verkleinerung des Genoms gemeint, dem unterschiedliche molekulare Mechanismen zu Grunde liegen können.

werden erstaunlich stark und erstaunlich lange geschützt und konserviert (LYNCH & FORCE 2000).

Über den evolutiven Einfluss der Genomgröße ist noch wenig bekannt (KING 2002). Polyploidie und eine Anreicherung von Wiederholungssequenzen werden aber als ein wichtiger Antrieb in der Pflanzenevolution gesehen. Die Ursachen für eine derart häufige Polyploidie wird 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 für den Heterosis-Effekt angenommen (OSBORN et al. 2003).

Polyploidie hat Auswirkungen auf die Größe der Pflanzen, die Blühzeit und den reproduktiven Output. Polyploide Nachkommen können überdauern, weil sie die (nicht-polyploiden) Elternart ersetzen, oder sie koexistieren miteinander und belegen nach und nach unterschiedliche Habitate. Gerade allpolyploide Pflanzen können neue Entitäten mit eigenen evolutive Tendenzen darstellen.

Leider gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zu den Auswirkungen der Polyploidie. COMAI et al. (2000) zeigten bei neuen allotetraploiden *Arabidopsis*-Pflanzen phänotypische Veränderungen. Es wurden auch signifikante Effekte des Ployploidie-Grades auf die Interaktion mit Herbivoren oder Bestäubern gezeigt. Tetraploide *Heuchera grossulariifolia* (Saxifragaceae, „Purpurglöckchen“, eine Staude, die in Nord-Westamerika vorkommt) wurden stärker von Motten befallen als diploide Pflanzen derselben Art im gleichen Gebiet. Gleichzeitig wurden die diploiden Pflanzen häufiger von Hummeln und Bienen besucht (in SOLTIS et al. 2003).

Epigenetik

Epigenetik ist nach RUSSO et al. (1996) das Studium von Effekten, die mitotisch und/oder meiotisch vererbbar sind und nicht auf eine Änderung der DNA zurückgeführt werden können. MEINS & BINNS (1979) definieren epigenetische Änderungen weiterreichend, und zwar als 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.

Auch bei der Entwicklung und beim Wachstum der Pflanzen spielen epigenetische Effekte eine entscheidende Rolle (STEIMER et al. 2004). Epigenetische Veränderungen, insbesondere in Form der Chromatinstruktur sind für die phänotypische Plastizität der Pflanzen verantwortlich (WAGNER 2003). Schließlich können Pflanzen über epigenetische Veränderungen schnell auf Umwelteinflüsse reagieren. Der direkte Einfluss von Umweltwirkungen ist an einigen Beispielen gezeigt worden (siehe unter „Umwelteinflüsse“).

Die Rolle von epigenetischen Effekten auf die Evolution wurde bisher nicht beachtet, ist aber möglicherweise aber bedeutend. Beispielsweise fanden CUBAS et al. (1999) als Ursache für

Mutanten von *Linaria vulgaris* („Gemeines Leinkraut“), die statt der dorsiventralen Blüten radiärsymmetrische Blüten bildeten, Hypermethylierung und damit Stilllegung des Gens, das die dorsiventale Entwicklung steuert. Die Gestalt der Blüten ist ein wichtiges Artbildungsmerkmal und kann zum Beispiel entscheidend für den Besuch von Bestäubern sein.

Chromatinstruktur und ihr Einfluss

Dem Chromatin⁵ könnte die Funktion einer Schnittstelle zwischen der DNA und der Ausprägung des Organismus zugeordnet werden. Vom Chromatin ist abhängig, ob Genomabschnitte abgelesen werden oder nicht (JENUWEIN & ALLIS 2001).

Das Chromatin ist in bestimmten Domänen organisiert. Schleifen in der Chromatinstruktur sind wichtige funktionelle Einheiten. Chemische Modifikationen des Chromatins (Methylierungen, Acetylierungen, Phosphorylierungen) verändern den Zugang zur DNA und bestimmen die synergistische oder antagonistische Interaktion mit Chromatin-assoziierten Proteinen (JENUWEIN & ALLIS 2001, PENNISI 2001). Zusammen mit weiteren Chromatin-bindenden Proteinen, zum Beispiel den Polycomb- oder den Thriotorax-Proteinen, trägt die Chromatinstruktur zum zellulären Gedächtnis in Pflanzen bei (KÖHLER & GROSSNIKLAS 2002). Während in Tieren die Chromatinstruktur früh in der Entwicklung fest gelegt wird, findet in Pflanzen eine ständige Änderung der Chromatinstruktur durch Regulatoren statt (WAGNER 2003).

Die Chromatinstruktur ist für die Identität der Pflanzenzellen, also welchem Gewebetyp sie angehören, weniger wichtig als bei tierischen Zellen (GOODRICH & TWEEDIE 2002). Während bei Pflanzen Nachbarzellen und ihre Position innerhalb des Gewebes ihre Identität bestimmen, wird bei Tieren die Identität der Zellen über Zelllinien, also über die Abstammung, bestimmt. Innerhalb der Zelllinien wird die Chromatinstruktur weitergegeben (WEIGEL & JÜRGENS 2002).

Dass die Chromatinstruktur in Pflanzenzellen weniger „fest“ gefügt ist, zeigt sich auch daran, dass alle Pflanzenzellen totipotent sind. Aus jeder einzelnen Pflanzenzelle kann nach Zellkultur eine ganze Pflanze regeneriert werden kann (BRAUN 1959, LOIDL 2004). Auch wenn manche Pflanzen eine starke Zelldetermination aufweisen, wurde noch keine Ausnahme für die Totipotenz der Pflanzenzellen gefunden (WEIGEL & JÜRGENS 2002).

⁵ In eukaryotische Zellen ist die DNA mit Proteinen 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.

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). Deshalb ist die Rolle des Chromatins noch nicht abschließend geklärt.

Methylierung und Imprinting in Pflanzen

In Pflanzen werden CpG-Sequenzen⁶ aber auch CpXpG-Sequenzen methyliert. CpG-Inseln sind häufig mit Genen assoziiert. Am häufigsten sind sie in den Promotorsequenzen zu finden (JONES & TAKAI 2001). Durch die Methylierung wird die Chromatinstruktur verändert (MATZKE & MATZKE 1998). Diese Methylierung ist entscheidend bei 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 dieses Methylierungsmuster des Genoms in der frühen Embryogenese reprogrammiert wird, ist die Methylierung bei Pflanzen flexibler (ALLEMAN & DOCTOR 2000). Bei Angiospermen findet das *Imprinting* in der Entwicklung des Endosperms statt, das beide elterlichen Genome benötigt, um sich normal entwickeln zu können (LIN 1984). Bei Getreidepflanzen wie zum Beispiel Mais wird die Form der Samen durch das mütterliche *Imprinting* bestimmt. Es gibt allerdings auch Pflanzengene, bei denen *Imprinting* im Embryo wie auch im Endosperm stattfindet (VIELLE-CALZADA et al. 1999). In Pflanzen gibt es teilweise *Imprinting*, das nur einzelne Gene betrifft (ALLEMAN & DOCTOR 2000).

Gene Silencing

Gene Silencing kann durch verschiedene Mechanismen erfolgen: durch Umstrukturierung des Chromatins und durch Hemmung der Transkription (transkriptionelles *Gene Silencing*) oder durch RNA-Interferenz in post-transkriptionellen Prozessen. *Gene Silencing* kann durch homologe aber auch inverse Sequenzen oder durch eine starke Expression des Gens hervorgerufen werden (BIRD & WOLFFE 1999; IYER LAKSHMINARAYAN et al. 2000; MATZKE & MATZKE 1995 und 1998; WOLFFE & MATZKE 1999). *Gene Silencing* wurde zuerst im Zusammenhang mit der Abwehr von Pathogenen, besonders Viren, untersucht (AL-KAFF et al. 1998, RATCLIFF et al. 1997, VANCE & VAUCHERET 2001).

Unter *Gene Silencing* fällt auch das Phänomen der Paramutation. Bei der Paramutation beeinflusst ein Allel ein anderes sensitives und schwächt dessen Aktivität (BRINK 1973). Dabei treten Veränderungen des Chromatins auf (HOLLICK et al. 1997).

⁶ DNA-Sequenzen, die einen höheren Anteil der Nukleotide Cytosin und Guanin aufweisen als andere Regionen im Genom; "p" steht für Phosphodiesterbindung; methyliert wird das Cytosin.

Post-transkriptionelle Regulation

Eingeständige Funktionen von RNA ist schon länger im Bereich des alternativen *Splicing* bekannt. Das Ausmaß, in dem RNA auch regulatorisch wirksam wird, etwa in Form von MicroRNA oder RNA-Interferenz wurde erst in den letzten Jahren entdeckt. Diese Funktionen der RNA sind noch nicht vollständig erforscht.

Nicht kodierende kleine endogene RNA mit einer Länge von 21 bis 24 Nukleotiden hat sich in letzter Zeit als wichtiger Regulator der Genexpression erwiesen. Der große Einfluss der verschiedenen Formen der RNA ist noch lange nicht aufgeklärt. In Pflanzen können zumindest drei Kategorien der kleinen endogenen RNA unterschieden werden (MALLORY & VAUCHERET 2004; PICKFORD & COGONI 2003; TIJSTERMANN et al. 2002):

Short Interfering RNA (siRNA) stammt aus Viren oder von Transgenen und vermittelt einen RNA-Abbau, kann aber auch auf die Chromatinstruktur einwirken.

MicroRNA (miRNA) stammen aus Genomabschnitten, die zwischen Genen liegen; miRNA wirken regulatorisch auf Gene, indem mRNA gespalten oder die Translation unterdrückt wird. Die Störung von miRNA-Kreisläufen führte zu erheblichen phänotypischen Veränderungen. miRNA treten anscheinend zeitlich und räumlich sehr spezifisch auf (MALLORY & VAUCHERET 2004). miRNA scheinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung zu spielen (PALATNIK et al. 2003; RHOADES et al. 2002).

Andere kleine RNA scheinen eine Reihe weiterer Funktionen zu erfüllen, zum Beispiel auch im alternativen Schneiden (*Splicing*) der mRNA. Dabei entsteht aus einer m-RNA funktionell unterschiedliche Proteine.

Hierbei zeigt sich, dass eine Trennung zwischen transkriptionellen und post-transkriptionellen Effekten bisweilen unscharf sein kann. RNA kann nämlich auch auf Methylierung der DNA und die Chromatinstruktur Einfluss nehmen (STEVENSON & JARVIS 2003). Dies wurde zuerst an Viroiden aufgedeckt. Dabei wurden Zielsequenzen von 30 Nukleotiden Länge fest gestellt. KANNO et al. (2004) identifizierten in einer *Arabidopsis*-Mutante ein spezifisches durch RNA dirigiertes Chromatin-veränderndes Protein (DRD1). YAO et al. (2003) beschreiben an Tetrahymena sogar, dass RNA im Genom Umstrukturierungen und Deletionen verursachen kann. Dazu injizierten sie doppelsträngige RNA.

Keimzellen – Pflanzen können Erfahrungen weiter geben

Ein wichtiger Unterschied zwischen Tier und Pflanze besteht in der Anlage und der Entwicklung der Keimzellen: Bei Tieren werden die Keimzellen in der frühen Embryogenese gebildet. Pflanzen hingegen besitzen kein Keimzellenmeristem. Die Keimzellen werden immer wieder aus einer Gruppe undifferenzierter Zellen abgeteilt (WEIGEL & JÜRGENS 2002). Dies bedeutet, dass die pflanzliche Keimzelle die Erfahrung des bisherigen Wachstums über epigenetische Effekte oder Mutationen mitnehmen kann. Diese späte Differenzierung zwischen somatischen und Keimbahnzellen ermöglicht es den Pflanzen im besonderen

Maße, erworbene Eigenschaften weiterzugeben (REYES et al. 2002).

Transgene Pflanzen

Transgene Pflanzen bieten die Möglichkeit, die skizzierte Komplexität der Genregulation näher zu untersuchen und das Wissen darüber zu erweitern.

Bei der gentechnischen Veränderung von pflanzlichen Genomen kann es allerdings zu einer Reihe von unbeabsichtigten Veränderungen auf genetischer, als auch auf epigenetischer Ebene kommen. Aufgrund der Multifunktionalität von Genabschnitten kann es darüber hinaus zu unbeabsichtigte Effekte zusammen (siehe unter „Pleiotrope Effekte“). Dies kann sich auch auf physiologischer oder morphologischer Ebene manifestieren.

Generell gilt, dass unbeabsichtigte Veränderungen, die bei der Erzeugung transgener Pflanzen auftreten, in der Literatur nur unzureichend dargestellt sind. Die Fragestellungen der publizierten Untersuchungen sind meistens sehr eng gesteckt und lassen keine Analysen der unbeabsichtigten Veränderungen zu. Bisweilen werden Veränderungen auch erwähnt, aber nicht weiter analysiert. Zudem werden Pflanzen mit den unerwünschten Effekten oder schlechten Leistungen im Labor oft aussortiert.

Im folgenden werden Ergebnisse unterteilt in Effekte, die sich auf genetischer Ebene oder epigenetischer Ebene manifestieren. Als drittes werden unerwartete Effekte, deren Ursache nicht ganz klar ist, und als „pleiotrope Effekte“ unvorhergesehene Ausprägungen mehrerer Merkmale ausgehend von einem Gen darstellt. Dabei handelt es sich aber nicht um drei getrennte Phänomene, sondern interagieren in einem komplexen Netzwerk der Genomregulation.

Effekte auf genetischer Ebene

Effekte auf genetischer Ebene werden bei gentechnischer Veränderung durch die Methode selbst ausgelöst. Aber auch die nachfolgende Zellkultur stellt einen „genomischen Schock“ dar, der Veränderungen auf genetischer Ebene nach sich ziehen kann. Deshalb wird versucht, den Schritt der Zellkultur zu vermeiden oder zu limitieren. Genetische Effekte können möglicherweise auch noch zu einem späteren Zeitpunkt durch besondere Elemente, wie zum Beispiel palindromische⁷ Sequenzen, ausgelöst werden.

Insertion des Genkonstrukts und Nebeneffekte

Der molekulare Mechanismus der gentechnischen Veränderung, sowohl bei der *Agrobacterium*-Methode als auch beim *Particle Bombardment*, entspricht dem der illegitimen Rekombination und nachfolgenden Reparatursmechanismen für gebrochene DNA-

⁷ Unter Palindrom wird eine DNA-Sequenz verstanden, die auf beiden Strängen die gleiche Sequenz ergibt, in 5' -> 3' Richtung gelesen.

Doppelstränge. Deshalb ist die Insertion nicht sequenzspezifisch. An den Insertionsstellen können kurze, ein bis acht Basenpaare lange Sequenzhomologien fest gestellt werden (MAYERHOFER et al. 1991; SOMERS & MAKAREVITCH 2004). Bei der *Agrobacterium*-Methode wird häufiger eine komplette T-DNA integriert, als bei der Methode des *Particle Bombardment* (DE BLOCK 1993). Das Verbinden der Strangenden bei der illegitimen Rekombination tritt selten ohne Änderungen in der Sequenz am Integrationsort sowie Deletionen auf (GHEYSEN et al. 1991; GORBUNOVA & LEVY 1997). Die Deletionen sind relativ klein (13 bis 28 bp, GHEYSEN et al. 1991; bzw. 29 bis 73 bp MAYERHOFER et al. 1991).

MAYERHOFER et al. (1991) unterscheiden zwischen einer *Precise Junction*, also einer präzisen oder perfekten Verbindung, und einer *Imprecise Junction*, bei der eine sogenannte *Filler DNA* (Füll-DNA) auftritt. Solche *Filler 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 *Filler 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 *Filler DNA* von entfernten Stellen im Pflanzengenom. MÜLLER et al. (1999) fanden *Filler DNA* mit unbekannter Herkunft.

GORBUNOVA & LEVY (1997) ordnen solche Ergebnisse in eine evolutionäre Strategie von Pflanzen und deren plastischem Genom ein. Fehlerhafte Reparaturen des DNA-Doppelstranges tragen mit dazu bei, dass Gene sich verdoppeln oder dass die Menge an repetitiver DNA erhöht wird.

Abgesehen von diesen als Methoden-inhärenten Nebeneffekten anerkannten „kleineren“ Deletionen und Insertionen, werden in der Literatur bei verschiedenen Nutzpflanzen von Insertionen von Fragmenten des Genkonstrukts, heftigen Umordnungen, inversen (Wiederholungs-)Sequenzen, Deletionen und insgesamt der Bildung sogenannter „komplexer transgener Loci“ berichtet:

Bei ***Arabidopsis thaliana*** u.a. : CASTLE et al. (1993); KATAVIC et al. (1994); bei **Gerste** u.a. : HORVATH et al. (2001); TINGAY et al. (1997); bei **Hafer** u.a. : PAWLOWSKI et al. (1998); PAWLOWSKI & SOMERS (1998); SVITASHEV et al. 2002; bei **Kartoffel** u.a. : WOLTERS & VISSERS (2000); bei **Petunien** u.a. : DEROLES et al. (1988); bei **Soja** u.a. : SRINIVASA et al. (2003); WINDELS et al. (2001); bei **Reis** u.a. : DATTA et al. (2003); FU et al. 2000; IIDA & TEREDA (2004); KOHLI et al. (1999); TAKANO et al. (1997); bei **Tabak** u.a. : TOMES et al. (1990) ; OHBA et al. (1995); GORBUNOVA & LEVY (1997); IGLESIAS et al. (1997); MÜLLER et al. (1999); ULKER et al. (1999); bei **Weizen** u.a. : UZÉ et al. (1999); ABRANCHES et al. (2000).

Leider gehen diese Untersuchungen selten über die genetischen Untersuchungen hinaus. Auswirkungen, zum Beispiel Auswirkungen auf die Bildung sekundärer Inhaltstoffe oder auf die Fitness werden in der Regel nicht untersucht. Ungewollte Auswirkungen werden eher noch auf epigenetischer Ebene untersucht (siehe unter „Epigenetische Effekte“).

Somaklonale Variation

Somaklonale Variation beschreibt genetische oder phänotypische Variationen bei vegetativ klonierten Pflanzen. Somaklonale Variationen können somatisch oder meiotisch stabil sein, aber auch von Klon zu Klon und innerhalb der Wachstumsphase variieren (KAEPLER et al. 2000). Sie hängen u.a. von der Sorte ab (HORVATH et al. 2001).

Somaklonale Variationen, die nach Zellkultur auftreten, werden Zellkultur-induziert genannt. Unerwünschte genetische Effekte der gentechnischen Transformation können nicht von somaklonaler Variation unterschieden werden. Der Insertionsprozess kann auch somaklonale Variationen verstärken (VEILLEUX & JOHNSONS 1998). Nach einer Übersicht zu somaklonalen Variationen in transgenen Pflanzen treten folgende Ereignisse auf (VEILLEUX & JOHNSONS 1998):

- Chromosomale Abweichungen, zum Beispiel Änderungen der Chromosomenanzahl oder -struktur, Änderungen im Polyploidie-Level, 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.

Aus den Zusammenfassungen der Anträge der zur Vermarktung angemeldeten transgenen Pflanzen⁸ geht hervor, dass zumindest die von der Firma „Stoneville Pedigreed Seed Company“ angemeldete BROMBXNNIL-tolerante Baumwolle und der gentechnisch veränderte Bt11-Mais von Syngenta nach Zellkultur regeneriert wurden. Im Auftrag der belgischen Zulassungsbehörde wurde der Bt11-Mais im Juni 2003 erneut analysiert. Dabei wurden Umordnungen innerhalb des Genkonstruktes festgestellt und als Sicherheitsrisiko angemahnt (DE SCHRIJVER & MOENS 2003).

Elemente, die Rekombinationen verstärken können

Manche Elemente des Genkonstruktes können Rekombinationen und möglicherweise Umordnungen und andere Veränderungen auf genetischer Ebene verstärken. Auch hier gilt, dass solche Hinweise nur vereinzelt untersucht wurden.

Nach MÜLLER et al. (1999) besitzen Palindrome ein hohes Rekombinationspotential. MÜLLER et al. (1999) untersuchten dies an transgenen Tabakpflanzen und fanden, dass ein Viertel der Rekombinationen bei oder mithilfe von synthetischen Palindromen, die gentechnisch eingebracht worden waren, stattgefunden hatten. MIYAO et al. (2003) wiesen bei einem sehr

⁸ http://gmoinfo.jrc.it/gmc_browse.asp.

aktiven Retrotransposon in Reis ebenfalls eine palindromische Consensussequenz nach.

MÜLLER et al. (1999) vermuten als Ursache, dass Palindrome sekundäre DNA-Strukturen ausbilden. An solchen Loops, die bei verschiedenen Palindromen gefunden worden sind, finden bevorzugt illegitime Rekombinationen statt. Im Einklang mit den Ergebnissen von MÜLLER et al. (1999) fanden auch KOHLI et al. (1999) in transgenen Reislinien, dass besonders häufig ein Palindrom von 19 Basenpaaren, inklusive der TATA Box des 35S Promotors des Cauliflowers Mosaic Virus, an Rekombinationen beteiligt war. MÜLLER et al. (1999) wie auch KOHLI et al. (1999) sprechen dabei von rekombinatorischen *Hotspots*.

Hierbei sollte dringend geklärt werden, ob solche *Hotspots* auch noch in nachfolgenden Generationen Rekombinationen verstärken können.

Backbone-Sequenzen der T-DNA, also das Rückgrat des Plasmids, das außerhalb der T-DNA Borders liegt und nicht mit integriert werden sollte, gelangen besonders bei der Methode durch *Particle Bombardement* oft fehlerhaft mit in das Genom. Aber auch bei der *Agrobacterium*-Methode kann die *Backbone*-Sequenz in das pflanzliche Genom integriert werden. Bei Untersuchungen von KONONOV et al. (1997) enthielten bei transgenem Tabak 75 % der Pflanzen das Antibiotikaresistenzgen aus dem *Backbone* des Plasmids. In 20 % der Pflanzen wurde das Antibiotikaresistenzgen erfolgreich exprimiert. WENCK et al. (1997) erhielt ähnliche Ergebnisse bei *Nicotiana glaberrima* und bei *Arabidopsis thaliana*, die lange Sequenzen außerhalb der T-DNA enthielten.

Die *Backbone*-Sequenzen scheinen unerwünschte Effekte in *cis*⁹ und oft Umordnungen hervorzurufen. Zudem scheinen sie für die unerwünschte Bildung von stabilen sekundären Strukturen der DNA verantwortlich zu sein (FU et al. 2000; LOC et al. 2002). *Backbone*-Teile können darüber hinaus in Form von *Filler DNA* integriert werden (GORBUNOVA & LEVY 1997).

Bedeutung für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen

Die Unwägbarkeiten des gentechnischen Eingriffes sind auf genetischer Ebene sehr groß. Vorrangig sollten die große Wissenslücken geschlossen werden.

Die Ergebnisse zu Effekten auf genetischer Ebene sollte aber auch in den laufenden Risikobewertungen von transgenen Pflanzen Rechnung getragen werden. Dafür sollte die genaue Methode, mit der die Nutzpflanze gentechnisch verändert wurde, auf die möglichen genetischen Veränderungen hin diskutiert werden. Besonders wichtig ist eine genaue Insertionsbestimmung, sowie die Bestimmung der Anzahl der inserierten Konstrukte bzw. von Fragmenten. Sobald ein komplexes Insertionsmuster¹⁰ auftritt, sollten sorgfältige Untersuchungen in verschiedenen Klimabedingungen und über mehrere Generationen

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.

¹⁰ Darunter kann auch schon ein *tail-to-tail* Arrangement wie in der transgenen Baumwolle 531 oder das Vorhandensein verschiedenerer Fragmente wie im transgenen Mais 1507 gezählt werden.

nachgewiesen werden. Für die Risikobewertung sollten sehr genaue Untersuchungen zum möglichen Verbleib von Sequenzen aus dem *Backbone* des Plasmids durchgeführt werden.

Zum Rekombinationspotential von bestimmten Elemente besteht Forschungsbedarf. Diese sollten auf ihre Wirkung in verschiedenen Nutzpflanzen und in nachfolgenden Generationen untersucht werden. Daraus könnten durchaus Empfehlungen resultieren, dass alternative Promotoren eingesetzt oder bestimmte Sequenzen vermieden werden sollten.

Im Antrag zur Vermarktung von transgenen Pflanzen sollte deshalb geklärt werden, ob und wie lange eine Phase der Zellkultur durchlaufen wurde. Wurde eine Phase der Zellkultur durchlaufen, sollte wegen somaklonaler Variationen das ganze Genom auf mögliche Deletionen, Umordnungen, etc. hin untersucht werden.¹¹

Epigenetische Effekte bei transgenen Pflanzen

Bei epigenetischen Effekten in transgenen Pflanzen wurde bisher hauptsächlich transkriptionelles und post-transkriptionelles *Gene Silencing* untersucht, weil *Gene Silencing* das größte Hindernis für eine stabile Transgenexpression darstellt. *Silencing* lässt sich darüber messen, ob und wie die gewünschte Eigenschaft ausgeprägt ist. Im Labor sind die untersuchten Eigenschaften meistens einfach nachweisbar, wie Antibiotika- oder Herbizidresistenz oder eine Farbreaktion.

Silencing des Transgens in gentechnisch veränderten Pflanzen wurde mit der Verteidigung des Pflanzengenoms gegen Viren verglichen (FINNEGAN 2002). Epigenetische Veränderungen gehen aber noch über eine solche Verteidigung hinaus. Mit epigenetischen Veränderungen besitzt die Pflanze darüber hinaus einen einfachen und reversiblen Mechanismus, um auf wechselnde Umweltbedingungen zu reagieren. An epigenetischen Veränderung konnte der Einfluss von äußeren Faktoren und Umweltstress gezeigt werden (siehe unter „Umwelteinflüsse“).

Silencing von Transgenen

Bei transgenen Pflanzen werden sowohl transkriptionelles als auch posttranskriptionelles *Gene Silencing* beschrieben. Die Inaktivierung eines Transgens kann während der Entwicklung progressiv auftreten (OHREND et al. 1991). *Silencing* des Transgens kann auch unabhängig über mehrere Generationen hinweg auftreten (KOHLI et al. 1999; MORINO et al. 1999; OHREND et al. 1991; VAIN et al. 1999). Das *Gene Silencing* von Transgenen kann allerdings reversibel sein (MORINO et al. 1999). Post-transkriptionelles *Gene Silencing* ist meiotisch nicht stabil, das heißt, dass es nicht weiter vererbt wird (MATZKE et al. 2001).

¹¹ Hierbei sei noch mal daran erinnert, dass erst Untersuchungen der belgischen Kontrollbehörde Umordnungen im Genom des Bt11-Mais, der nach Zellkultur regeneriert worden war, zu Tage gebracht hat. Genaue Analysen der Antragsteller sind demnach keine obsolete Forderung.

FAGARD & VAUCHERET (2000) stellen dar, dass transgene Pflanzen, die *Silencing* durchlaufen, Sequenz-spezifische *Silencing*-Signale produzieren, die in der Lage sind, sich von Zelle zu Zelle auszubreiten. Das heißt, dass *Silencing* auch systemisch wirken kann. Dieser Mechanismus entspricht der systemischen Antwort nach einer Virusinfektion. Das Signal besteht möglicherweise in einem Produkt des Transgens, zum Beispiel aberranter RNA. Dass es einen spezifischen transgenen Mechanismus gibt, schließen FAGARD & VAUCHERET (2000) als Möglichkeit nicht aus.

Andererseits stellten KAEPLER et al (2000) sequenzielles *Silencing* fest. Transgene Hygromycin- bzw. Kanamycin-resistente Pflanzen, die aus einer Pflanze regeneriert worden waren, zeigten besonders in den Blättern Mosaikmuster bei der Resistenz (und damit der Transgenexpression). Auch bei konventionellem Mais konnte gewebsspezifische Methylierung fest gestellt werden (FEDEROFF & BANKS 1988). Zudem variiert die Methylierung je nach Alter der Maispflanze (MARTIENSEN et al. 1990).

Bei **transkriptionellem Gene Silencing** liefern Interaktionen zwischen homologen Sequenzen ein Signal, welches die Methylierung der entsprechenden Sequenzen auslöst. GENDREL et al. (2002) zeigten, dass ein still gelegtes Gen in *Arabidopsis* mit einer Methylierung der spezifischen Histone verbunden ist. Generell beeinflusst DNA-Methylierung und auch die Histon-Methylierung.

Transkriptionelles *Gene Silencing* kann bei transgenen Pflanzen in zwei verschiedene Typen eingeteilt werden: Die Inaktivierung erfolgt in *cis* oder in *trans*. Zur Inaktivierung in *cis* kommt es, wenn mehrere, neu angeordnete Kopien eines Transgens an einem Genort liegen oder wenn mehrere Kopien sehr dicht zusammen liegen. Es erfolgt eine Paarung von inversen Sequenz-Wiederholungen (*Inverted Repeats*), die dann zu Methylierungen an den Cytosinresten in der Promotorsequenz führen.

In *trans* können die methylierten inversen Sequenz-Wiederholungen, die an entfernten Stellen im Genom liegen, vermutlich über DNA-DNA Paarung das *Silencing* bzw. die Methylierung von homologen Sequenzen auslösen (WOLFFE & MATZKE 1999). Das Signal zur Stilllegung des Gens kann aber auch über Paarung der DNA mit anormaler homologer RNA erfolgen (MATZKE & MATZKE 1995).

Ein weiteres Beispiel für transkriptionelles *Gene Silencing* ist die Paramutation des Transgens in Petunien. Das Transgen wurde methyliert, die umliegende DNA jedoch nicht (MEYER et al. 1992).

Die Inaktivierung von transgenen Konstrukten hängt stark von der Anzahl der Kopien und der Komplexität des Transgenlocus ab (ELOMAA et al. 1995; JAKOWITSCH et al. 1999; PAWLOWSKI et al. 1998; VAUCHERET et al. 1998). CHARRIER et al. (2000) genühten zwei Transgene an verschiedenen Orten im Genom, um *Gene Silencing* auszulösen. Das *Silencing* wird dabei durch die Sequenzhomologien ausgelöst, unabhängig davon, wie hoch die Expression war. Das *Silencing* konnte auch nicht durch Einfügen eines Introns innerhalb der codierenden Sequenz oder durch Verwendung eines anderen Promoters oder Terminators ausgeschlossen werden (CHARRIER et al. 2000).

Ein weiterer Einflussfaktor ist der Methylierungsstatus im 35S Promotorbereich, was wiederum von dem GC-Gehalt des Konstrukts abhängig ist (ELOMAA et al. 1995; MEYER et al. 1992; PRÖLS & MEYER 1992).

Post-transkriptionelles Gene Silencing wird durch doppelsträngige (ds)RNA als wichtigstes Zwischenprodukt bzw. als Substrat ausgelöst, zum Beispiel durch RNA ohne Poly-AAA Schwanz oder mit zu kurzem Polyadenylierungssignal. Die Herkunft dieser RNA ist noch nicht vollkommen verstanden. Entweder geht sie aus der Transkription an umgekehrten Sequenz-Wiederholungen von DNA, gleichzeitiger Synthese von *sense* und *anti-sense* RNA oder durch die Aktivität zellulärer oder viraler RNA-abhängigen RNA Polymerasen, die Einzelstrang-RNA als *Template* verwenden, hervor. Alternativ dazu können auch große Mengen an Transkripten ab einem bestimmten Schwellenwert, das *Silencing* auslösen (IYER LAKSHMINARAYAN et al. 2000). 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).

Post-trankriptionelles *Gene Silencing* wurde an transgenen Pflanzen bisher wenig aufgedeckt, unter anderem wegen der komplexen Wirkmechanismen.

Kosuppression zählt zum post-transkriptionellem *Gene Silencing*, da es auf RNA-Interferenz zurückgeführt werden kann (STEVENSON & JARVIS 2003). Kosuppression bezieht sich auf eine Hemmung von Genen, die aber an verschiedenen Orten im Genom liegen. Entdeckt wurde dieser Mechanismus an transgenen Petunien (NAPOLI et al. 1990).

DI SERIO et al. (2001) beschreiben *Silencing* in transgenem Tabak, das *anti-sense* vermittelt auftrat, und bei dem kleine RNA-Stücke sowie dsRNA beteiligt war.

MITSUHARA et al. (2002) zeigte an transgenem Tabak über fünf Generationen hinweg, dass das post-transkriptionelle *Gene Silencing* immer wieder von der nächsten Generation in einer bestimmten Rate unabhängig erworben wird. In der Art des Auftretens, vermuten MITSUHARA et al. (2002) zudem ein systemisches Signal, wodurch sich das *Silencing* in der ganzen Pflanze ausbreitet.

ELMAYAN & VAUCHERET (1996) beschreiben Stilllegung von Transgenen in elf verschiedenen Tabaktransformationen. Die verschiedenen Transformationsereignisse zeigten *Gene Silencing* in allen untersuchten Generationen. Allerdings trat das *Silencing* zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf, mal früher und mal später innerhalb der Entwicklung. ELMAYAN & VAUCHERET (1996) vermuten post-transkriptionelles *Silencing*, das durch hohe Dosen von mRNA ausgelöst wird. Die hohen Dosen sind auf den 35 S Promoter zurückzuführen.

Positionseffekte

Nach MAYERHOFER et al. (1991) sind die Insertionen zufällig über das ganze pflanzliche Genom verteilt. Analysen bei Retroviren aber auch bei Transgenen zeigten allerdings, dass

die Integration besonders von der Chromatinstruktur, aber auch von den DNA-Sequenzen und der entsprechenden räumlichen Strukturen abhängen kann (PRYCIAK & VARMUS 1992; MÜLLER & VARMUS 1994). Besonders AT-reiche Regionen scheinen die Wahrscheinlichkeit der Integration von Transgenen zu erhöhen, vermutlich weil ein hoher Adenosinanteil in der DNA eine Krümmung verursacht (MATZKE & MATZKE 1998; MÜLLER et al. 1999).

Die Funktion und Regulation eines Gens ist u.a. abhängig von seiner Position im Genom. Was bei Transgenen, die an verschiedenen Orten im Genom vorhanden sind, deutlich wird, ist ihre unterschiedliche Stabilität in der Genexpression. Die Forschung fokussiert hauptsächlich auf die Stabilität der Transgenexpression. Andere Aspekte der Positionseffekte werden wenig untersucht.

Die umgebende DNA bestimmt über die Stabilität der Transgenexpression (MEYER 1993). Transgene sind stabiler, wenn sie 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 generell als genreiche Regionen gelten (MATZKE & MATZKE 1998). Deshalb sind Transgene generell unstabiler, wenn sie in der Nähe des Centromers liegen (MATZKE & MATZKE 1998). Dies kann teilweise auf eine Methylierung der transgenen Sequenz zurückgeführt werden. Genkopien zeigten sich in unterschiedlichem Grade methyliert, je nach dem, an welcher Stelle im Genom sie inseriert waren (Positionsabhängige Determination der Methylierung) (MEYER et al. 1993).

Wenn die Region generell sehr AT-reich ist und das Transgen in seiner Nukleotidzusammensetzung davon abweicht, kann dies Methylierung auslösen (MATZKE & MATZKE 1998).

DORLHAC DE BORNE et al. (1994) beschreiben Kosuppression in transgenem Tabak, unabhängig von der Anzahl der eingebrachten Kopien und vermuten deshalb den Grund im Insertionsort. Die Kosuppression trat jeweils nach einer gewissen Zeit auf, was darauf hindeutet, dass es Entwicklungsreguliert ist. Die Rate der Kosuppression war bei zwei Feldversuchen in unterschiedlichen Regionen Frankreichs gleich hoch.

Bedeutung für die Risikobewertung transgener Pflanzen

Generell besteht bei den epigenetischen Effekten in transgenen Pflanzen großer Forschungsbedarf. Bisher konzentriert sich die Forschung auf das *Silencing* des Transgens. Vielmehr muss aber geklärt werden, welchen Anteil epigenetische Effekte in den weiter unten beschriebenen pleiotropen Effekte haben, inwiefern die epigenetischen Effekte die Expression weiterer Genomabschnitte beeinflusst und unter welchen Umweltbedingungen epigenetische Effekte neu auftreten können.

Eine hohe Stabilität der gentechnisch eingebrachten Eigenschaft ist Bedingung für eine Vermarktung transgener Pflanzen. *Gene Silencing* sind bei insektenresistenten Pflanzen im Resistenzmanagement besonders zu berücksichtigen. Eine zunehmende Stilllegung des Bt-Gens, und sei dies auch gewebsspezifisch, würde eine erhebliche Lücke im

Resistenzmanagement darstellen.

Pleiotrope Effekte

Unter pleiotropen Effekten wird recht pauschal „eine oftmals unvorhergesehene Ausprägung mehrerer Merkmale ausgehend von einem Gen“ verstanden (LIPS 1998). Der Begriff „pleiotrope Effekte“ wird deshalb als Beschreibung für die unterschiedlichsten Prozesse in transgenen Pflanzen benutzt. Im folgenden wird der Begriff der pleiotropen Effekte besonders auf Änderungen im Stoffwechsel bezogen. Dies kann auch zu morphologischen Änderungen führen.

Alternatives *Splicing*, Beeinflussung des sekundären Stoffwechsels auf der Ebene der Genexpression oder unerwartete Funktionen von Proteinen können zu Änderungen in der Zusammensetzung von Pflanzeninhaltsstoffen oder zu veränderten oder neuen Pflanzeninhaltsstoffen führen.

Beispiel: transgene herbizidresistente Sojabohne

Bei der transgenen herbizidresistenten Sojabohne gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die einerseits genetische Umordnungen und veränderte Inhaltsstoffe fanden, andererseits ein verändertes Stressverhalten beobachteten.

Eine belgische Arbeitsgruppe stellte 2001 fest, dass es bei der Integration der Fremd-DNA in das Genom der Sojabohne an einer Flankenregion zu mehreren Umordnungen in der Sequenz gekommen war und dass vermutlich die pflanzliche DNA an der Integrationsstelle ebenfalls umgeordnet wurde. Zusätzlich wurde eine 254 Basenpaare lange, verkürzte Version des Herbizidresistenzgens gefunden. Im Anschluss daran wurde ein DNA-Segment mit einer Länge von 534 Basenpaare entdeckt, ohne Sequenzhomologien zu Soja oder einer anderen pflanzlichen DNA. WINDELS et al. (2001) vermuteten, dass es sich hierbei entweder um Vektor-DNA oder sonstige fremde DNA handelte.

GERTZ et al. (1999) untersuchten sechs verschiedene transgene herbizidresistente Sojalinien bei unterschiedlicher Temperatur. Insgesamt zeigten sich die Roundup Ready resistenten Sojapflanzen als hitzempfindlicher als konventionelle Sorten. Sie waren zudem kleiner und wiesen einen geringeren Chlorophyll-Gehalt und ein geringeres Frischgewicht auf. Zudem waren die Pflanzen verzweigter. Bei normaler Temperatur wiesen die Roundup Ready resistenten Sojapflanzen einen um 13 % erhöhten Ligningehalt auf. Für GERTZ et al. (1999) ist der Shikimatsäure-Stoffwechselweg durch das Roundup Ready Resistenzgen gestört. VENCILL (1999) führte diese Untersuchungen zusätzlich mit Wassermangel durch. Wie auch bei Hitzestress wiesen transgene herbizidresistente Sojapflanzen der Linien H5164 und H5566 ein reduziertes Frischgewicht auf, nämlich ein um 48 % reduziertes Frischgewicht im Vergleich zu 24% bei der nicht-transgenen Sorte (VENCILL 1999). VENCILL (1999) hält aufgrund der Ergebnisse einige transgene herbizidresistente Sojalinien allgemein für empfindlicher gegenüber Umweltstress.

Weiterhin konnte bei den transgenen Sojapflanzen ein veränderter Hormonhaushalt, der Phytoestrogene, festgestellt werden, wobei der Gehalt verschiedener Pflanzenhormone bis zu 14 % verringert war (LAPPE et al. 1999).

Ein weiteres Beispiel, das Hinweise auf eine veränderte Zusammensetzung von Inhaltsstoffen liefert, sind Untersuchungen zur Lebensmittelsicherheit von transgenen herbizidresistenten Sojabohnen. MALATESTA et al. (2002) fanden in Leberzellen mit transgenem Soja gefütterter Mäuse unregelmäßig geformte Zellkerne und eine höhere Anzahl von Zellkernporen, was beides auf eine höhere Metabolismusrate und einen verstärkten Molekültransport schließen lässt. Dieses Beispiel wirft zudem ein Licht auf die Komplexität der pflanzlichen Inhaltsstoffe in Zusammenhang mit der Lebensmittelsicherheit von transgenen Pflanzen.

Diese Ergebnisse zur transgenen herbizidresistenten Sojabohne wurden allerdings an unterschiedlichen transgenen Soja-Linien erzielt. LAPPE et al. (1999) erwähnten jedoch nicht, welche Linien verwendet wurden. Forschung, die diesen Phänomenen nachgeht ist dringend erforderlich.

Beispiel „Golden Rice“

Bei dem sogenannten “Goldenen Reis” wurde über das Einbringen zweier Gene aus *Narcissus pseudonarcissus* (Phytoen Synthase und eine Lycopene β -Cyclase) und einem bakteriellen Gen (Phytoen Desaturase) ein Biosyntheseweg zur Herstellung von Provitamin A im Endosperm von Reis etabliert. Die Expression unterliegt der Kontrolle durch einen endospermspezifischen Promotor und einen bakteriellen Promotor (BEYER et al. 2002). Samen der transformierten Linien wiesen meistens eine gelbe Farbe auf, was auf Carotinoidsynthese hinweist. Entgegen den Erwartungen waren die Reiskörner allerdings gelb und nicht rot gefärbt.

Überraschenderweise erwies sich die eingeschleuste Lycopene β -Cyclase für die Pro-Vitamin A Synthese als nicht notwendig. Unklar ist, welche Enzyme der Pflanze die Synthese alternativ vollziehen (BEYER et al. 2002). Dieses Ergebnis demonstriert, wie komplex der Sekundärstoffwechsel ist und zu welchen unerwarteten und unkontrollierbaren Interaktionen es zwischen den Enzymen kommen kann.

Bei Untersuchungen zu Alternativen zu Antibiotikaresistenzmarkergenen im *Golden Rice* zeigten sich epigenetische *Silencing*-Effekte: Bei der Analyse des Carotinoid und Xanthophyll-Gehalts in Endosperm und Samen zeigte sich, dass in einigen Linien Carotinoide nicht nachweisbar waren, obwohl alle Linien die dazu nötigen Gene integriert hatten. Zudem variierte in unterschiedlichen Linien die Menge an β -Carotin erheblich (DATTA et al. 2003). Darüber hinaus zeigte ein Teil der Pflanzen eine veränderte Morphologie und sogar Ökologie: 10 % der Pflanzen wiesen im Vergleich zu den Kontrollpflanzen einen abweichenden Phänotyp auf. Sie waren von kleiner Statur, dunkel und immergrün. Zudem blühten sie später. Einige der transgenen Pflanzen produzierten wesentlich weniger Samen. Dieser abweichende Phänotyp vererbte sich stabil. DATTA et al. (2003) vermuteten, dass der Zwergenwuchs auf einem Gibberelin-Mangel beruht, da die Biosynthese von Carotinoiden

und Gibberelin einen gemeinsamen Vorläufer besitzt.

Beispiel transgene virusresistente Kartoffel

Die Kartoffelsorten Bintje und Escort wurden mit einem Gen für die Virushüllprotein-Bildung transformiert. Man untersuchte die PVX (Potato Virus X)-resistenten Sorten auf ihre Ähnlichkeit mit den jeweiligen Ausgangssorten. Lediglich 18 % der Bintje-Pflanzen und 82 % der Escort-Pflanzen behielten die Charakteristika bei, die in den entsprechenden Sortenlisten erfasst sind (VAN DEN ELZEN et al. 1993). Die genauen Ursachen der Abweichung wurde nicht geklärt, aber es zeigt, dass die Sorten verschieden transformationsstabil sind.

Umwelteinflüsse

Pflanzen benutzen epigenetische Modifikationen zur Anpassung an Stress (FINNEGAN 2002). Dies erklärt ein Stückweit ihre Toleranz gegenüber Genomamplifikationen und ihre enorme Anpassungsfähigkeit an wechselnde Umweltbedingungen. Epigenetische Veränderungen bieten dem Genom eine sehr schnelle Möglichkeit, auf Umwelteinflüsse zu reagieren. Allerdings gibt es nur sehr wenige Untersuchungen, die Interaktion von transgenen Pflanzen auf wechselnde Umweltbedingungen zum Gegenstand haben.

Bereits bei nicht-transgenen Pflanzen gibt es nur wenige Arbeiten, die Auswirkungen von einem genomischen Schock (MCCLINTOCK 1984) untersuchten. MCCLINTOCK (1984) untersuchte an Mais, wie dieser auf Schock auslösende Umwelteinflüsse, hierbei in Form von Gammastrahlung, UV-Licht oder Chemikalien, reagiert. Dabei wurden Maiskeimlinge auf die Reaktivierung transposabler Elemente hin untersucht. Auch FINNEGAN (2002) benutzte als Auslöser für Stress vor allem mutagene Agenzien und Zellkultur. MEINS & BINNS (1979) studierten an Tabakzellen, wie diese sich in den Kulturmedien an bestimmte Stoffe gewöhnen. Die Rate der Anpassung war sehr hoch, die Veränderungen aber reversibel.

In Lein lassen sich durch Umweltstress, ausgelöst durch unterschiedliche Gaben von Stickstoff, Kalium, Phosphor und Calcium, genomische Veränderungen auslösen. OH & CULLIS (2003) fanden dafür verschiedene labile DNA-Sequenzen, bei denen Amplifizierung, Deletionen und Umordnungen stattfanden. Die genomischen Veränderungen bewirkten allerdings eine phänotypische Stabilität, das heißt, dass trotz des Umweltstresses die Leinpflanzen wie Vergleichspflanzen ohne Stress wuchsen. OH & CULLIS (2003) haben bisher allerdings nicht die Charakteristika dieser labilen DNA-Sequenzen aufgeklärt. Bereits DURRANT (1962) beschrieb bei einer Leinvariante die Möglichkeit, vererbte Veränderungen durch verschiedene Behandlungen mit Düngemitteln auszulösen. Dabei entstand eine größere und eine kleinere Variante, die beide im Phänotyp stabil blieben, auch wenn die Behandlung mit Düngemittel ausgesetzt wurde. Da es sich bei Lein allerdings nicht um eine seit Jahrzehnten stark züchterisch veränderte Nutzpflanze handelt, vermutet DURRANT (1962), dass das Genom möglicherweise plastischer ist.

Bei transgenen Pflanzen finden sich nur wenige Angaben zum Effekt von Umwelteinflüssen,

die sich wiederum besonders auf die Stabilität der Transgenexpression beziehen. Dabei wurden Kulturbedingungen, Licht und Temperatur als einflussnehmend ausgemacht.

Ein bekanntes Beispiel ist der 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 lachsrot gefärbt gewesen, waren nach der Hitzewelle nur noch 37 % der Blüten stark lachsrot. Die Reduktion des lachsroten Phänotyps konnte auf eine Methylierung des 35S Promotors nach dem Hitzestress zurückgeführt werden (MEYER et al. 1992).

Zudem wurden die transgenen Petunien nach der Hitzewelle unempfindlich gegenüber Pilzbefall, hatten mehr Blätter und Triebe und waren weniger fruchtbar (MEYER et al. 1992). Die (epi-)genetische Ursache für diese Veränderungen wurden von MEYER et al. (1992) allerdings nicht untersucht.

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. Dies kann aber auch am stärkeren Lichteinfall im Sommer liegen. Schließlich konnte in transgenem Tabak gezeigt werden, dass es bei höherer Lichtintensität zu einem schnelleren *Silencing* des Transgens kommt (in LIPS 1998).

Ein anderes Beispiel weist darauf hin, dass die Anbaubedingungen eine wichtige Rolle spielen. Die Transgenexpression in Kartoffeln hing stark von der Kultivierung ab, und war bei transgenen Pflanzen, die auf Boden herangezogen wurden höher, als bei transgenen Pflanze, die in Kulturgefäßen auf Nährmedium gehalten wurden (DYMOCCK et al. 1991).

Bedeutung für die Risikobewertung transgener Pflanzen

Der Einfluss der Umwelt auf transgene Pflanzen muss umfassender untersucht werden als nur im Zusammenhang mit *Silencing* des Transgens.

Für die Risikobewertung von transgenen Pflanzen sollten angesichts der möglichen schnellen Reaktion auf Umweltbedingungen durch epigenetische Veränderungen Untersuchungen in verschiedenen Umweltbedingungen nachgewiesen werden. Dafür könnte zum Beispiel die Stabilität der Genexpression an unterschiedlichen Standorten in Europa untersucht werden.

Fazit und Forschungsbedarf

Die Forschungsergebnisse an transgenen Pflanzen zeigen vor allem, welche Einschränkungen und Unwägbarkeiten in der gentechnischen Methode stecken. Die gentechnische Veränderung ist nicht kontrollierbar: Der Ort, wo das Genkonstrukt in das pflanzliche Genom inseriert, ist nicht voraussagbar, genauso wenig wie die Anzahl der Insertionen.

Es findet auffallend wenig Forschung zu epigenetischen Änderungen und möglichen Risiken statt. Bisherige Risikoforschung zu transgenen Pflanzen konzentriert sich auf „klassische“ Risiken wie Auskreuzung. Deshalb besteht dringender Forschungsbedarf zu den Auswirkungen der gentechnischen Veränderung auf die komplexe und dynamische Genomorganisation und den möglichen Risiken.

Generell sollte die Bandbreite der methodeninhärenten Risiken umfassender aufgeklärt werden. Nicht nur die genetischen und epigenetischen Veränderungen sondern zusätzlich auch alternatives *Splicing*, Beeinflussung des sekundären Stoffwechsels auf der Ebene der Genexpression oder unerwartete Funktionen von Proteinen können zu pflanzenphysiologischen und morphologischen Veränderungen führen. Gerade aber die möglichen Änderungen in der Zusammensetzung von Pflanzeninhaltsstoffen oder die mögliche Bildung von veränderten oder neuen Pflanzeninhaltsstoffen müssen umfassend aufgeklärt werden.

Umwelteinflüsse auf transgene Pflanzen sollten umfassender untersucht werden. Dabei sollte im Vordergrund stehen, wie unterschiedlich transgene Pflanzen reagieren können und welche ökologischen Auswirkungen dies haben kann.

Diese Forschung ist umso dringender, als die EU-weite Zulassungspraxis von transgenen Pflanzen die Verwendung der Pflanzen für unterschiedlichste Vegetationstypen, Klimata, Böden etc. umfasst. Auf solche unterschiedlichen Umwelteinflüsse können transgene Pflanzen jeweils anders reagieren.

Wegen der methodeninhärenten Risiken sollten die in der EU zugelassenen transgenen Pflanzen einer Neubewertung unterzogen werden. Sicherheitsbedenken wegen genomischer Umordnungen gelten nicht nur für den transgenen Mais Bt11, sondern auch für die transgenen Maislinien Bt 176, MON 810, GA 21 und T 25. Auch die Bandbreite an unbeabsichtigten Effekte der transgenen Roundup Ready resistenten Sojabohne zeigt auf, dass eine Neubewertung vorgenommen werden müsste.

Auf Grund der vielen Unwägbarkeiten und dem dringenden Forschungsbedarf ist es allerdings fraglich, ob transgene Pflanzen, deren Verhalten besonders im Feld nicht vorhersagbar ist, in der Natur getestet oder kommerziell genutzt werden sollten. Gerade die Beispiele der pleiotropen Effekte stellen auch die Lebensmittelsicherheit transgener Pflanzen

in Frage.

Die Pflanzengentechnik braucht ein neues Paradigma, ein Systemparadigma, das nicht nur Gene in Betracht zieht, sondern auch die Zellen, die Umwelt und die Entwicklungsbedingungen und das dynamische Netzwerk der Genomregulation ist. Ein Systemparadigma, das dem plastischen Genom der Pflanzen Rechnung trägt.

Literatur

Abranches R, Santos AP, Wegel E, Williams S, Castilho A, Christou P, Shaw P, Stoger E (2000): Widely separated multiple transgene integration sites in wheat chromosomes are brought together at interphase. *The Plant Journal* 24: 713-723.

Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, Page AM, Pinder R, Dale PJ (1998): Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 279: 2113-2115.

Alleman M, Doctor J (2000): Genomic Imprinting in plants: observations and evolutionary implications. *Plant Mol. Biol.* 43: 147-161.

Beyer P, Al-Babili S, Ye X, Lucca P, Schaub P, Welsch R, Potrykus I (2002): Golden Rice: Introducing the β -Carotene Biosynthesis Pathway into Rice Endosperm by Genetic Engineering to Defeat Vitamin A Deficiency. *American Society for Nutritional Sciences* 132: 506-510.

Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-Induced Repression: Belts, Braces and Chromatin. *Cell* 99: 451-454.

Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R, Delseny M (2000): Extensive Duplication and Reshuffling in the *Arabidopsis* Genome. *The Plant Cell* 12: 1093-1101.

Braun AC (1959): A demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. *PNAS* 45: 932-938.

Brink RA (1973): Paramutation. *Ann. Rev. Genet.*: 129-153.

Castle LA, Errampalli D, Atherton TL, Franzmann LH, Yoon ES, Meinke DW (1993): Genetic and molecular characterization of embryonic mutants identified following seed transformation in *Arabidopsis*. *Molec. Gen. Genet.* 241: 504-514.

Charrier B, Scollan C, Ross S, Zubko E, Meyer P (2000): Co-Silencing of homologous transgenes in tobacco. *Molecular Breeding* 6: 407-419.

Comai L, Tyagi AP, Winter K, Holmes-Davis R, Reynolds S, Stevens Y, Byera B (2000): Phenotypic Instability and Rapid Gene Silencing in Newly Formed *Arabidopsis* Allotetraploids. *The Plant Cells* 12: 1551-1567.

Cubas P, Vincent C, Coen E (1999): An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161.

Datta K, Baisakh N, Oliva N, Torrizo L, Abrigo E, Tan J, Rai M, Rehana S, Al-Babili S, Beyer P, Potrykus I, Datta S (2003): Bioengineered „golden“ indica rice cultivars with β -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant Biotech J* 1: 81-90.

De Block M (1993): The cell biology of plant transformation: current state, problems, prospects and the implication for plant breeding. *Euphytica* 71: 1-14.

Deroles SC, Gardner RC (1988): Analysis of the T-DNA structure in a large number of transgenic petunias generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Mol. Biol.* 11: 365-377.

De Schrijver A, Moens W (2003): Report on the molecular characteristics of the genetic map of event Bt11. http://www.biosafety.be/TP/MGC_reports/Report_Bt11.pdf.

Di Serio F, Schöb H, Iglesias A, Tarina C, BoulDOIRE 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. *PNAS* 98, 11: 6506-6510.

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.

Durrant A (1962): The environmental induction of heritable change in *Linum*. *Heredity* 17: 27-61.

Dymock D, Risiott 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.

Elmayan T, Vaucheret H (1996): Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *The Plant Journal* 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.

Fagard M, Vaucheret H (2000): (Trans)Gene Silencing in Plants: How many Mechanisms? *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51: 167-194.

Federoff NV, Banks JA (1988): Is the *Suppressor-mutator* Element Controlled by a Basic Developmental Mechanism? *Genetics* 120: 559-570.

Finnegan EJ (2002): Epialleles – a source of random variation in times of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 101-106.

Fu X, Duc LT, Fontana S, Bong BB, Tinjuangjun P, Sudhakar D, Twyman RM, Christou P, Kohli A (2000): Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Research* 9: 11-19.

Gendrel AV, Lippmann Z, Yordan C, Colot V, Martienssen R (2002): Dependence of Heterochromatic Histone H3 Methylation Patterns on the Arabidopsis Gene DDM1. *Science* 297: 1871-1873.

Gertz JM, 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.

Gheysen G, Villarroel R, van Montagu M (1991): Illegitimate recombination in plants: a model for T-DNA integration. *Genes Dev.* 5: 287-297.

Goodrich J, Tweedie S (2002): Remembrance of things in past: chromatin remodelling in plan development. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 18: 707-746.

Gorbunova V, Levy AA (1997): Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucl. Acid Research* 25: 4650-4657.

Hollick J, Dorweiler JE, Chandler VL (1997): Paramutations and related allelic interactions Trends in Genetics 13 (8): 302-308.

Horvath H, Jensen LG, Wong OT, Kohl E, Ullrich SE, Cochran J, Kannangara CG, von Wettstein D (2001): Stability of transgene expression, field performance and recombination breeding of transformed barley lines. Theoretical and Applied Genetics: 1-11.

Iglesias V, Moscone E, Papp I, Neuhuber F, Michalowski S, Phelan S, Spider S, Matzke M, Matzke A (1997): Molecular and Cytogenetic Analysis of Stably and Unstably Expressed Transgene Loci in Tobacco. Plant Cell 9: 1251-1264.

Iida S, Tereda R (2004): A tale of two integrations, transgene and T-DNA: gene targeting by homologous recombination in rice. Current Opinion in Biotechnology 15: 132-138.

Iyer Lakshminarayan M, Kumpatla SP, Chandrasekharan MB, Hall TC (2000): Transgene Silencing in monocots. Plant Mol Biol 43: 323-346.

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.

Jenuwein T, Allis CD (2001): Translating the histone code. Science 293: 1074-1080.

Jones PA, Takai D (2001): The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. Science (293): 1068-1070.

Kaeppeler SM, Kaeppeler HF, Rhee Y (2000): Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Mol Biol (43): 179-188.

Kanno T, Mette F, Kreil DP, Aufsatz W, Matzke M, Matzke AJM (2004): Involvement of Putative SNF2 Chromatin Remodeling Protein DRD1 in RNA-Directed DNA Methylation. Current Biology 9: .

Katavic V, Haughn GW, Reed D, Martin M, Kunst L (1994): *In planta* transformation of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gene. Genet. 245: 363-370.

King GJ (2002): Trough a genome, darkly: comparative analysis of plant chromosomal DNA. Plant molecular Biology 48: 5-20.

Köhler C, Grossniklaus U (2002): Epigenetic inheritance of expression states in plant development: the role of Polycomb group proteins. Current Opinion in Cell Biology 14: 773-779.

Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA, Christou P (1999): Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. The Plant Journal 17: 591-601.

Kononov, GE, Bassuner B, Gelvin SB (1997): Integration of T-DNA binary vector 'backbone' sequences into the tobacco genome: evidence for multiple complex patterns of integration. Plant J. 11: 945-957.

Lappe MA, Bailey EB, Childress C, Setchell KDR (1999): Alterations in clinically important

- phytoestrogens in genetically modified, herbicide tolerant soybeans. *Journal of Medical Food* 1(4).
- Lin B-Y (1984): Ploidy barrier to endosperm development in maize. *Genetics* 107: 103-115.
- 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.
- Loc NT, Tinjuangjun P, Gatehouse AMR, Christou P, Gatehouse JA (2002): Linear transgene construct lacking vector backbone sequences generate transgenic rice plants which accumulates higher levels of proteins conferring insect resistance. *Molecular Breeding* 9: 231-244.
- Loidl P (2004): A plant dialect of the histone language. *Trends in Plant Science* 9 (2): 84-90.
- Lynch M, Force A (2000): The probability of duplicate gene preservation by subfunctionalization. *Genetics* 154: 459-473.
- 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.
- Malatesta M, Caporaloni C, Gavaudan S, Rocchi MBL, Serafini S, Tiberi C, Gazzanelli G (2002): Ultrastructural Morphometrical and Immunocytochemical Analyses of Hepatocyte Nuclei from Mice Fed on Genetically Modified Soybean. *Cell Structural und Function* 27: 173- 180.
- Mallory AC, Vaucheret H (2004): MicroRNAs: Something important between the genes. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 120-125.
- Martienssen R, Barkan A, Taylor WC, Freeling M (1990): Somatic heritable switches in the DNA modification of *Mu* transposable elements monitored with a suppressible mutant in maize. *Genes & Development* 4: 331-336.
- Masterson J (1994): Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science* 264: 421-424.
- Matzke AJ, Matzke MA (1998): Position effects and epigenetic silencing of plant transgenes. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 142-148.
- 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.
- Mayerhofer R, Koncz-Kalman Z, Nawrath C, Bakkeren G, Cramer 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.
- McClintock B (1965): The control of gene action in maize. *Brookhaven Symp. in Biol.* 18: 162-184.
- McClintock B (1984): The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 7 Meins F, Binns A (1979): Cell Determination in Plant development. *BioScience* 29 (4): 221-225.
- Meins F, Binns A (1979): Cell Determination in Plant development. *BioScience* 29 (4): 221-225.

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.

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 noninheritance of the silencing. *Genetics* 160: 343-352.

Miyao A, Tnaka 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 for insertion within the genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. *Plant Cell* 15: 1771-1780.

Morino K, Olsen O-A, Shimamoto K (1999): Silencing of an aleurone-specific gene in transgenic rice is caused by a rearranged transgene. *The Plant Journal* 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 *Nicotinana tabacum*. *J. Mol. Biol.* 291: 29-46.

Müller H-P, Varmus HE (1994): DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes. *EMBO Journal* 13: 4704-4714.

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.

Oh TJ, Cullis CA (2003): Labile DNA sequences in flax identified by combined sample representational differences analysis (csRDA). *Plant Molecular Biology* 52: 527-536.

Ohba T, Yoshioka Y, Machida C, Mchida Y (1995): DNA rearrangement associated with the integration of T-DNA in tobacco: an example for multiple duplication of DNA around the integration target. *The Plant J* 7: 157-164.

Ohrend, Kuhlmann I, Doerfler W (1991): Spreading of DNA methylation across integrated foreign (Adenovirus type 12) genomes in mammalian cells. *J. Virology* 65: 4301-4308.

Osborne TC, Pires JC, Birchler JA, Auger DL, Chen ZJ, Lee H-S, Comai L, Madlung A, Doerge RW, Colot V, Marteinssen RA (2003): Understanding the expression of novel genes in polyploids. *Trends in Genetics* 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.

Pawlowski WP, Somers DA (1998): Transgenic DNA integrated into the oat genome is frequently interspersed by host DNA. *PNAS* 95: 12106-12110.

Pawlowski WP, Torbert KA, Rines HW, Somers DA (1998): Irregular pattern of transgene silencing in allohexaploid oat. *Plant Molecular Biology* 38: 597-607.

- Pennisi E (2001): Behind the Scenes of Gene Expression. *Science* (293): 1064-1068.
- Pickford AS, Cogoni C (2003): RNA-mediated gene silencing. *Cell Mol. Life Science* 60: 871-882.
- Pröls F, Meyer P (1992): The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant J.* 2: 465-475.
- Pryciak PM, Varmus HE (1992): Nucleosomes, DNA-binding proteins and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 69: 769-780.
- Ratcliff F, Harrison BD, Baulcombe DC (1997): A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558-1560.
- Reyes JC, Hennig L, Gruissen W (2002): Chromatin-Remodeling and Memory Factors. New Regulators of Plant Development. *Plant Physiology* 130: 1090-1101.
- Rhoades MW, Reinhardt BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP (2002): Prediction of Plant MicroRNA Targets. *Cell* 110: 513-520.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD (1996): Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Press.
- Soltis DE, Soltis PS, Tate JW (2003): Advances in the study of polyploidy since Plant speciation. *New Phytologist* 161: 173-191.
- Somers DA, Makarevitch (2004): Transgene integration in plants: poking or patching holes in promiscuous genomes? *Current Opinion in Biotechnology* 15: 126-131.
- Srinivasa Reddy MS, Dinkins RD, Collins GB (2003): Gene Silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell rep.* 21: 676-683.
- Steimer A, Schöb H, Grossniklaus U (2004): Epigenetic control of plant development: new layers of complexity. *Current Opinion in Plant Biotechnology* 7: 11-19.
- Stevenson DS, Jarvis P (2003): Chromatin silencing: RNA in the driving seat. *Current Biology* 13: R13-R15.
- Svitashev SK, Pawlowski WP, Makarevitch I, Plank DW, Somers DA (2002): Complex transgene locus structures implicate multiple mechanisms for plant transgene rearrangement. *The Plant Journal* 32: 433-445.
- Takano M, Egawa H, Ikeda JE, Wakasa K (1997): The structures of integration sites in transgenic rice. *Plant J.* 11: 353-361.
- Tijstermann M, Ketting RF, Plasterk RHA (2002): The Genetics of RNA Silencing. *Annual Review of Genetics*: 489-508.
- Tingay S, McElroy D, Kalla R, Fieg S, Wang M, Thomas S (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant J* 11: 1369-1376.
- Tomes DT, Weissinger AK, Ross M, Higgins R, Drummond BJ, Schaaf S, Malone-Schoneberg J, Staebel M, Flynn P, Anderson J, Howard J (1990): Transgenic tobacco plants and their progeny derived by microprojectile bombardment of tobacco leaves. *Plant Mol. Biol.* 14: 261-268.

Ulker 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. *The Plant Journal* 18 (3): 253-263.

Uzé M, Potrykus I, Sautter C (1999): Single-stranded DNA in the genetic transformation frequency and integration pattern. *Theor. Appl. Genet.* 99: 487-495.

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. *The Plant Journal* 18 (3): 233-242.

Van Eldik GJ, Litiere K, Jacobs JJ, Van Monatgu M, Cornelissen M (1998): Silencing of β -1,3-glucanase genes in tobacco correlates with an increased abundance of RNA degradation intermediates. *Nucl. Acids. Res.* 26: 5176-5181.

Vance V, Vaucheret H (2001): RNA Silencing in Plants – Defense and Counterdefense. *Science* 292: 2277-2280.

Van den Elzen PJM, Jongedijk E, Melchers LS, Cornelissen BJC (1993): Virus and fungal resistance: From laboratory to field. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 342: 271-278.

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 glyphosphate-resistant soybean to stress (abstract) *British Crop protection Council* 8 eds. *The 1999 Brighton Conference – Weeds.*

Vielle-Calzada J-P, Thomas J, Spillane C, Coluccio A, Hoepfner MA, Grossniklaus U (1999): Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic DDM1 activity. *Genes Dev.* (13): 2971-2982.

Wagner D (2003): Chromatin regulation of plant development. *Curr. Opinion Plant Biol.* 6: 20-28.

Weigel D, Jürgens G (2002) Stem cells that make stems. *Nature* 415: 751-754.

Wenck A (1997): Frequent collinear long transfer of DNA inclusive of the whole binary vector during Agrobacterium-mediated transformation. *Plant Mol. Biol* 34: 913-922.

Windels P, Taverniers I, Depicker A, Bockstaele EV, Loose MD (2001): Characterisation of the Roundup Ready Soybean insert. *Eur Food Technol* 213: 107-112.

Wolffe AP, Matzke MA (1999): Epigenetics: Regulation Through Repression. *Science* (286): 481-486.

Wolters A-M, Visser RGF (2000): Gene silencing in potato: allelic differences and effect of ploidy. *Plant Molecular Biology* 43: 377-386.

Yao M-C, Fuller P, Xi X (2003): Programmed DNA Deletion As an RNA-Guided System of Genome Defense. *Science* 300: 1581-1584.