

Das überholte Paradigma der Gentechnik

Zum zentralen Dogma der Molekularbiologie
fünfzig Jahre nach der Entdeckung der DNA-Struktur

von Beatrix Tappeser und Ann-Kathrin Hoffmann

2003 wurde vielerorts die Entdeckung der DNA vor fünfzig Jahren gefeiert und gewürdigt. Oftmals recht unkritisch. Zu wenig wurde darauf hingewiesen, dass die lange Zeit gültige Vorstellung, dass die Eigenschaften von Lebewesen genetisch eindeutig festgelegt seien, durch die Erkenntnisse der letzten zehn Jahre und die Erfahrungen etwa im Bereich der Pflanzenzüchtung widerlegt wurde: die Funktion der Gene im Organismus ist weniger vorhersehbar als bislang angenommen. Damit ist das alte mechanistische Paradigma der Molekularbiologie, das nicht nur der Gentechnik selbst zugrunde liegt, sondern auch der Risikobewertung dieser Technologie, überholt. Der folgende Beitrag fasst die jüngsten Erkenntnisse der Genetik und des Humangenomprojektes zusammen und arbeitet ihre Bedeutung für die Agro-Gentechnik heraus.

„Fast alle Gentechniker, aber nur manche Genetiker gehen davon aus, dass im Genom alle für den Aufbau eines Organismus wesentlichen ‚Informationen‘ gespeichert seien.“ Zu diesem Fazit kommen die beiden Wissenschaftstheoretiker Peter Janich und Michael Weingarten. Durch die neuen Ergebnisse der Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Humangenomprojekt) hat die offenkundig falsche wissenschaftstheoretische Fundierung gentechnischer Anwendungen sowohl beim Menschen als auch bei Pflanze und Tier erneute Aufmerksamkeit erhalten. Zudem liegen mittlerweile zahlreiche Labordaten vor, die zu einem großen Teil auf der Anwendung gentechnischer Verfahren beruhen, die das zwar elegante aber simple zentrale Dogma der Molekularbiologie: „Ein Gen – ein Protein – eine Eigenschaft“ hinreichend widerlegen. Dies gilt auch für den Bereich Pflanzengenetik respektive Pflanzengentechnik.

Das Humangenomprojekt

Die Ergebnisse der Entschlüsselung des menschlichen Genoms (Gesamtheit aller Erbanlagen eines Organismus) zwingen die Wissenschaft, das zentrale Dogma der Molekularbiologie in die Liste überholter Hypothesen der Wissenschaftsgeschichte zu überantworten. Eine simple lineare Abfolge vom Gen zum Protein bzw. „Effekt“ kann nicht mehr länger als Paradigma der Mo-

lekularbiologie aufrechterhalten werden. Dafür spricht die Tatsache, dass das menschliche Genom mit einer Größe von drei Milliarden Basenpaaren als einzelne Bausteine lediglich 30.000 bis 40.000 Gene enthält, die wiederum für rund 250.000 verschiedene Proteine kodieren. Doch das bisherige zentrale wissenschaftstheoretische Dogma ist die Grundlage aller gentechnischen Arbeiten im Labor und auf dem Feld, auch wenn die tägliche Arbeit jeden experimentellen Molekularbiologen jeden Tag damit konfrontiert, dass ein Genkonstrukt, in ein und dieselbe Pflanze oder in ein Tier eingebracht, zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen führen kann.

Für die meisten Wissenschaftler ist es keine Neuigkeit, dass der Weg von der DNA (Desoxyribonucleinsäure) zu einem hoch entwickelten Organismus aus einem komplexen Netzwerk von Regulationsebenen besteht und nicht einfach in der DNA-Sequenz enthalten ist. Sonst wäre nicht zu erklären, weshalb der Mensch wenig mehr Gene besitzt als etwa der Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (ca. 19.000 Gene), die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (ca. 14.000 Gene) oder die Ackerschmalwand *Arabidopsis thaliana*. Letztere besitzt als eines der kleinsten pflanzlichen Genome mehr als 25.000 Gene. Ein Vergleich mit anderen Organismen zeigt zudem die hohe Übereinstimmung auf der Ebene der DNA: So teilen wir 36 Prozent unserer Erbanlagen mit der Fruchtfliege *Drosophila*, 90 Prozent mit der

Maus, 98 Prozent mit den Schimpansen und immer noch 15 Prozent mit der Ackerschmalwand.

All diese Tatsachen verweisen auf die Komplexität und Bedeutung der Genregulation und das Zusammenspiel unterschiedlicher Regulationsebenen in einem Organismus hin. Der heutige Erkenntnisstand der Wissenschaft beim Menschen und bei der Pflanze widerlegt also das zentrale Dogma der Genetik längst. Belege dafür sollen im Folgenden dargestellt werden. Zudem wird auf Beispiele bzw. Probleme in der Pflanzengentechnik eingegangen.

Das Genom von Tieren und Pflanzen

Das Genom von Pflanzen und Tieren ist aus nur einmal vorkommenden Sequenzen und so genannten repetitiven oder Wiederholungssequenzen zusammengesetzt. Andere Strukturmerkmale kommen hinzu. In Pflanzen sind verhältnismäßig viel mehr Wiederholungssequenzen zu finden als bei Tieren. Pflanzliche Genome variieren in ihrer Größe bis zum Tausendfachen. So hat Mais fünf Milliarden Basenpaare und Weizen 17 Milliarden Basenpaare. Das Genom von *Arabidopsis thaliana* ist mit 125 Millionen Bausteinen eines der kleinsten pflanzlichen Genome. Die erheblichen Unterschiede in der Größe pflanzlicher Genome beruhen vor allem auf dem Vorhandensein großer Mengen repetitiver und mobiler Elemente (Transposons = springende Gene) mit einem Anteil von über 40 Prozent.

Pflanzen besitzen im Vergleich zum Menschen viel mehr Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren. Das sind Regulationsfaktoren, die bei der Übersetzung der DNA in RNA (Ribonucleinsäure) wichtig sind, denn erst die RNA wird in Proteine übersetzt. Diese hohe Zahl von Transkriptionsfaktoren wird mit dem ausgeprägten Sekundärstoffwechsel der Pflanzen und ihrer Fähigkeit zu speziellen Stressantworten in Verbindung gebracht, die für Pflanzen als ortsgebundene Organismen lebensnotwendig sind. Dies verweist aber auch darauf, dass die pflanzliche Genregulation und Entwicklung in besonderem Maße durch Umwelteinflüsse wie Klima, Dauer der Sonneneinstrahlung oder Bodenbeschaffenheit mitgesteuert werden kann.

Netzwerke der Gen-Regulierung (Epigenese)

Um die Regulation des Genoms zu erklären, greift man auf das Modell der „Epigenese“ zurück. Epigenetische Effekte sind zum Teil vererbare Eigenschaften, die aber nicht ausreichend auf der Ebene der DNA erklärbar sind. Einer der geistigen Väter des Konzeptes der Epigenese ist Professor Richard Strohman, der sich auch

anlässlich der Entschlüsselung des menschlichen Erbgutes zu Wort meldete:

„DNA has been called the Book of Life by HGP (Human Genome Project) scientists, but many other biologists consider DNA to be simply a random collection of words from which a meaningful story of life may be assembled. In order to assemble that meaningful story, a living cell uses a second informational system. It is “dynamic” because it regulates changes in products over time, and it is “epigenetic” because it is above genetics in level of organization. And some of these changed products feed back to DNA to regulate gene expression. The key concept here is that these dynamic-epigenetic networks have a life of their own — they follow network rules not specified by DNA. And we do not fully understand these rules.”

Anders ausgedrückt ließe sich sagen, das An- oder Abschalten und das Ausmaß des Ablesens von Genen wird durch das Zusammenschalten/Vernetzen von Signalen, die „von außen kommen“ gesteuert. Diese Signale können Spuren auf der DNA hinterlassen, die vererbbar sind und wiederum die Genablesung beeinflussen oder verändern. Die Gesamtheit dieses sich selbst steuernden Regulationsnetzwerkes wird als *epigenetisches Netzwerk* charakterisiert, da seine Regeln nicht in der DNA festgeschrieben, sondern auf einer anderen Ebene jenseits der DNA angesiedelt sind.

Die epigenetische Kontrolle der Ablesung von Genen ist für die normale Entwicklung eines Organismus von großer Bedeutung. Viele Gene dürfen nur zu bestimmten Zeitpunkten in einem spezifischen Zelltyp aktiv sein und müssen ansonsten stabil unterdrückt werden. Evolutionär betrachtet sind epigenetische Mechanismen als Schutz gegen parasitäre DNA oder RNA wie zum Beispiel Viren entstanden. Der Organismus ist somit in der Lage, „Erfahrungen“ zu speichern, die ihn schützen und in seiner Art erhalten.

Viele Aspekte und neue Erkenntnisse über die zugrunde liegenden Mechanismen sind im Zuge der Erzeugung transgener Tiere und Pflanzen entstanden. Für die Gentechnik (genauer gesagt: für die erfolgreiche und stabile Nutzung von Transgenen) stellen epigenetische Kontrollmechanismen ein großes Problem dar, da sie dazu beitragen, dass fremde Gene markiert werden können. Die Markierung führt dazu, dass sie stillgelegt oder auch teilweise wieder entfernt werden.

Silencing

Pflanzen aber auch Tiere verfügen über die Fähigkeit, fremde DNA oder Gene zu erkennen. Das Genom von Pflanzen weist spezifische Charakteristika auf, unter anderem im prozentualen Anteil einzelner Bausteine der DNA (die DNA ist aus vier verschiedenen Bausteinen zusammengesetzt). Diese Tatsache ist beim Einbringen

von Transgenen von Bedeutung, da Gene verschiedenen Ursprungs einen unterschiedlichen Gehalt an bestimmten Bausteinen aufweisen. Darüber kann ein Gen/Genkonstrukt als „fremd“ erkannt und „stillgelegt“ werden. Dieser Vorgang wird *Silencing* genannt. Er kann als Schutz der Pflanze gegenüber fremder DNA interpretiert werden, mit dem die Integrität einer Art aufrechterhalten wird. Diese Schutzfunktion muss bei gentechnischen Veränderungen gezielt unterlaufen werden.

Imprinting

Genomisches *Imprinting* wurde zuerst bei Säugetieren entdeckt. Es ist ein epigenetischer Prozess, bei dem bestimmte Chromosomenabschnitte in der männlichen und weiblichen Keimbahn bzw. während der Reifung der Keimzellen (Gametogenese) spezifisch markiert werden, so dass in Körperzellen entweder nur das väterliche oder das mütterliche Allel eines Gens aktiv ist. Der Zustand einiger Gene ist im Genom der Eizelle also anders geprägt („imprinted“) als im Genom der Spermazelle und die Markierung ist während des gesamten Lebens stabil.

Geht diese Prägung verloren, sei es durch Fehler oder Mutationen, kann sie nicht behoben werden. Es gibt also keinen enzymatischen Mechanismus, der nach der Befruchtung die genetische Prägung wiederherstellt. Man muss erneut durch die Gametogenese, die Reifung der Keimzellen, gehen. Aus diesem Grund treten auch regelmäßig große Probleme beim Klonen von Säugern auf.

Das *Imprinting* in Pflanzen wurde erstmals bei Mais entdeckt. Es besteht ein Zusammenhang zu anderen epigenetischen Phänomenen in Pflanzen, worunter auch das *Silencing* von Transgenen fällt. Getreidepflanzen wie etwa Mais verfolgen durch das *Imprinting* ein ganz bestimmtes Ziel: sie behalten die mütterliche Kontrolle über die Form der Samen.

Signalübertragung

Bei der so genannten „Signaltransduktion“ werden Signale, die von außen, also von anderen Stellen oder Organen des Organismus oder der Umwelt kommen, so weitergeleitet, dass sie letztendlich über die Kontrolle der Genexpression eine adäquate Antwort in der Zelle auslösen.

Gerade in Pflanzen sind positive und negative Rückkopplungsmechanismen entscheidend für die Regulation vieler Ereignisse. Zudem kann man davon ausgehen, dass ein Weg nie isoliert existiert und oft mehrere Signalwege die gleiche Antwort beeinflussen. Damit die Signale bzw. die Antworten integriert und koordiniert werden können, müssen also viele Überschneidungen zwischen den verschiedenen Signalwegen existieren.

Ein schönes Beispiel ist das Blühen von Pflanzen. Es zeigt, wie komplex und flexibel Genregulation sein kann. Viele Faktoren aus der Umwelt, aber auch endogene Faktoren, legen fest, wann eine Pflanze blüht. Das Zusammenspiel dieser Faktoren bewirkt, ob wir es mit einer Kurztagspflanze oder einer Langtagspflanze zu tun haben. Dabei sind die Gene, die zur Bildung der Blüte führen, teilweise dieselben, doch sie werden – gesteuert durch die Dauer der Sonneneinstrahlung – unterschiedlich aktiviert.

Probleme bei der Erzeugung transgener Pflanzen

Wenn man sich diese Komplexität der Genregulation vor Augen führt, verwundert es nicht, dass die Erzeugung transgener Pflanzen weit davon entfernt ist, ein präziser Prozess zu sein, dessen Auswirkungen vorhersehbar und beschreibbar sind. Bei der Erzeugung transgener Organismen ist es die Regel, dass es zu unerwarteten Phänomenen kommt. Bei Pflanzen resultieren daraus unbeabsichtigte pflanzenphysiologische Veränderungen. Sie haben entweder nichts mit dem Genprodukt zu tun, oder es handelt sich um Sekundäreffekte von Genen, die vor der gentechnischen Veränderung nicht bekannt waren. Diese unerwarteten Phänomene werden auch Positions- und Pleiotropieeffekte genannt.

Positionseffekte

Die Funktion und Regulation eines Gens ist unter anderem abhängig von seiner Position im Genom. Bei den gegenwärtigen Transformationsmethoden werden fremde Gene jedoch *zufällig* in das Empfänger-genom eingefügt. Die Integration kann in Hinblick auf den Ort des Transgens nicht kontrolliert werden. Am Integrationsort kommt es häufig zu Umordnungen der Sequenzen sowohl der integrierenden neuen Gensequenzen als auch der flankierenden Sequenzen des Empfänger-genoms – mit in der Regel unbekanntem Folgen.

Pleiotropie

Unter Pleiotropie versteht man die Tatsache, dass ein und dasselbe Gen verschiedene Wirkungen haben kann. Bei transgenen Organismen können Veränderungen von mehreren Merkmalen entstehen, auch wenn nur ein Gen eingeführt wird. Die Konsequenz können die verschiedensten Veränderungen im gesamten Stoffwechsel der Zelle sein. Es gibt zum Beispiel Gene, bei denen eine pleiotrope Wirkung auf „unverwandte“ morphologische Merkmale sogar charakteristisch ist. Eine der wenigen systematischen Untersuchungen zu Positions- und Pleiotropieeffekten wurde an den Kartoffelsorten Bintje und Escort durchgeführt, die mit einem Gen für eine Virushülle zum Aufbau einer Virusresistenz trans-

formiert worden waren. Man untersuchte die PVX (*Potato Virus X*)-resistenten Sorten auf ihre Ähnlichkeit mit den jeweiligen Ausgangssorten. Lediglich 18 Prozent der Bintje-Pflanzen, aber 82 Prozent der Escort-Pflanzen behielten die Charakteristika bei, die in den entsprechenden Sortenlisten erfasst sind. Die genauen Ursachen der Abweichung sind bisher nicht geklärt. Aber diese Ergebnisse zeigen zusätzlich, dass es selbst in der gleichen Art eine hohe Variation in Bezug auf Positions- oder Pleiotropieeffekte gibt.

Wie schon beschrieben wird die Genexpression durch die Interaktion unterschiedlichster Faktoren, die Teil eines komplexen und dynamischen Netzwerkes sind, gesteuert. Es ist also nicht verwunderlich, dass viele Transgene anders als erwartet exprimiert werden, da sie für die Regulationsnetzwerke der Pflanze fremd sind.

Unbeabsichtigte Veränderungen, die bei der Erzeugung transgener Pflanzen entstehen können, sind in der Literatur nur unzureichend dargestellt, da diese oftmals zu einer nicht berechenbaren Instabilität des erwünschten Merkmals führen. Das heißt, die Pflanzen mit schlechteren „Werten“ werden im Labor aussortiert. Deshalb ist es schwierig, Beispiele lückenlos zu dokumentieren und so können lediglich einzelne Beispiele aufgeführt werden.

Beispiel Roundup Ready Sojabohnen

Ein populäres Beispiel ist die herbizidresistente Roundup Ready (RR) Sojabohne. Bei diesen transgenen Pflanzen findet man eine bis zu 20 Prozent erhöhte Verholzung der Stängel, die vermutlich durch das neue bakterielle Enzym, das auch einen Einfluss auf den Ligninstoffwechsel ausübt, ausgelöst wird. Diese Veränderung hat offensichtlich einen negativen Effekt auf die transgenen Sojabohnen unter Stressbedingungen. Hitzestress führt zu geringeren Ernteerträgen der transgenen Pflanzen. Außerdem ist durch den gentechnischen Eingriff auch der Hormonhaushalt betroffen: Der Gehalt verschiedener Phytoöstrogene der Sojabohne veränderte sich um zwölf bis 14 Prozent.

Eine belgische Arbeitsgruppe veröffentlichte zudem 2001, dass es bei der Integration der Fremd-DNA in die Sojabohne an einer Flankenregion zu mehreren Umordnungen in der Sequenz gekommen war und vermutlich die pflanzliche DNA an der Integrationsstelle ebenfalls umgeordnet wurde. Zusätzlich wurde eine 254 Basenpaare umfassende verkürzte Version des Herbizidresistenzgens gefunden. Im Anschluss daran wurde ein DNA-Segment mit einer Länge von 534 Basenpaaren entdeckt, ohne Sequenzhomologien zu Soja oder einer anderen pflanzlichen DNA. Es wird vermutet, dass es sich hierbei entweder um Vektor-DNA oder sonstige fremde DNA handelt. All dies wurde fünf Jahre nach der

kommerziellen Einführung der herbizidresistenten Sojapflanzen veröffentlicht. Ob es erst zu diesem Zeitpunkt entdeckt wurde oder der Herstellerfirma längst bekannt war, kann zurzeit nicht gesagt werden.

Beispiel Ackerschmalwand

Sehr häufig kann beim Einbringen von Transgenen ein Abschalten des Transgens und zusätzlich verwandter Gene beobachtet werden. Dieses Problem des *Silencings* ist für die Entwicklung bzw. die Effizienz von Expressionssystemen für fremde Proteine in Pflanzen von großer Bedeutung (s. o.). Bei der Produktion von Antikörpern in transgenen *Arabidopsis*-Linien wurde beobachtet, dass die Stilllegung der Transgene die Ursache für die unzuverlässige Bildung der Antikörper ist. In allen fünf untersuchten Linien kam es zum *Silencing* und damit zu einer instabilen Antikörper-Produktion. Jede Linie zeigte ihr eigenes spezifisches Profil. Es wurde deutlich, dass die Menge an Antikörpern vom Entwicklungsstadium der jeweiligen Linie abhängig ist und dass verschiedene Faktoren (z. B. der Integrationsort) die Transgene empfindlicher für *Silencing* machen.

Beispiel „Golden Rice“

Reis ist die erste einkeimblättrige Pflanze, die routinemäßig transformiert wurde. Reis spielt als menschliche Nahrungsquelle eine wichtige Rolle. Bei dem so genannten „Goldenen Reis“ wurde über das Einbringen zweier Gene aus *Narcissus pseudonarcissus* und einem bakteriellen Gen ein Biosyntheseweg zur Herstellung von Provitamin A im Nährgewebe des Reissamens etabliert.

Samen der transformierten Linien haben meistens eine gelbe Farbe, weshalb davon ausgegangen wird, dass die Carotinoidsynthese prinzipiell möglich ist. Der Vitamin A-Gehalt ist jedoch derzeit noch sehr gering. Außerdem wurde erwartet, dass der Reis rot statt gelb gefärbt sein müsste. Überraschenderweise ist eines der eingeschleusten Enzyme gar nicht für die Provitamin A-Synthese notwendig. Es ist nach wie vor völlig unklar, welche Enzyme der Pflanze die Synthese bewerkstelligen. Es wird vermutet, dass ein regulatorischer Weg eine Rolle spielt, über dessen Mechanismus und also auch weitere Auswirkungen bisher nichts bekannt ist.

Bei weiteren Versuchen mit demselben Reis zum Ersatz einer ebenfalls eingeführten Antibiotikaresistenz hatten viele der veränderten Linien mehrere rearrangierte Kopien der drei eingeführten Gene. In den meisten Fällen bildeten die Transgene, zumindest immer eine Kopie der drei Gene, an einer Stelle im Genom-Cluster. Zehn Prozent der Pflanzen zeigten im Vergleich zu den Kontrollpflanzen einen abweichenden Phänotyp. Sie waren von kleiner Statur, dunkel und immergrün, kamen später zur Blüte, und einige produzierten wesentlich weniger Samen. Es wird vermutet, dass der

Zwergenwuchs auf einem Gibberelin-Mangel (Gibberelin ist ein Pflanzenhormon) beruht, da die Biosynthese von Carotinoiden und Gibberelin einen gemeinsamen Vorläufer besitzt. Bei der Analyse des Carotinoid- und Xantophyll-Gehalts in Nährgewebe und Samen zeigte sich, dass in einigen Linien Carotinoide nicht nachweisbar waren, obwohl alle drei Gene integriert hatten.

Fazit

Dies sind nur wenige Beispiele dafür, mit welchen Schwierigkeiten die Gentechniker zu kämpfen haben, wenn sie Pflanzen gentechnisch mit neuen Eigenschaften ausstatten möchten oder anders ausgedrückt: es sind Beispiele dafür, wie wenig wir auch fünfzig Jahre nach der Entdeckung der DNA-Struktur über die Genregulation wissen. Es wird mit Hilfe des gentechnischen Methodenrepertoires zunehmend klar, dass Gene dynamische Gebilde sind, die, im Laufe der Entwicklung eines Organismus verändert, auf Umweltbedingungen reagieren oder ruhig gestellt werden können. Gene können die Information für die Bildung von mehr als einem Protein enthalten und damit auf verschiedene Eigenschaften eines Organismus einwirken. Das alte Paradigma der Molekularbiologie, das nach wie vor Grundlage der Gentechnik und ihrer Risikobewertung ist, ist überholt!

Hinweis

Ein ausführliches Quellen- und Literaturverzeichnis zu diesem Beitrag findet sich auf der Internetseite des Kritischen Agrarberichts (www.kritischer-agrarbericht.de).

Autorinnen

Dr. Beatrix Tappeser ist Biologin und Koordinatorin des Arbeitsbereichs „Biodiversität, Ernährung und Landwirtschaft“ des Öko-Instituts e.V. in Freiburg.



Ann-Kathrin Hoffman ist freie Mitarbeiterin im Arbeitsbereich „Biodiversität, Ernährung und Landwirtschaft“ des Öko-Instituts e.V. in Freiburg.



Öko-Institut e.V.
Geschäftsstelle Freiburg
Postfach 6226
79038 Freiburg
Telefon: 0761 / 45295-0
E-Mail: b.tappeser@oeko.de
www.oeko.de