

**Produktesicherheit  
von krankheitsresistenten Nutzpflanzen:  
Toxikologie, allergenes Potential, Sekundäreffekte  
und Markergene**

**Stephanie Franck und Beat Keller**

Eidg. Forschungsanstalt für landwirtschaftlichen Pflanzenbau  
Reckenholzstrasse 191, CH-8046 Zürich

November 1995

# Inhaltsverzeichnis

## Zusammenfassung

<b>Kapitel I: Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>Kapitel II: Biochemische Grundlagen der Resistenzzüchtung</b> .....	<b>4</b>
1. Biochemische Grundlagen der klassischen und molekularen Züchtung auf Pilzresistenz.....	4
1.1 Antifungale Proteine.....	4
1.1.1 Strukturproteine.....	5
1.1.2 Proteine mit direkter antifungaler Wirkung.....	6
1.1.3 PR-Proteine: „Pathogenesis-related“.....	7
1.1.4 Andere Proteine.....	7
1.2. Phenolische Substanzen und Phytoalexine.....	8
1.2.1 Lösliche Phenole.....	8
1.2.2 Lignin und polymere Phenole.....	8
1.2.3 Phytoalexine.....	8
1.3 Echte Resistenzgene.....	9
1.4 Andere Ansätze zur Erhöhung der Pilzresistenz.....	10
2. Biochemische Grundlagen der klassischen und molekularen Züchtung auf Insektenresistenz.....	10
2.1 Zucker und Kohlehydrate.....	11
2.2 Aminosäuren und Proteine.....	11
2.2.1 Aminosäuren und primäre Speicherproteine.....	11
2.2.2 Lectine.....	11
2.2.3 Protease-Inhibitoren.....	12
2.2.4 $\alpha$ -Amylase Inhibitoren.....	12
2.3 Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe.....	12
2.3.1 Terpene.....	13
2.3.2 Phenole.....	13
2.3.3 Alkaloide und Senföle.....	14
2.4 Echte Resistenzgene.....	15
2.5 <i>Bacillus thuringiensis</i> als Genquelle.....	15
3. Biochemische Grundlagen der klassischen und molekularen Züchtung auf Virusresistenz.....	16
3.1 Defense-Faktoren der Pflanzen.....	16
3.2 Echte Resistenzgene.....	16
3.3 Sequenzen des viralen Genoms.....	17
3.3.1 Virale Hüllproteine.....	17
3.3.2 Expression von viraler Replicase.....	17
3.3.3 Symptomverminderung durch Satelliten-RNA.....	17
3.3.4 Defective interfering RNA/DNA protection.....	17
3.3.5 Ribozym-vermittelte Virusresistenz.....	17
3.3.6 Antisense-vermittelte Virusresistenz.....	18
3.3.7 Andere Ansätze.....	18
<b>Kapitel III: Klassische und molekulare Resistenzzüchtung:</b>	
<b>Toxikologische Risiken</b> .....	<b>20</b>
1. Problemstellung und Grundbegriffe.....	20
2. Proteine und Aminosäuren.....	21

2.1 Lectine.....	21
2.2 Protease-Inhibitoren.....	22
2.3 Antifungale Hydrolasen.....	23
2.4 Thionine.....	24
2.5 Toxische Aminosäuren.....	24
3. Glykoside.....	24
3.1 Glucosinolate.....	24
3.2 Cyanogene.....	25
3.3 Saponine.....	25
4. Aromatische Verbindungen.....	26
4.1 Einfache Phenole.....	26
4.2 Tannine.....	26
4.3 Aromatische Carbonsäurederivate.....	27
5. Alkaloide.....	27
6. Echte Resistenzgene.....	29
7. Virushüllproteine.....	30
8. <i>Bacillus thuringiensis</i> ssp.....	30
9. Bewertung der toxikologischen Daten.....	32
10. Toxikologische Risiken <i>mangelnder</i> Resistenzausstattung.....	33
Schlussfolgerungen.....	35

#### Kapitel IV: Klassische und molekulare Resistenzzüchtung:

<b>Abschätzung des allergenen Potentials.....</b>	<b>37</b>
1. Bedeutung von Nahrungsmittelallergien.....	37
1.1 Begriffe und Klassifizierung.....	37
1.2 Häufigkeit von Lebensmittelallergien.....	38
1.3 Zusammenhang zwischen Pollen- und Lebensmittelallergien.....	38
1.4 Dosiseffekte.....	38
1.5 Ursachen und Funktion (?) allergischer Reaktionen.....	39
2. Nahrungsmittelpflanzen mit bekanntem allergenem Potential.....	39
2.2 Bekannte Kreuzreaktionen.....	40
2.3 Einfluss von Sorte und Umwelt auf das allergene Potential von Nahrungsmitteln.....	40
3. Identifizierte und charakterisierte Allergene aus Nahrungsmittelpflanzen.....	41
3.1 Allgemeine Charakteristika von identifizierten Nahrungsmittelallergenen.....	41
3.2 Identifizierte Allergene mit mutmasslicher oder bekannter <i>defense</i> -Funktion.....	41
3.3 Identifizierte Allergene mit struktureller Verwandtschaft zu <i>defense</i> -Genen...	42
4. Prüfung und Abschätzung des allergenen Potentials von „ <i>defense</i> “-Genen.....	43
4.1 Die Genquelle ist ein Nahrungsmittel mit hohem allergenem Potential.....	44
4.2 Die Genquelle ist ein Nahrungsmittel mit geringem allergenem Potential oder ein nicht als Nahrungsmittel genutzter Organismus mit bekanntem allergenem Potential.....	44
4.3 Die Genquelle hat kein dokumentiertes allergenes Potential.....	45
4.4 Die „Zielpflanze“ ist für ihr allergenes Potential bekannt.....	45
5. Anwendung der dargestellten Prinzipien auf marktreife gentechnisch veränderte Nahrungsmittelpflanzen.....	45
Schlussfolgerungen.....	46

#### Kapitel V: Unbeabsichtigte pflanzenphysiologische Veränderungen:

<b>Sekundäreffekte der Genübertragung.....</b>	<b>50</b>
1. Positionseffekte und insertional mutagenesis.....	50
1.1 Positionseffekte.....	50
1.2 Insertional mutagenesis.....	52
2. Anzahl integrierter Genkopien.....	53
3. Somaklonale Variation.....	53
4. Pleiotropie.....	54
5. Genetische und Umwelt-Stabilität transgener Pflanzen.....	57
Schlussfolgerungen.....	59
<b>Kapitel VI: Lebensmittelsicherheit selektierbarer Marker.....</b>	<b>60</b>
1. Einführung.....	60
1.1 Nutzung und Verbreitung.....	60
1.2 Lebensmittelsicherheit von Markergenen.....	61
2. Antibiotikaresistenzgene.....	61
2.1 Toxikologie der Antibiotikaresistenzgene.....	61
2.2 Allergenizität.....	62
2.3 Inaktivierung von therapeutisch verabreichtem Kanamycin.....	62
2.4 DNA-Uebertragung.....	62
3. Herbizidresistenzmarker.....	63
3.1 Toxikologie des Genprodukts.....	63
3.2 Allergenizität.....	64
4. Alternativen zum Einsatz von Antibiotika- und Herbizidresistenzmarkern.....	64
4.1 Excisionssysteme und markerfreie Systeme.....	64
4.2 Andere Marker.....	65
Schlussfolgerungen.....	66
<b>Kapitel VII: Verfahren zur Ueberprüfung der Lebensmittelsicherheit                   gentechnisch veränderter Nahrungsmittelpflanzen.....</b>	<b>69</b>
1. Das Konzept der substantiellen Aequivalenz.....	69
2. Die Ausarbeitung des Konzepts.....	70
Schlussfolgerungen.....	73
<b>Erläuterungen.....</b>	<b>74</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>78</b>

## **ZUSAMMENFASSUNG**

In der Züchtung von Kulturpflanzen ist die Erhöhung der Krankheitsresistenz eines der wichtigsten Zuchtziele. Die Verbesserung der Resistenz gegen Pilze, aber auch gegen Insekten und Viren beruht in der klassischen Züchtung auf einer Vielzahl von biochemischen Substanzen sowie spezifischen Resistenzgenen. Bis auf einige wenige Ausnahmen hat diese Resistenzverbesserung zu keinen Problemen in der Lebensmittelsicherheit der gezüchteten Pflanzen geführt. Sowohl toxikologisch wie auch bezüglich der Allergenizität sind die resistenten Pflanzen nicht von den Ausgangspflanzen mit niedrigerer Resistenz zu unterscheiden. Einzige Ausnahmen davon sind Kulturpflanzen, bei denen schon in anfälligen Pflanzen hohe Gehalte an potentiell toxischen Stoffen vorhanden sind (z.B. Kartoffeln, Sellerie). Hier kann erhöhte Resistenz mit der Bildung von zu hohen Gehalten an problematischen Substanzen (z.B. Alkaloide) verbunden sein.

Mit der Gentechnologie ist es möglich geworden, Gene aus verschiedensten Lebewesen mit unterschiedlichster Wirkungsweise in Pflanzen einzubringen und damit die Krankheitsresistenz zu erhöhen. Damit stellen sich neue Fragen betreffend Toxizität und allergenem Potential. Bei einigen Genen und ihren Genprodukten ist nach heutigem Wissensstand (basierend auf umfassenden Studien) mit keinerlei toxischen Wirkungen zu rechnen. Dies betrifft Strategien zur Steigerung der Insekten- (B.t. Toxin) und Virusresistenz (Hüllproteine) sowie Markergene. Daneben gibt es Strategien zur Resistenzsteigerung durch Proteine, die toxikologisch bedenklich sind. Dazu gehören Lectine (z.B. Weizenkeimagglutinin, diskutiert zur Verbesserung der Insektenresistenz) oder Proteaseinhibitoren. Bei Strategien zur Verbesserung der Pilzresistenz sind bis jetzt wenig toxikologische Probleme offensichtlich geworden. Allerdings wurden in diesem Bereich bis heute nur wenig intensive Studien gemacht.

Neben den toxikologischen Folgen von gentechnisch veränderten Lebensmitteln ist das mögliche Auftreten von neuen Lebensmittelallergien zu untersuchen. Das Risiko unerwarteter Allergien ist beim Einsatz gentechnischer Zuchtmethoden grösser als in der klassischen Züchtung. Einige Proteine, die bei der Krankheitsabwehr von Pflanzen gebildet werden, weisen mittlere bis hohe Homologie zu identifizierten Allergenen (Lebensmittelallergene oder Pollenallergene) auf. Ein Zusammenhang zwischen dem Abwehr-Status der Pflanze und ihrem allergenen Potential kann in manchen Fällen nicht ausgeschlossen werden. Allerdings kann die gentechnische Übertragung bekannter Allergene mit geeigneten Testmethoden erkannt werden und solche Produkte lange vor Marktreife in der Entwicklung gestoppt werden.

Bei der Diskussion über mögliche Probleme für die Nahrungsmittelsicherheit transgener, resistenter Pflanzen müssen auch die Folgen der Nicht-Anwendung solcher Strategien analysiert werden. Als Beispiel dafür wird die Problematik der Mykotoxine von Krankheitserregern auf Getreide beschrieben.

## Kapitel I: Einleitung

"Krankheitsresistenz<sup>1</sup> ist im Pflanzenreich nicht die Ausnahme, sondern die Regel. Pflanzen haben gegen fast alle Mikroorganismen ihre eigenen Abwehrmechanismen, aber in einigen wenigen Fällen können sogenannte Pathogene die Verteidigungsbarrieren mit offensiven Methoden durchbrechen und Krankheiten auslösen" (Vidhyasekaran 1988).

Pflanzen sind also immun gegen tausende von Schaderregern, sie sind, der englischen Terminologie zufolge, "Non-host". Die Non-host-Resistenz gegenüber Viren, Bakterien, Pilzen und Insekten beruht auf einer Kombination verschiedenster morphologischer und biochemischer Schutzmechanismen. Die jeweilige Ausprägung dieser Mechanismen hat einen grossen Einfluss darauf, ob der Pflanze das Prädikat "essbar" zugestanden wird oder nicht, denn oft sind diejenigen Substanzen, die einer Pflanze Resistenz gegen Mikroorganismen und Insekten verleihen, auch für den Menschen und seine Nutztiere giftig.

Manche Kulturpflanzen sind durch das „Wegzüchten“ von für Pathogene toxischen Inhaltsstoffen anfälliger als ihre verwandten Wildpflanzen, weil toxische oder schlecht schmeckende Inhaltsstoffe im Laufe der Zeit eliminiert wurden: "essbare" Sorten wurden gezüchtet. Auch sie verfügen noch über eine breite Non-host-Resistenz, aber die Abwehrlücken, an denen spezifische Pathogene ansetzen können, führen zu teilweise beträchtlichen Ertragsverlusten und mindern meistens auch die Produktqualität.

Es ist deshalb die Aufgabe der Resistenzzüchtung, die spezifische Anfälligkeit der Kulturpflanzen zu minimieren, ohne sie wieder mit Eigenschaften zu versehen, die dem Verzehr entgegenstehen.

Die klassische Resistenzzüchtung arbeitet im wesentlichen mit der genetischen Variabilität *innerhalb* der betrachteten Art (und ihrer kreuzbaren Verwandten).

Die molekulare Züchtung kann theoretisch die *gesamte* genetische Variabilität der Natur nutzen, über alle Artgrenzen hinweg. Dies bedeutet, dass auch Gene aus Organismen, die noch nie dem menschlichen Verzehr gedient haben, in Nahrungspflanzen eingelagert werden können. Damit ergeben sich vollkommen neue toxikologische Fragestellungen.

Einzelne Staaten sowie internationale Organisationen wie diejenige für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) haben Regelwerke entworfen, anhand derer die toxikologischen Gefahren von gentechnisch veränderten Lebensmitteln untersucht werden sollen.

Übereinstimmend benennen sie folgende Risikokategorien:

- A) Das Genprodukt des transferierten Gens
- B) Das Genprodukt des kotransferierten Markergens
- C) Sekundäre (unbeabsichtigte) Veränderungen im pflanzlichen Stoffwechsel.

Werden pflanzenfremde Gene eingebracht, so besteht über die Notwendigkeit, toxikologische Untersuchungen zu den Kategorien A) und B) anzustellen, noch ein relativ weitgehender Konsens. Für Kategorie C) gilt dies schon nicht mehr, und zwar wegen der damit verbundenen methodischen Schwierigkeiten: Unbeabsichtigte Veränderungen können nur dann festgestellt werden, wenn sie entweder offensichtlich oder mindestens leicht zu finden sind. Die Toxikologen sind darauf angewiesen, zu wissen, wonach gesucht werden soll.

Besonders deutlich wird das Fehlen eines wissenschaftlichen Konsenses bei der Manipulation von Abwehrgenen, die in der betrachteten Pflanzenart *natürlicherweise* vorkommen. Mit gentechnischen Methoden kann das Expressionsniveau, also die gebildete Menge einer resistenzvermittelnden Substanz, verändert werden. Oft kann dies die klassische Züchtung aber auch, insbesondere dann, wenn in Bezug auf dieses Merkmal natürliche Variabilität schon vorliegt. So werden nun, ausgehend von der notwendigen Debatte über toxikologische Sicherheitsrisiken der Gentechnik, plötzlich Fragen nach der Natur konventionell gezüchteter resistenter Sorten aufgeworfen, deren Verzehr bisher in der Regel für unbedenklich gehalten wurde. Dass diese Annahme der Unbedenklichkeit nicht mehr ausnahmslos geteilt wird, belegt das folgende Zitat:

"Pflanzenzüchter haben mit einigem Erfolg daran gearbeitet, Sorten herzustellen, die weniger abhängig vom Pestizideinsatz sind. Diese erhöhte Resistenz der verschiedenen Kulturarten kann aber das Ergebnis gesteigener Phytoalexinspiegel sein. Bis andere Methoden der krankheits- und Schädlingskontrolle entwickelt sind, scheint der Einsatz wohlüberlegt hergestellter Pestizide mit bekannten chemischen, ökologischen und toxikologischen Eigenschaften einer Entwicklung neuer Sorten mit Phytoalexinen unbekannter Natur vorzuziehen sein" (Shibamoto und Bjeldanes: Introduction to Food Toxicology 1993, S. 96)<sup>2</sup>.

Das Zitat zeigt noch ein zweites: Resistenzzüchtung und Pestizideinsatz<sup>3</sup> sind teilweise komplementär, man kann also in manchen Fällen zwischen diesen beiden Methoden der Pilz-/Schädlingsabwehr wählen.

Solange die Resistenzzüchtung ausschliesslich mit klassischen Methoden betrieben wurde, bestand - im Gegensatz zur Auffassung von Shibamoto und Bjeldanes (1993) - meist Einigkeit darüber, dass sie dem Pestizideinsatz aus toxikologischer, ökologischer und ökonomischer Sicht vorzuziehen sei. Dieses allgemeine Vertrauen in die klassische Resistenzzüchtung ist auf die molekulare Züchtung nicht unbedingt übertragbar, denn es resultiert (auch) aus dem eingeschränkten Handlungsspielraum ersterer: nah verwandte, kreuzbare Arten haben meist ähnliche Inhaltsstoffe wie die "sichere" Kulturpflanze.

Relative Einigkeit herrscht darüber, dass die toxikologischen Risiken *unterlassener* Resistenzzüchtung erheblich sein können. Dies gilt besonders dann, wenn der Schaderreger selbst toxische Substanzen bildet oder wenn persistente, toxische Pestizide eingesetzt werden müssen, um die fehlende Resistenz auszugleichen.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, die toxikologischen Risiken von gentechnisch veränderten krankheits-, schädlings- und virusresistenten landwirtschaftlichen Kulturpflanzen einzuschätzen, und zwar im Vergleich zu klassisch gezüchteten Sorten. Bis jetzt sind im Schweizer Handel keine gentechnisch veränderten krankheitsresistenten Pflanzen erhältlich, weder als Saatgut noch als Konsumware. In der Schweiz und in anderen Ländern wurden bis heute nur sehr wenige toxikologische Studien zu den Risikokategorien A) und C) veröffentlicht. Es kann infolgedessen kaum auf vorhandene Abschätzungen zurückgegriffen werden.

Um eventuelle Risiken der *Genprodukte*, also der *beabsichtigten Veränderungen*, beurteilen zu können, wird im Folgenden ein Überblick über die biochemischen Mechanismen und die daran beteiligten Stoffwechselprodukte der Pilz-, Insekten- und Virusresistenz gegeben. Ansätze der klassischen Resistenzzüchtung werden den gentechnologischen Strategien gegenübergestellt (Kapitel II).

Dann werden die Stoffklassen und Mechanismen, die sich für die Resistenz als bedeutend herausgestellt haben, anhand der vorliegenden Literatur auf ihre toxikologischen Eigenschaften hin überprüft. Damit lässt sich schon bevor veränderte Sorten für analytische Zwecke zur Verfügung stehen erkennen, in welchen Fällen mit

Problemen gerechnet werden muss. Dieses Verfahren zeigt ausserdem die Vielfalt der bearbeiteten Ansätze auf, die in ihren Konsequenzen für die Lebensmittelsicherheit zum Teil ausserordentlich unterschiedlich sind (Kapitel III).

Zur Kategorie "*Genprodukte*" gehört auch die Frage, ob und in welchen Fällen ein Risiko für Allergiker auftreten kann. Dies schwierige Frage erfordert eine kurze Darstellung des momentanen Kenntnisstandes über Lebensmittelallergien; es wird der Versuch unternommen, auf Grund des gegenwärtigen Standes des Wissens eine wissenschaftlich haltbare Stellung zu den Risiken einzunehmen (Kapitel IV).

Um die Risiken der *unbeabsichtigten Veränderungen* zu diskutieren, werden die möglichen Effekte (Pleiotropie, Positionseffekte, Zerstörung kodierender Sequenzen am Integrationsort) aufgezeigt und das zu ihrer Einschätzung entworfene Konzept der "substantiellen Äquivalenz" erläutert (Kapitel V und VII).

Die möglichen toxikologischen und allergologischen Probleme der Verwendung von Markergenen und Alternativen hierzu werden dargestellt (Kapitel VI).

## KAPITEL II: BIOCHEMISCHE GRUNDLAGEN DER RESISTENZZÜCHTUNG

### 1. Biochemische Grundlagen der klassischen und molekularen Züchtung auf Pilzresistenz

Jede Pflanzenart ist vor der Mehrzahl aller Pflanzenpathogene absolut geschützt. Die biochemischen Grundlagen dieses "Non-host-Resistenz" genannten Phänomens sind bis jetzt nur zum Teil aufgeklärt (Staskawicz et al. 1995). Bei der Anfälligkeit einer Art gegen "ihre" Pathogene handelt es sich um seltene Ausnahmen von der Regel der grundsätzlichen Basisresistenz.

Das theoretische Konzept zur Züchtung auf Pilzresistenz unterscheidet zwischen zwei Resistenztypen: der monogenen (vertikalen) Resistenz und der polygenen (horizontalen) Resistenz. Die monogene Resistenz wirkt gegen eine bestimmte Erregerrasse vollständig und gegen eine andere gar nicht (Flor 1956), während polygene Resistenzen der Pflanze meist einen Teilschutz gegen mehrere Rassen verleihen, der in der Regel ausreicht, um wesentliche Ertrags- oder Qualitätsverluste zu verhindern.

Mit dem Einsatz molekularbiologischer und biochemischer Techniken in der Resistenzforschung zeigt sich immer deutlicher, dass jede Pflanze/Pilz-Interaktion ein eigenständiges Phänomen ist, welches nicht ohne weiteres zur Erklärung anderer Interaktionen herangezogen werden darf (Nicholson und Hammerschmid 1992).

Dennoch gibt es Gemeinsamkeiten, und zwar sowohl bezüglich der Resistenzmechanismen als auch bei den zugrundeliegenden Stoffklassen, von denen folgende eine wichtige Rolle spielen :

- Antifungale Proteine
- Phenolische Komponenten und Phytoalexine
- Rassenspezifische (echte) Resistenzgene

(Übersichtsartikel: Cornelissen und Melchers 1993, Lamb et al. 1992, Strittmatter und Wegener 1993).

Das zeitlich und räumlich koordinierte Zusammenwirken dieser Substanzen führt zu verschiedenen Typen und Graden der Resistenz gegen pilzliche Erreger. Substanzen derselben Stoffklasse können zu verschiedenen Resistenztypen beitragen. So sind beispielsweise die Lignine an der konstitutiven Basisresistenz beteiligt, sie haben aber offensichtlich auch eine Funktion bei spezifischen hypersensitiven Reaktionen (Moerschbacher et al. 1990).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, eventuelle toxikologische Risiken der Resistenzsteigerung aufzuzeigen. Deshalb stehen nicht die verschiedenen Interaktionstypen im Mittelpunkt des Interesses, sondern die beteiligten Stoffklassen.

Im folgenden werden diese Stoffklassen kurz beschrieben. Ihre möglichen oder tatsächlichen Funktionen in der klassischen und molekularen Resistenzzüchtung werden jeweils an einigen Beispielen dargestellt.

#### 1.1 Antifungale Proteine

Nach einem Pathogenbefall werden häufig sogenannte "defense-related genes" aktiviert (Bowles 1990 sowie Huub und Linthorst 1991). Die Einteilung der zugehörigen Proteine wird von den einzelnen Autoren sehr unterschiedlich gehandhabt. Dem

Folgenden liegt die Klassifizierung von Bowles (1990) in leicht abgewandelter Form zugrunde.

### 1.1.1 Strukturproteine

Strukturproteine verstärken, "reparieren" oder verändern die pflanzliche Zellwand und haben somit grundsätzlich Einfluss auf die Abwehr eindringender Pilze. Es werden drei Klassen von Zellwandproteinen beschrieben: hydroxyprolinreiche Glycoproteine (HRGPs), prolinreiche Proteine und glycinreiche Proteine (Keller 1993).

Offenbar hat die Zellwand aber bei der Pilzabwehr nicht nur passiv-mechanische Funktionen, sondern spielt auch in der Aufnahme, Verarbeitung und Weiterleitung von Informationen eine wichtige Rolle (Stone 1989 und Reymond et al. 1995).

Über eine erfolgreiche gentechnische Manipulation von Zellwandproteinen zur Erhöhung der Pilzresistenz wurde bis jetzt nicht berichtet.

### 1.1.2 Proteine mit direkter antifungaler Wirkung

Hierbei handelt es sich um Proteine, deren antifungale Wirkung *in vivo* oder *in vitro* direkt erwiesen ist oder deren Expressionsmuster eine solche Funktion nahelegt. Dies sind im wesentlichen:

- Hydrolasen: Chitinasen,  $\beta$ -1,3-Glucanasen und Proteinasen
- Enzym-Inhibitoren: Proteinase-Inhibitoren
- Toxische Proteine: Thionine, Lectine, Ribosomen-inaktivierende Proteine
- PR-Proteine: Proteine mit Beziehung zum Resistenzgeschehen<sup>4</sup>

#### **Hydrolasen**

Hydrolasen sind Enzyme, die Polymere unter Wasseraufnahme spalten. Chitinasen zerlegen das Kohlenhydratpolymer Chitin, während die  $\beta$ -1,3-Glucanase das  $\beta$ -1,3-Glucan hydrolytisch spaltet. Diese beiden Polymere sind wesentliche Gerüstsubstanzen vieler phytopathogener Pilze (Huub und Linthorst 1991), weshalb man schon lange vermutet, dass die Chitinasen und Glucanasen der höheren Pflanzen mit der Pilzabwehr zu tun haben.

Die Überexpression von Hydrolasen, insbesondere von Chitinasen, war eine der früh verwirklichten Strategien in der molekularen Pilzresistenzzüchtung. Positive Resultate erzielten Broglie et al. (1991) mit der konstitutiven Expression einer Bohnenchitinase in *N. tabacum* und *Brassica napus*. In beiden Fällen war die Resistenz der Transgenen gegenüber *Rhizoctonia solanum* erhöht. Lin et al. (1995) gelang es, eine endogene Chitinase unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors in einer *Indicaris*-Linie zu überexprimieren. Der Grad der Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* war mit dem Expressionsniveau der Chitinase gekoppelt. Neuhaus et al. (1991) konnten keine Steigerung der Resistenz von *N. sylvestris* gegen *Cercospora nicotianae* durch die Überexpression einer tabakeigenen Chitinase feststellen.

Mauch et al. (1988) zeigten, daß eine Kombination aus Chitinase und  $\beta$ -1,3-Glucanase (aus *Pisum sativum*) das Wachstum chitin-glucan-haltiger Pilze *in vitro* auch dann hemmen konnte, wenn eine Hydrolase alleine keine Wirkung zeigte. Van Den Elzen et al. (1993) gelang dementsprechend die Erhöhung der *Fusarium oxysporum*-Resistenz von Tomaten durch eine gleichzeitige konstitutive Expression von Tabak-Chitinase und -Glucanase. Zhu et al. (1994) haben zwei *N. tabacum*-Linien mit je einer Reis-Chitinase und einer Luzerne-Glucanase transformiert und die Transgenen dann klassisch gekreuzt. Die Hybriden (T2), heterozygot für beide Loci, waren *Cercospora nicotianiae*-resistenter als die beiden jeweils für eines der Gene homozygoten Elternlinien. Doppelt homozygote Linien (T3) hemmten die Pilzentwicklung am stärksten. Über eine

synergistische Wirkung von mehreren antifungalen Proteinen berichten auch Leah et al. (1991) und Jach et al. (1995).

### **Enzym-Inhibitoren**

Pflanzeigene Enzym-Inhibitoren können die Enzyme von Schaderregern hemmen und somit ganz allgemein bestimmte physiologische Abläufe dieser Erreger stören (vgl. Laskowski und Kato 1980).

Der Schadpilz *Fusarium moniliforme* der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) produziert das Enzym  $\alpha$ -1,4-D-Polygalacturonidase, welches die Auflösung der  $\alpha$ -1,4-D-Polygalacturonane der Bohnenzellwände katalysiert. Die Bohne wiederum verfügt über ein zellwandgebundenes Polygalacturonidase-inhibitierendes Protein (PGIP) mit der Fähigkeit, das Pilzenzym zu hemmen. Die Galacturonidase ermöglicht *F. moniliforme* zwar die leichtere Besiedlung der Bohne, sie führt aber auch zu Bildung von Oligogalacturoniden, die den pflanzlichen *defense*-Mechanismus aktivieren. Ist die Galacturonidaseaktivität und -menge hoch, so werden diese Oligogalacturonide schnell zu noch kleineren Bruchstücken zerlegt, die keine Elicitorfunktion mehr haben. Troubart et al. (1992) klonierten ein PGIP aus *P. vulgaris* und vermuten, dass dieses PGIP die Aktivität des Pilzenzyms *in vivo* so reguliert, dass der Spiegel von Oligogalacturoniden ständig hoch genug ist, um die pflanzliche Abwehr aktiv zu halten (Cervone et al. 1993 S. 64). Dieses Beispiel führt die ausserordentliche Komplexität mancher Resistenzmechanismen vor Augen. Transformationsexperimente stehen noch aus.

Die Funktion von Proteinase-Inhibitoren (PI) in der Pilzabwehr ist bis jetzt nicht völlig klar, obwohl die Pathogeninduzierbarkeit der PI-Genexpression verschiedentlich festgestellt wurde (Bowles 1990, Pearce et al. 1991). Ausserdem gibt es Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen von PIs in der Pflanze und ihrem Resistenzstatus. So fanden Yamaleev et al. (1980, zitiert bei Xavier-Filho und Campos 1989) eine starke positive Korrelation zwischen dem endogenen Trypsin-Inhibitor-Niveau von 180 Weizensorten und der Resistenz gegenüber *Tilletia caries*.

### **Fungitoxische Proteine (RIPs, Lectine, Thionine)**

Ribosomen-inhibitierende Proteine (RIPs) unterbinden die *de novo* Synthese von Proteinen, in dem sie die dafür zuständigen Ribosomen inaktivieren. Pflanzeigene Ribosomen werden allerdings nicht angegriffen. RIPs können die Proteinsynthese eindringender Pilze hemmen und damit weiteres Hyphenwachstum verhindern. Es gibt ein- und zweikettige RIPs (Strittmatter und Wegener 1993).

Leah et al. (1991) fanden in Gerstensamen ein einkettiges RIP mit *in vitro* antifungaler Wirkung, welches durch Zugabe einer Chitinase und einer Glucanase, beide ebenfalls aus Gerstensamen, synergistisch verstärkt wurde. Die Autoren vermuten, dass die Zellwände der Pilzhyphen durch die Hydrolasen permeabel werden und die RIP-bedingte Wachstumshemmung sich verstärkt, weil die RIPs leichter in die Hyphen eindringen können.

Logemann et al. (1992) brachten ein RIP aus Gerstensamen unter die Kontrolle des wundinduzierten Promotors *wun1* aus Kartoffeln (Siebertz et al. 1989) und transformierten mit diesem Konstrukt eine Tabaklinie, die daraufhin erhöhte Resistenz gegen *Rhizoctonia solani* zeigte.

Die Castorbohne (*Ricinus communis*) enthält das hochcytotoxische Ricin, das noch nicht genau bekannte Funktionen bei der Abwehr von chitinhaltigen Pilzen hat (Chrispeels und Raikhel 1991). Ricin hat neben der RIP-Untereinheit auch eine galactosespezifische Lectinuntereinheit.

Lectine sind Proteine, die mit jeweils hoher Spezifität an Kohlenhydrate binden (vgl. Chrispeels und Raikhel 1991). Broekaert et al. (1989) berichten von der sehr starken Wirkung eines Lectins mit chitinbindender Domäne aus Brennesselrhizomen (*Urtica*) gegen *Botrytis cinerea*. Die Autoren schlagen vor, krankheitsanfällige Kulturpflanzen mit diesem Lectin zu transformieren.

Einen Überblick über die Rolle der Thionine bei Abwehrreaktionen der Pflanze geben Garcia-Olmedo et al. (1994 S. 283 ff). Thionine sind kleine basische, cysteinreiche Proteine, die bisher überwiegend in verschiedenen Getreidearten gefunden wurden, und zwar sowohl in Blättern als auch in Samen (Florack et al. 1994). Die Thioninsynthese kann durch Pilzbefall induziert werden, ihre antifungale Wirkung ist *in vitro* erwiesen. Die toxische Wirkung der Thionine beruht vor allem auf ihrer Fähigkeit, Membranen zu zerstören (Bohlmann und Apel 1991, vgl. auch Molina et al. 1993). Florack et al. (1994) exprimierten Thionine aus der Gerste in Tabak, allerdings haben sie die Pilzresistenz der Transgenen *in vivo* nicht untersucht. Bohlmann (1994) schätzt die Möglichkeiten zur Erhöhung der Krankheitsresistenz durch gentechnische Manipulation von Thioninen im Prinzip als vielversprechend ein.

### 1.1.3 PR-Proteine: "Pathogenesis-related"

PR-Proteine werden definiert als Polypeptide der *host*-Pflanze, die nach Pathogenbefall oder verwandtem Stress synthetisiert werden und die in der gesunden Pflanze nicht vorliegen (Cutt and Klessig 1994 S. 211). Als PR-Proteine werden hier nur Proteine noch unbekannter Funktion bezeichnet, die mit der pflanzlichen Reaktion auf Pilzbefall zu tun haben (vgl. Bowles 1990).

Dudler et al. (1994) beschreiben die antifungale Aktivität von Thaumatin-ähnlichen PR-Proteinen. Die Expression des *in vitro* antifungalen *wir2*-Gens, das für ein extrazellulär lokalisiertes thaumatinähnliches Protein codiert, wird im Moment unter der Kontrolle eines pilzinduzierten Promotors im homologen System *Triticum aestivum* getestet (Clausen 1995, Botanisches Institut der Universität Zürich, Abteilung Cytologie, mündl. Auskunft).

Alexander et al. (1993) berichten von der erhöhten Resistenz transgener Tabak-Linien, die ein endogenes PR1-Gen überexprimieren, gegen die Oomyceten *Peronospora tabacina* und *Phytophthora parasitica*.

### 1.1.4 Andere Proteine

Cornelissen und Melchers (1993) zufolge werden in dieser Gruppe verschiedene Proteine zusammengefasst, deren antifungale Aktivität *in vitro* nachgewiesen werden konnte, die aber nicht nur als Reaktion auf Pathogenbefall gebildet werden und deshalb definitionsgemäß keine PR-Proteine sind (vgl. 2.1.3) Hierzu gehört ein unter anderem salzinduziertes Osmotin, welches das Wachstum des Oomyceten *Phytophthora infestans in vitro* hemmt (Woloshuk et al. 1991). Liu et al. (1994) überexprimierten Osmotin in Kartoffeln und stellten fest, dass die Symptombildung nach Pilzinfektion verlangsamt war.

Terras et al. (1992) beschreiben zwei neue Klassen von antifungalen Proteinen aus *Raphanus sativus*. Zwei kleine basische cysteinreiche Proteine mit breiter und sehr stark antifungaler Wirkung bilden die erste Klasse. In der zweiten Klasse finden sich die Speicheralbumine von *Raphanus*, deren pilzhemmende Wirkung bisher unbekannt war.

## 1.2 Phenolische Substanzen und Phytoalexine

### 1.2.1 Lösliche Phenole

Lösliche Phenole liegen im Pflanzenreich praktisch ubiquitär vor. Einige werden konstitutiv gebildet und tragen offensichtlich zur *non-host* Resistenz bei. In vielen Fällen konnte eine schnelle Akkumulation von Phenolen am Infektionsort beobachtet werden, die das Pilzwachstum vorläufig hemmt und der spezifischere, aber auch langsamere "Sekundärreaktionen" wie die Bildung von Phytoalexinen folgen. (Nicholson und Hammerschmid 1992)

### 1.2.2 Lignin und polymere Phenole

Lignin ist ein kompliziert aufgebautes Polymer aus phenolischen Komponenten, dessen Funktion bei der Pilzabwehr der Pflanze schon lange vermutet wird. Pilzliche Substanzen können als Elicitoren wirken, das heisst sie induzieren die Ligninbildung. Dies trifft für die Oligomere der Galacturonide (vgl. 1.1.2.) ebenso zu wie für Chitin. Chitin ist ein wesentlicher Bestandteil der meisten Schadpilze; es hat als isolierte Komponente allerdings nur dann Elicitorfunktion, wenn das Blattgewebe vorher verwundet wurde (Walter 1992 S. 333f.), wie es der realen Situation bei beginnendem Pilzbefall entspricht.

Vance und Sherwood (1976) erklären die *non-host*-Resistenz in der Grasart *Phalaris arundinacea* gegen den Haferpilz *Helminthosporium avenae* mit einer Lignifizierung der Epidermiszellwände.

Moerschbacher et al. (1990) fanden bei *Puccinia graminis*-resistenten Genotypen von Weizen (*Triticum aestivum*), dass eine spezifische Hemmung von Schlüsselenzymen der Lignin-Biosynthese (PAL und CAD) die Anzahl nekrotischer Weizenzellen stark vermindert. Diese Nekrosebildung verhindert in den unbehandelten Kontrollen, dass der Pilz im Blattgewebe weiterwachsen kann<sup>5</sup>. Das Resultat belegt eine direkte Rolle der Lignifizierung in der Rostresistenz dieser Weizensorten.

### 1.2.3. Phytoalexine

Phytoalexine sind antimikrobielle Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht, die in Pflanzen als Reaktion auf einen Kontakt mit Mikroorganismen gebildet und akkumuliert werden (VanEtten et al. 1989).

Im System *Pisum sativum*/*Nectria haematococca* wurde zum erstenmal ein Zusammenhang zwischen der Phytoalexin-Toleranz eines Pilzes und seiner Pathogenizität nachgewiesen (Schäfer et al. 1989). *N. haematococca* besitzt das Enzym Pisatindemethylase, welches das Phytoalexin Pisatin der Erbse (*Pisum sativum*) entgiftet. Infolgedessen kann *N. haematococca* auf Erbsenblättern wachsen. Indem die Autoren ein Maispathogen mit der Pisatin-Demethylase transformierten, machten sie es zum Erbsenpathogen. Damit ist die Rolle des Pisatins als *defense*-Faktor eindeutig bewiesen; ausserdem wird deutlich, warum Pathogene oft weniger tolerant gegenüber den Phytoalexinen von *non-host* Familien sind: es fehlen ihnen die Entgiftungsmechanismen für die *defense*-Faktoren der "fremden" Pflanzen.

Deshalb erscheint die Übertragung von "Fremd"-Phytoalexinen zur Resistenzsteigerung attraktiv (Lamb et al. 1992), wobei die komplizierten Synthesewege und die geringe Anzahl klonierter Schlüsselenzyme ebenso ernsthafte Hindernisse darstellen wie die häufige Phyto- und Vertebraten-Toxizität der Phytoalexine (Dixon et al. 1994).

Von einer Ausnahme<sup>6</sup> berichten Hain et al. (1993): Reben (*Vitis vinifera*) bilden Resveratrol, ein antifungales Phytoalexin aus der Stilben-Gruppe. Zur Stilben-Biosynthese sind als spezifische Enzyme lediglich Stilben-Synthasen erforderlich. Als Ausgangsprodukte dienen Malonyl-CoA und p-Coumaroyl-CoA, die beide in Pflanzen generell und häufig vorkommen. Hain et al. (1993) isolierten zwei Stilben-Synthase-Gene aus Reben und übertrugen sie unter der Kontrolle eines pathogeninduzierbaren

Promotors in *N. tabacum*. Die Synthese von Stilben im transgenen Tabak führte zu einer erhöhten Resistenz gegenüber *Botrytis cinerea*.

### 1.3 Echte Resistenzgene

Im Gegensatz zu den bis jetzt diskutierten antifungalen Substanzen werden die echten oder rassenspezifischen Resistenzgene nicht nach ihrem Genprodukt, sondern aufgrund ihrer Wirkungsweise klassifiziert. Die verwendeten Begriffe und die ihnen zugrundeliegende Modellvorstellung gehen auf Flors Gen-für-Gen-Hypothese zurück (Flor 1956). Das Resistenzgen der Pflanze bildet mit dem Avirulenzgen des Pilzes ein Paar. Man geht davon aus, dass das Avirulenzgen einen spezifischen Elicitor produziert, den das Resistenzgen "erkennt" (Staskawicz et al. 1995). Das Resistenzgen löst daraufhin in der Regel die hypersensitive Reaktion (HR) aus. Der HR folgt die Deposition von Kallose, Lignin, hydroxyprolinreichen Glycoproteinen sowie die Akkumulation von Glucanasen, Chitinasen und PR-Proteinen in und am Rande der Läsionen. Inwieweit die HR tatsächlich die Ursache des gestoppten Pilzwachstums darstellt, ist Gegenstand wissenschaftlicher Kontroversen; erwiesen ist aber, dass die HR und das aufgehaltene Hyphenwachstum phytopathogener Pilze eng korreliert sind. Es gibt viele Resistenzgene, die zwar (populations-)genetisch gut untersucht sind, deren Genprodukte aber völlig unbekannt sind. In der klassischen Pflanzenzüchtung ist die Arbeit mit ausschliesslich genetisch charakterisierten Resistenzgenen die Regel. Ein Beispiel geben Schachermayr et al. (1994): Das Braunrostresistenzgen *Lr9* wurde in Weizen (*Triticum aestivum*) durch eine Kreuzung mit *Aegilops umbellulata* eingeführt. Daraufhin wurde in vielen Rückkreuzungsgenerationen zum *T. aestivum*-Elter versucht, möglichst grosse Teile des *Ae. umbellulata* Genoms wieder loszuwerden. Die Überprüfung der schliesslich erhaltenen braunrostresistenten *T. aestivum*-Linien ergab, dass keine unerwünschten *Aegilops*-Merkmale mehr zu finden waren. Dieses Vorgehen ist typisch für die klassische Pflanzenzüchtung (vgl. Baum et al. 1992) und hat sich in bewährt, obwohl in einigen Fällen in der Folge von Resistenzübertragungen auch Nachteile (Verminderung des Ertrages oder der Backqualität) in Kauf zu nehmen waren. Seine Handhabbarkeit wird durch das Auffinden von genetischen Markern in Zukunft deutlich verbessert werden (Schachermayr et al. 1994).

Das erste Resistenzgen<sup>7</sup>, welches kloniert<sup>8</sup> werden konnte, ist das Gen HM1 aus *Zea mays*. Der Pilz *Cochliobolus carbonum* Nelson Rasse 1 produziert das sogenannte HC-Toxin, das zur kompatiblen Interaktion mit *Zea mays* führt. Johal und Briggs (1992) berichten, dass das HM1-Gen *cochliobolus*-resistenter Maisgenotypen für eine HC-Toxin-Reduktase kodiert, also für ein Enzym, welches das HC-Toxin inaktiviert (vgl. auch Meeley et al. 1992).

Dangl (1995) gibt einen Überblick über alle bis jetzt klonierten pflanzlichen Resistenzgene: es handelt sich um ein Gen für Virusresistenz<sup>9</sup> (Whitham et al. 1994), zwei Gene für Bakterienresistenz<sup>10</sup> (Martin et al. 1993; Bent et al. 1994 und Mindrinos et al. 1994) und zwei weitere für Pilzresistenz (Jones et al. 1994, Ellis et al. 1995).

Jones et al. (1994) konnten das *Cf-9* Resistenzgen der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) klonieren. Es bildet mit dem korrespondierenden Avirulenzgen *Avr9* des Pilzes *Cladosporium fulvum* eines der "Paare", die gemeinsam in der Pflanze eine hypersensitive Reaktion auslösen. Aus der DNA-Sequenz des Resistenzgens schliessen die Autoren, dass es sich beim *Cf-9*-Produkt vermutlich um ein zellmembrangebundenes extracytoplasmatisches Glycoprotein handelt. Das Vorliegen von leucin-reichen Wiederholungen (LRRs) deutet darauf hin, dass das *Cf9*-Produkt Rezeptorfunktionen für Proteinliganden hat, und zwar sehr wahrscheinlich für das *Avr9*-Peptid. Die Bindung des *Avr9*-Peptides an das *Cf-9*-Protein könnte demnach zur

Auslösung der hypersensitiven Reaktion (HR) führen; über mögliche Signalmechanismen des Cf-9-Proteins herrscht aber bis jetzt Unklarheit.

De Wit (1992) schlägt vor, die zwei Komponenten, die gemeinsam eine HR auslösen können, auch zusammen in die Zielpflanze zu bringen. Dies wären beispielsweise der spezifische Elicitor Avr9 und der spezifische Rezeptor Cf-9. Das Avirulenzgen Avr9 soll unter die Kontrolle eines Promotors gebracht werden, der ausschliesslich durch phytopathogene Pilzen induziert werden kann: bei Befall würde das Avr9-Peptid exprimiert, vom Cf9-Produkt "erkannt" und gemeinsam würden sie daraufhin den hypersensitiven Zelltod auslösen.

#### 1.4 Andere Ansätze zur Erhöhung der Pilzresistenz

Strittmatter und Wegener (1993) beschreiben einen in ihrem Labor verfolgten Ansatz: Sie wollen ein RNase-codierendes bakterielles Gen, *Barnase*, mit einem schnellen, spezifischen Promotor koppeln. Die exprimierte RNase soll dann zum Tod der befallenen Zellen führen. Quasi zur Sicherheit soll das RNase-hemmende *Barstar*-Gen gleichzeitig konstitutiv exprimiert werden, so dass es nur zum Zelltod kommt, wenn der *Barnase*-Level den *Barstar*-Level übersteigt. Zwei transgene Kartoffellinien mit diesem System werden momentan untersucht.

Apel (1995, mündliche Information) schlägt vor, ein kürzlich entdecktes Enzym der Chlorophyllsynthese in grünen Pflanzen, das Protochlorophyllid-reduzierende Enzym POR B, durch ein antisense-construct zu inaktivieren. Damit soll erstens die Chlorophyllsynthese unterbunden und die ständige Nachlieferung von Chlorophyll an die zwei Photosysteme gestoppt werden. Zweitens werden in POR B-Mangel-Blättern die über Nacht akkumulierten Protochlorophyllide anderntags unter Lichteinfluss nicht reduziert. Im angeregten Zustand sollten sie dann cytotoxische freie Radikale bilden, die zum Zelltod führen. Auch dieser Ansatz hängt von der Verfügbarkeit eines streng pilzregulierten Promotors ab.

## 2. Biochemische Grundlagen der klassischen und molekularen Züchtung auf Insektenresistenz

Die Terminologie der Resistenzmechanismen gegen Insekten unterscheidet sich wesentlich von derjenigen bei Pflanze/Pilz-Interaktionen und wird darüberhinaus nicht einheitlich gehandhabt (vgl. hierzu Fritzsche et al. 1987, S. 27ff.).

Die *Non-host*-Resistenz, gegenüber Insekten auch Immunität genannt, ist der Normalfall und bezeichnet das Phänomen, dass eine Art für die überwiegende Mehrheit der pflanzenfressenden Insekten nicht attraktiv ist. Zur Charakterisierung der zugrundeliegenden Pflanzeigenschaften werden die Begriffe Antixenose (Gastfeindlichkeit), die meist zur Nichtpräferenz auf Seiten des Insekts führt, und Antibiose (die Biologie des Insektes wird nach Kontakt beeinträchtigt) verwendet. Eine experimentell klar begründbare Unterscheidung zwischen beiden Begriffen ist nicht immer gegeben (Smith 1989 S. 13). Im Folgenden werden deshalb alle Substanzen, die mit der pflanzeigenen Insektenabwehr korreliert sind, als *defense*- oder Resistenzfaktoren bezeichnet, und zwar unabhängig vom Typ ihrer Interaktion mit dem Insekt.

Grundsätzlich entscheiden sowohl morphologische als auch biochemische Faktoren darüber, ob und in welchem Masse ein Insekt zum Schädling der betrachteten Pflanze wird. In Bezug auf die *Lebensmittelsicherheit* sind vor allem biochemische Mechanismen von Interesse; morphologischen Resistenzfaktoren können sich aber sehr wohl auf die *Lebensmittelqualität* auswirken.

Von folgenden chemischen Gruppen ist eine *in vivo* Wirkung gegen Insekten bekannt:

- Zucker und Kohlenhydrate
- Aminosäuren und Proteine
- Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe
- Toxine aus *Bacillus thuringiensis*

## 2.1 Zucker und Kohlenhydrate

Primäre Pflanzeninhaltsstoffe beziehungsweise die relativen Mengenverhältnisse, in denen sie vorliegen, können mitverantwortlich für die Ausbildung bestimmter Insektenresistenzen sein; zumindest beeinflussen sie aber die Vorlieben der Insekten. Saccharose ist ein allgemein wirkendes, starkes Frassstimulans (Fritzsche et al. S.130 ff.). Die Rolle von Zuckern bei der Insektenabwehr beschränkt sich auf ihre Beteiligung an der Glycosidbildung.

Die Veränderung des Zucker/Kohlenhydratstoffwechsels zur Erhöhung der Insektenresistenz wird unseres Wissens nach in Zuchtprogrammen nicht verfolgt.

## 2.2 Aminosäuren und Proteine

### 2.2.1 Aminosäuren und primäre Speicherproteine

Bestimmte Aminosäuren fördern die Wirtseignung von Pflanzen. Die Resistenz der Erbsensorte "Laurier" gegenüber *Acyrtosiphon pisum* beruht auf einer niedrigeren Gesamtkonzentration an Aminosäuren, die ausserdem in anderer Zusammensetzung vorkommen als bei der anfälligen Kontrollsorte "Perfection" (Smith 1989 S. 61). Beim Reis liegen die Verhältnisse umgekehrt: *Orseolia oryzae* resistente Sorten wie "Shakti" haben einen höheren Gehalt an freien Aminosäuren (und eine niedrigere Zuckerkonzentration) als die untersuchten anfälligen Reissorten (Fritzsche et al. 1987 S. 143).

Nachgewiesene *defense*-Wirkung haben auch die toxischen Aminosäuren in den Samen von Leguminosen. So besitzt beispielsweise die Nicht-Protein-Aminosäure L-Canavanin aus *Dioclea megacarpa* Abwehrwirkung gegen verschiedene Schadinsekten (Fritzsche et al. 1987 S. 124).

Ein hoher Gehalt an unverdaulichem Klebereiweiss bei Weizensorten führt im Darmtrakt von *Eurygaster integriceps* zur Anhäufung von Amylasen und verleiht den Sorten eine (Teil-) Resistenz gegen diesen Schaderreger (Fritzsche et al. 1987 S. 142).

### 2.2.2 Lectine

Lectine, die in Pflanzen sehr häufig vorkommen und bis zu 10% des Gesamtstickstoffs im Samen ausmachen können, haben offensichtlich auch Funktionen in der Insektenabwehr. Huesing et al. (1991) fanden bei Lectinen aus Weizenkeim, Reis und Brennesseln (*Urtica dioica*) eine toxische Wirkung auf *Callosobruchus maculatus*. Die stark antifungalen Lectine aus *Urtica dioica* besitzen offenbar die geringste Aktivität gegen Insekten, während das Weizenlectin sich als stark insektizid, aber nicht antifungal erwies (vgl. hierzu auch Broekaert et al. 1989). Huesing et al. (1991) schlagen die Transformation der Leguminose *Vigna unguiculata* mit dem lectin codierenden Gen aus Weizen oder Reis vor, um ihre Resistenz gegen *C. maculatus* zu erhöhen.

### 2.2.3 Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren können ebenfalls bis zu 10% des Gesamtstickstoffs in den Samen und Speicherorganen von Pflanzen binden. Meist greifen sie die endogenen Proteasen nicht an, sondern wirken spezifisch gegen proteolytische Enzyme von Schaderregern. Nach mechanischer Verwundung des Pflanzengewebes werden die endogenen Protease-Inhibitoren akkumuliert. Es gibt vier Klassen von proteolytischen Enzymen, und zwar Serin-, Cystein-, Aspartic- und Metallo-Proteasen. Die meisten bekannten Inhibitoren hemmen Serin-Proteasen, wozu auch die bekannten Enzyme Trypsin, Chymotrypsin und Elastase gehören (Strittmatter and Wegener 1993). Hilder et al. (1987) transformierten Tabak mit einem Trypsin-Inhibitor aus *Vigna unguiculata*. Der transgene Tabak zeigte daraufhin erhöhte Resistenz gegen den Tabakschädling *Heliothis virescens*.

Bei *V. unguiculata* selber ist die Resistenz gegen *C. maculatus* korreliert mit der endogenen Konzentration an Trypsin-Inhibitoren. Dieselbe Pflanze, *V. unguiculata*, ist Quelle für ein Trypsin-Inhibitor-Gen und wäre Genempfängerin im Falle der von Huesing et al. (s. 3.2.2.) vorgeschlagenen Transformation mit einem Gramineen-Lectin. Beide Gene sind/wären im Kontext von *V. unguiculata* defense-Faktoren gegen *C. maculatus*. Es gibt also mindestens zwei Methoden zur Resistenzerhöhung bei *V. unguiculata*, darunter eine klassische, wie die vorliegende Variabilität im Trypsin-Inhibitor-Gehalt und die resultierende Variation in der Toleranz gegen *C. maculatus* belegen.

Das Beispiel verdeutlicht noch etwas anderes: Der Trypsin-Inhibitor aus *V. unguiculata* wirkt gegen ein breites Spektrum an Insekten: *H. virescens* gehört zu den Lepidopteren, während *C. maculatus* eine Käferart ist. Hilder et al. (1987) sehen in dieser Breitenwirkung den grössten Vorteil der Protease-Inhibitoren, der sie insbesondere im Vergleich mit den hochspezifischen Bt-Toxinen auszeichnet.

Thomas et al. (1994) stellten fest, dass gegen die wirtschaftlich bedeutenden Luzerneschädlinge *Hypera postica* und *Lygus* ssp. keine Bt-Toxine zur Verfügung stehen. Deshalb führten sie einen Elastase-Inhibitor aus der Insektenart *Manduca sexta* in Luzerne ein und wiesen nach, dass das Insektenprotein in Luzerne stabil und heritabel exprimiert wurde. Prüfungen der Resistenzeigenschaften stehen noch aus.

#### 2.2.4 $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren

Eingelagerte Samen der gemeinen Bohne sind resistent gegen die Vorratsschädlinge *C. maculatus* und *C. chinensis*, während Erbsen (*Pisum sativum*) hochanfällig sind. Shade et al. (1994) isolierten ein  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor-Gen aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) und transferierten es in *P. sativum*. Die Erbsensamen exprimierten den  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor in Anteilen von bis zu 1,2% des Gesamtproteins; sie waren alle hochresistent gegen *C. chinensis* und bei ausreichendem Expressionsniveau auch relativ resistent gegen *C. maculatus*.

Auf dem Feld sind die reifenden *P. sativum*-Samen unter anderem durch *Bruchus pisorum* gefährdet. Schroeder et al. (1995) brachten eine ebenfalls aus *P. vulgaris* stammende cDNA, die auch für einen  $\alpha$ -Amylase-Inhibitor codiert, unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors in *P. sativum* ein. Der Inhibitor machte bis zu 3% des löslichen Gesamtproteins in den Erbsensamen aus. Die Transgenen wurden von *B. pisorum* kaum geschädigt.

### 2.3. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Die Insektenresistenz beruht bei vielen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen auf Allelochemikalien<sup>11</sup> des Sekundärstoffwechsels. Darunter finden sich etliche Substanzen, die toxikologisch relevanten Gruppen entstammen.

Einen unspezifischen Ansatz zur Erhöhung des Resistenzniveaus gegen Insekten verfolgten Smigocki et al. (1993). Sie brachten ein bakterielles Isopentenyltransferase-Gen (ipt) unter die Kontrolle eines wundinduzierten Promotors und transformierten *Nicotinia plumbaginifolia* damit. Ipt spielt eine wesentliche Rolle im Cytokininstoffwechsel; die transgenen *N. plumbaginifolia*-Pflanzen waren gegenüber *M. sexta* und *M. persicae* wesentlich widerstandsfähiger als die untransformierten Kontrollen. Smigocki et al. gehen davon aus, dass der erhöhte Cytokinin-Level der Transgenen den Sekundärmetabolismus beeinflusst hat, und daraufhin vermehrt unbekannte insektentoxische Substanzen produziert wurden.

Ein anderes Beispiel geben Steffens et al. (1994); sie haben eine Polyphenoloxidase in Tomaten überexprimiert bzw. per Antisensekonstrukt unterdrückt. Phenoloxidasen katalysieren die Bildung von insektentoxischen Quinonen aus einfachen Phenolen. Eine tomatenadaptierte Varietät von *Leptinotarsa decemlineata* wurde mit Blättern der Transgenen gefüttert. Die Sterblichkeitsrate der Larven war auf den Überexpressions-Pflanzen am höchsten, deshalb kann man davon ausgehen, dass die überexprimierten Phenoloxidasen den Quinonspiegel wirksam erhöht haben. Abgesicherte Resultate zur Feldresistenz stehen noch aus.

Mit der Klonierung von weiteren Schlüsselenzymen des Sekundärstoffwechsels wird der Handlungsspielraum der Biotechnologie vergrößert. Prinzipiell kann aber auch die klassische Züchtung die sekundären Inhaltsstoffmuster verändern, und zwar bei Vorliegen einer ausreichenden Variabilität innerhalb der Art durch Selektion, bei Fehlen dieser Variationsbreite durch "weite Kreuzungen" beziehungsweise interspezifische Hybridisierungen.

Die sekundären Inhaltsstoffe der landwirtschaftlichen Nutzpflanzen lassen sich in drei Gruppen einteilen:

- Terpene und Steroide
- Acetogenine und Phenylpropane
- Alkaloide

Für jede der drei Gruppen werden züchterisch relevante Beispiele aufgezeigt.

### 2.3.1 Terpene

Bei weissblütigen Baumwollsorten ist das Triterpen Gossypol ein wichtiger Resistenzfaktor gegen *Heliothis zea*.<sup>12</sup> Gleichzeitig ist Gossypol massgeblich dafür verantwortlich, dass der Baumwollsamens nicht als Nahrungsmittel genutzt werden kann (Fritzsche et al. 1987). Bei vielen rotblühenden Sorten ist der Gossypolgehalt gering, obwohl sie einen ähnlichen Grad an Resistenz gegen *Heliothis*-Arten besitzen wie die weissblütigen Sorten. Das Chrysanthem (Cyanidin-3- $\beta$ -Glycosid) sorgt bei diesen Sorten sowohl für die Rotfärbung als auch für die Insektenresistenz, deshalb schlagen die Autoren die Züchtung agronomisch wertvoller rotblütiger Baumwollsorten vor, die zusätzlich der Human- und Tierernährung dienen könnten. Die Lebensmittelsicherheit von Chrysanthem müsste aber zunächst geprüft werden.

Gunasena et al. (1988) untersuchten die synergistische Wirkung von Gossypol und Caryophyllene-Oxid auf *H. virescens* und kommen zu dem Schluss, dass geringe Dosen beider Stoffe das Larvenwachstum stimulieren, während hohe Dosen es hemmen oder unmöglich machen.

### 2.3.2 Phenole

Über den Acetogenin- sowie der Phenylpropanstoffwechsel können Pflanzen aromatische Verbindungen herstellen. Die einfachen Phenolsäuren werden hauptsächlich zum Aufbau von Lignin verwendet und sind somit den morphologischen *defense*-Faktoren zuzurechnen; bei einigen wurde aber auch eine direkte

Abwehrwirkung nachgewiesen. Die Entwicklung der Getreideblattlaus *Schizaphis graminum* wird durch p-Cumarsäure, Kaffeesäure und Chlorogensäure stark gehemmt (Heinicke 1979 zit b. Fritzsche 1987). Der cis-0-Cumarsäureabkömmling Cumarin mit seiner abschreckenden Wirkung auf *Oscinella frit*, *Sitona cylindricollis*, *Listroderes costirostris obliquus* und andere ist in Gräsern nur in geringem Masse konstitutiv exprimiert, ist aber wundinduzierbar. Heinicke (1979) schlägt eine züchterische Erhöhung des Cumaringehaltes in Getreide vor, weist aber auf dessen säugertoxische Potenz hin.

### 2.3.3 Alkaloide und Senföle

Alkaloide sind basische Verbindungen mit mindestens einem meist heterozyklisch eingebauten Stickstoffatom. Unter den allgemein bekannten Alkaloiden besitzt das Nicotin aus *Nicotiana* eine eindeutig insektizide Wirkung. Für *Myzus persica* ist Nicotin extrem giftig, ihre Sterberate auf *Nicotiana glauca* ist direkt mit dem Nicotiningehalt in den Drüsenhaaren korreliert (Fritzsche et al. 1987 S. 123). Auch viele andere Insektenarten überleben die Aufnahme von Nicotin nicht; dementsprechend werden in der Landwirtschaft insektizide Tabakextrakte seit langem als Pflanzenschutzmittel verwendet.

Die verschiedenen Alkaloidmuster nahe verwandter, kreuzbarer Arten sind eine Quelle genetischer Variabilität, die für die klassische Resistenzzüchtung besonders interessant ist. Kuhn und Gauhe (1947) konnten nachweisen, dass die Resistenz der Wildkartoffel *Solanum demissum* gegen Kartoffelkäferlarven auf die Glycoalkaloide Demissin und  $\alpha$ -Tomatin zurückzuführen ist. Demissin und Tomatin können im Verdauungstrakt der Kartoffelkäfer nicht hydrolytisch aufgespalten werden. Die Kulturkartoffel, statt dessen hauptsächlich ausgestattet mit  $\alpha$ -Solanin,  $\alpha$ -Chaconin und dem Aglycon Solanidin, besitzt diese Kartoffelkäferresistenz nicht oder nur in geringem Masse.

Solanin und Chaconin sind aber offenbar von Relevanz bei Befall mit *Empoasca fabae*. In Kartoffelpopulationen (*Solanum tuberosum*), die mehrere Zyklen rekurrenter Selektion auf *E. fabae*-Resistenz durchlaufen hatten, wurden gegenüber der unselektierten Population verdoppelte Gehalte an Solanin und Chaconin festgestellt (Sanford et al. 1992).

Die Quinolizidin-Alkaloide, welche bis zu 5% des Samengewichtes von Lupinen ausmachen, sind humantoxisch und ihre Reduktion war deshalb langjähriges Ziel züchterischer Bemühungen: mit Erfolg. Die erhaltenen Süßlupinen sind allerdings gegenüber zahlreichen Pathogenen und Herbivoren so anfällig, dass ihr Anbau ohne Pestizide nur selten möglich ist (Wink 1988). Die Resistenz der Sorte "Bitter Blue" (*Lupinus angustifolius*) gegen *Macrosiphum euphorbiae* und *Sitona lineatus* beruht eindeutig auf ihrem Blattalkaloidgehalt (Fritzsche et al. S.193 f.).

Schwefelhaltige Senföle wie Thiole und Sulfide liegen in der Pflanze als Glycoside vor. Giftige Aglycone werden an Zucker gebunden und damit "sicher" gelagert. Das Senfölglycosid Sinigrin aus *Brassica ssp.* ist dafür ein Beispiel. Durch Hydrolyse dieses Allylglucosinolates entsteht Allylisoithiocyanat, das für *Papilio polyxenes* schon in geringsten Konzentrationen tödlich ist; Cruciferen gehören deshalb nicht zum Wirkkreis von *P. polyxenes* (Fritzsche et al. S. 138). Die Nahrungsspezialisten der Brassicaceen empfinden Sinigrin allerdings als Frassauslöser. Selbst in den sogenannten Doppelnull-Rapsorten, die aus toxikologischen Gründen auf erucasäure- und glucosinolat-"Freiheit" gezüchtet wurden, enthalten die Blätter noch soviel Glucosinolate, dass Lepopteren-Larven angezogen werden. Glucobrassicin, das Haupt-Indolylglucosinolat von *Brassica ssp.*, stimuliert *Pieris rapae* zur Eiablage (Ibrahim et al. 1994).

Eine Übersicht über dokumentierte antiinsektidale Substanzen gibt Tab.2.1.

## 2.4. Echte Resistenzgene

In der klassischen Genetik werden Resistenzgene nicht nach ihrem (meist unbekanntem) Produkt klassifiziert, sondern aufgrund ihrer Wirkungsweisen. Auf Erregerseite wird von verschiedenen Biotypen (wirtsspezifische Rassen) gesprochen (Smith 1989 S. 221 ff.)

Die Hessianfliege (*Mayetiola destructor*) ist das bestuntersuchte Beispiel der "Gen-für-Gen-Beziehung" zwischen einem Insekt und seiner Wirtspflanze (Smith 1989 S. 231). 13 bekannte Biotypen von *M. destructor* befallen den Weizen (*T. aestivum*), der 25 charakterisierte Resistenzgene besitzt (Dweikat et al. 1994). *T. turgidum* und *T. tauschii* dienten in vielen Fällen als Genquelle für die Züchtung; dabei wurde die unter 2.3 beschriebene Rückkreuzungsmethodik eingesetzt (Smith 1989 S. 207).

Es gibt zwar einige Hinweise auf morphologische/biochemische Faktoren, die mit der Resistenz gegenüber der Hessianfliege korreliert sind (Smith 1989 S. 4, 28, 30, 64, 140, 143), aber ob diese *defense*-Faktoren von den 25 genetisch charakterisierten Resistenzgenen codiert werden, ist noch nicht bekannt.

## 2.5. *Bacillus thuringiensis* als Genquelle

*Bacillus thuringiensis* (Bt) ist ein gram-positives, sporenbildendes Bodenbakterium. Seine verschiedenen Stämme bilden parasporale, kristalline Einschlüsse, aus denen im Verdauungstrakt der Insekten Proteine, die sogenannten  $\delta$ -Endotoxine, freigesetzt werden. Es handelt sich hierbei um grosse Protoxine, die durch insekteneigene Darmproteasen aktiviert werden. Die aktiven Toxine interagieren mit den Darmepithelzellen der Insekten und führen zur Zerstörung der Zellmembranen (Gill et al. 1992).

Die meisten Bt-Toxine zeigen Wirkung gegen Lepidopteren, es gibt jedoch auch Isolate mit Spezifität gegen Dipteren und Coleopteren.

Die erste erfolgreiche Pflanzentransformation mit einem Bt-Gen wurde von Vaeck et al. (1987) berichtet. Die Autoren transformierten *Nicotiana tabacum* mit verschiedenen modifizierten bt2-Chimären und erhielten eine ausgeprägte Resistenz gegen *Manduca sexta*.

Inzwischen wurden viele Kulturpflanzen mit Bt-Genen unterschiedlicher Spezifität transformiert. Fischhoff et al. (1987) berichten von der Transformation einer Tomatenlinie mit einem modifizierten Gen aus Bt var. *kurstaki* HD1 unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors. Sogar bei dem erreichten, relativ niedrigen Expressionsniveau konnte *Manduca sexta* nicht überleben. Die ökonomisch wichtigen Tomatenschädlinge *Keiferia lycopersicella* und *Heliothis zea* wurden signifikant dezimiert (Delannay et al. 1989). Eine Aktivität des Toxins wurde auch in den Früchten der Tomaten nachgewiesen.

Die kodierenden Bereiche der natürlichen Bt-Gene haben einen hohen Gehalt an den Nucleotiden A und T; dies führt zu einem niedrigen Expressionsniveau des Toxins in Pflanzen, deren Genom wesentlich G/C-reicher ist als das des Bakteriums. Perlak et al. (1991) transformierten Tomaten mit einem modifizierten *cryIA(b)* Gen aus Bt var. *kurstaki* HD-1 und fanden einen bis zu 100-fach höheren *CryIA(b)* Proteingehalt als in den Transgenen, die das Wildtypgen exprimierten. Perlak et al. (1990) übertrugen modifizierte Gene aus Bt var. *kurstaki* HD-1 (*cryIA(b)*) und HD-73 (*cryIA(c)*) in Baumwolle. Es wurde ein effektiver Schutz gegen *Heliothis zea* erreicht.

Kozziel et al. (1993) erhöhten den G/C-Gehalt des *cryIA(b)*-Gens von natürlicherweise ca. 38% auf 65%. Das Genprodukt ist gegenüber dem natürlichen Protoxin verkürzt. Seine Expression hängt vom gewählten Promotor ab; eine Kombination zweier homologer Promotoren führte zur Feldresistenz gegen die erste und zweite Generation von *Ostrinia nubilalis* (ECB) bei minimiertem *CryIA*-Proteingehalt in den Samen<sup>13</sup>.

### 3. Biochemische Grundlagen der klassischen und molekularen Züchtung auf Virusresistenz

Das Virusgenom besteht aus RNA oder DNA. Die meisten Pflanzenviren sind Träger eines einzelnen *messenger-sense*-RNA-Stranges. Diese kodieren für Proteine, die in ihre Vermehrung, Umhüllung und in ihren Transport von Pflanze zu Pflanze involviert sind.

Die klassischen Methoden der Virusbekämpfung sind, in Ermangelung antiviraler Spritzmittel, die Verwendung von virusfreiem Pflanzenmaterial, die Bekämpfung der Virusvektoren und die Feldauslese befallener Pflanzen. Eine "biologische" Strategie ist die sogenannte *cross protection*: die Pflanzen werden mit einem dem eigentlich gefährlichen Virus nahe verwandten, aber selbst harmlosen Virus infiziert. Es vermehrt sich in der Pflanze, die aber keine oder nur milde Symptome zeigt, und verleiht ihr Immunität gegenüber dem phytopathogenen Virus (vgl. Sayama et al. 1993).

Die konventionelle Züchtung gegen Virose muss auf pflanzeneigene *defense*-Gene zurückgreifen, während die gentechnischen Ansätze in der Regel mit Virussequenzen arbeiten. Die biochemische Basis der pflanzlichen Virusresistenz ist weitgehend ungeklärt. Bei Non-host-Immunität<sup>14</sup> scheinen aber Faktoren zu fehlen, die für das Virus essentiell sind. Bei sortenspezifischer Resistenz handelt es sich häufig um eine monogen vererbte Eigenschaft, die mit der Erkennung und Signaltransduktion zu tun hat (Fraser 1990). Die klassische Virusresistenzzüchtung wird vor allem durch einen Mangel an intraspezifischer Variabilität behindert (Hull 1994).

Manchmal ist eine vermeintliche Virusresistenz in Wirklichkeit eine Insektenresistenz: Bei einer Reissorte mit wirksamer Resistenz gegen die viröse Tungrokrankheit stellte sich als deren funktionelle Basis eine Resistenz gegenüber dem Vektor heraus (Hull 1994). Um tatsächlich die Virusresistenz zu steigern, stehen prinzipiell drei Möglichkeiten zur Verfügung (vgl. Fitch and Beachy 1993):

- Pflanzeneigene antivirale defense-Faktoren
- Echte Resistenzgene
- Transformation mit codierenden Sequenzen des viralen Genoms

#### 3.1 Defense-Faktoren der Pflanzen

Stübler und Buchenauer (1993 S. 455) berichten von verschiedenen pflanzeneigenen Virus-Inhibitoren, darunter beispielsweise von Lichenan, einem  $\beta(1-3,1-4)$ -D-Glucan aus *Cetraria islandica*. Auch eine Korrelation zwischen der Aktivierung des Schlüsselenzyms PAL (Phenylalanin Ammonium Lyase) und Virusresistenzen ist oft nachzuweisen (Stübler und Buchenauer 1993).

Heitz et al. (1993, S. 291) isolierten einen Proteinase-Inhibitor aus *N. tabacum*, der nach Tabakmosaikvirus (TMV)-Befall akkumuliert wird. In Tabak wurden auch TMV-induzierbare PR-Gene gefunden (Bol et al. 1993 S. 268), die ebensowenig wie der Proteinase-Inhibitor wundinduzierbar sind. Ob und welche kausalen Zusammenhänge mit der Virusresistenz vorliegen, ist bis jetzt aber nicht schlüssig geklärt. Eine gezielte Selektion auf diese *defense*-Faktoren ist nicht dokumentiert.

#### 3.2 Echte Resistenzgene

Das dominante TMV-Resistenzgen *N* wurde 1938 aus *N. glutinosa* in *N. tabacum* eingeführt und 1994 kloniert (Whitham et al. 1994). Die Sequenzanalyse zeigt, dass es sich beim N-Genprodukt um ein Protein von 131,4 kDa handelt, dessen aminoterminaler Domäne Ähnlichkeiten mit dem Toll-Protein aus *Drosophila* und dem Interleukin-1-Rezeptor der Säugetiere aufweist, und das ferner eine Nukleotid-

Bindungsstelle und vier unvollständige leucinreiche Wiederholungen enthält. Diese Struktur legt eine Funktion des Proteins in der Signaltransduktion nahe, die vermutlich zur Auslösung verschiedener *defense*-Reaktionen führt<sup>15</sup> (vgl. auch Dinesh-Kumar et al. 1995).

### 3.3 Sequenzen des viralen Genoms

#### 3.3.1 Virale Hüllproteine

Coat protein-mediated protection (CPMP), also die hüllproteinvermittelte Virusresistenz, war die erste gentechnologische Strategie in der Virusresistenzzüchtung: Die Kulturpflanze wird mit jenem viralen DNA-Abschnitt transformiert, der für das Virushüllprotein codiert. Die Schutzfunktion der CPMP stellt man sich ähnlich wie die oben beschriebene *cross protection* vor (vgl. Hull 1994). CPMP ist für mindestens 20 verschiedene RNA-Viren gelungen, und zwar unter anderem auch bei den landwirtschaftlichen Nutzpflanzen Tomate, Kartoffel und Reis. CPMP wurde in den meisten Fällen durch eine konstitutive Expression des Gens unter der Kontrolle des CaMV 35S Promotors erreicht. Offensichtlich muss aber nicht das komplette *sense*-Gen exprimiert werden, um einen Schutz vor Virusbefall zu erreichen. *Antisense* CPMP-Sequenzen brachten jedoch lediglich eingeschränkten Schutz, und auch diesen nur bei niedrig konzentriertem Inokulum (Strittmatter und Wegener 1993).

#### 3.3.2 Expression von viraler Replicase

Im Gegensatz zur Expression von viralen Strukturproteinen wird bei dieser Strategie versucht, die virale RNA-Polymerase zu exprimieren. Versuche mit intakter, unveränderter Replikase führten nicht zur Virusresistenz, aber die Transformation mit modifizierten Replikase-Mutanten konnte teilweise extreme Resistenz auslösen. (Baulcombe 1994, Longstaff et al. 1993).

#### 3.3.3 Symptomverminderung durch Satelliten-RNA

Satelliten sind kleine extragenomische RNA-Abschnitte, die auf ein Helfer-Virus angewiesen sind, um sich zu vermehren. Von manchen Satelliten ist bekannt, dass sie die Krankheitssymptome abschwächen, die ihr Helfervirus in der Pflanze auslöst. Diese Beobachtung wird zum Teil auf eine Konkurrenz zwischen Satellit und Virus um die zur Verfügung stehenden Replikase-Enzyme zurückgeführt (Hull 1994). Transgener Tabak, der die Satelliten des CMV (*Cauliflower Mosaic Virus*) exprimiert, war gegen das CMV selber resistent.

#### 3.3.4 Defective interfering RNA/DNA protection

Hierbei handelt es sich um Deletionsmutanten genomischer Virus-RNA oder DNA. Sie benötigen, ähnlich wie Satelliten, zur eigenen Vermehrung sogenannte "parent-viruses". Die von den "parent viruses" ausgelösten Krankheitssymptome können durch die Expression von Deletionsmutanten abgeschwächt werden (Strittmatter und Wegener 1993).

#### 3.3.5 Ribozym-vermittelte Virusresistenz

Ribozyme sind von der Funktion her als echte Enzyme zu kategorisieren, obwohl es sich nicht um Proteine, sondern um Ribonucleinsäuren handelt (Stryer 1988 S. 113). Überexprimierte Ribozyme, die eine virale RNA als "Angriffsziel" haben, könnten diese in unwirksame Stücke schneiden. Allerdings muss hoher Ribozymüberschuss vorliegen, um das System wirksam werden zu lassen (vgl. Strittmatter und Wegener 1993).

### **3.3.6 Antisense-vermittelte Virusresistenz**

*Antisense*-Konstrukte von Virushüllproteinen vermitteln in einigen Fällen eine ebenso wirksame Virusresistenz wie die entsprechenden *sense*-Konstrukte, in anderen Fällen haben die *antisense*-Pflanzen keine vergleichbare Resistenz (Bourque 1995). In den *antisense*-Pflanzen lagert sich die vom Transgen gebildete mRNA vermutlich an die Virus-RNA an und verhindert so die Translation; der Aufbau intakter Hüllproteine wäre unterbunden.

### **3.3.7 Andere Ansätze**

Weitere Möglichkeiten zur Erhöhung der Virusresistenz befinden sich im Stadium der ersten Grundlagenforschung; hierüber informieren Hull (1993) und Fitchen und Beachy (1993) sowie Strittmatter und Wegener (1993).

Tab. 2.1: Eine Auswahl von wichtigen molekularen Ansätzen zur Resistenzsteigerung

<b>PILZRESISTENZEN</b>			
<b>(Kultur-)art</b>	<b>Schaderreger</b>	<b>Genquelle/Gen</b>	<b>Referenz</b>
Tabak Raps	Rhizoctonia	Phaseolus vulg./Chitinase	Brogliè et al. 1991
Tabak	Rhizoctonia	Hordeum vulg./Chitinase	Logemann et al. 1992
Tabak	Peronospora Phytophthora	Tabak/PR1	Alexander et al. 1993
Tabak	Botrytis cinerea	Rebe/Stilbensynthase	Hain et al. 1993
Reis	Rhizoctonia solani	Reis/Chitinase	Lin et al. 1995
<b>INSEKTENRESISTENZEN</b>			
<b>(Kultur-)art</b>	<b>Schaderreger</b>	<b>Genquelle/Gen</b>	<b>Referenz</b>
Tomate	Lepidopteren	B.t. var kurstaki HD-1	Fischhoff et al. 1987
Tomate	Lepidopteren	B. t. var. kurstaki HD-1	Delannèy et al. 1989
Baumwolle	Lepidopteren	<i>B.t. var. kurstaki</i> HD-1 ( <i>cryIA(b)</i> ) HD-73 ( <i>cryIA(c)</i> )	Perlak et al. 1990
Mais	Lepidopteren ( <i>Ostrinia nubilalis</i> )	<i>B.t. var. kurstaki</i> HD-1 ( <i>cryIA(b)</i> )	Koziel et al. 1993
Reis	Lepidopteren ( <i>Chilo suppressalis</i> ; <i>Chaphalocrosis medinalis</i> )	<i>B.t. var. kurstaki</i> HD-1 ( <i>cryIA(b)</i> )	Fujimoto et al. 1993
Tabak	<i>Myzus persicae</i>	<i>Galanthus nivalis</i> / Lectin	Hilder et al. 1995
Luzerne	Verschiedene Insekten (u.a. <i>Frankliniella ssp.</i> )	<i>Manduca sexta</i> / Proteinase Inhibitor	Thomas et al. 1994
<b>VIRUSRESISTENZEN</b>			
<b>(Kultur-)art</b>	<b>Schaderreger</b>	<b>Genquelle/Gen</b>	<b>Referenz</b>
Tomate	Tomatenmosaikvirus	Hüllprotein	Nelson et al. 1988
Kartoffel	X-Virus	Virusreplikase	Longstaff et al. 1993
Kartoffel	X- und Y-Virus	Hüllprotein	Lawson et al. 1990
Reis	Rice Stripe Virus	Hüllprotein	Hayakawa et al. 1992
Raps	TYM-Virus	Virusreplikase	Zaccomer et al. 1993
Papaya	Papaya Ringspot	Hüllprotein	Fitch et al. 1992 Tennant et al. 1994
Zuckerrübe	Rizomania BNYVV	Hüllprotein	Schulte-Kappert (KWS, 1994, mündl. Information)
Gurke	Gurkenmosaik	Hüllprotein	Gonsalves et al. 1992

## Kapitel III: Klassische und molekulare Resistenzzüchtung: Toxikologische Risiken

### 1. Problemstellung und Grundbegriffe

Im folgenden wird eine toxikologische Bewertung verschiedener klassischer und molekularer Ansätze zur Resistenzsteigerung vorgenommen. Dabei ist zu bedenken, dass die Wirkung einer Substanz auf ein biologisches System in der Regel von der eingesetzten Menge abhängt. Diese Grundregel der Toxikologie wurde von Paracelsus (1593-1541) geprägt: "Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift, allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist." Ein weiterer Grundsatz toxikologischer Beurteilungen ist, dass die "Sicherheit" einer Substanz auf negativer Evidenz beruht, das heisst, auf dem Fehlen von Schäden oder Zerstörungen durch diese Substanz (Shibamoto und Bjeldanes 1993 S. 5).

Tabelle 3.1 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Begriffe zur Bezeichnung der Akuttoxizität von (bio-)chemischen Substanzen. Die Auswirkungen von chemischen Substanzen auf den menschlichen oder tierischen Organismus hängen nicht nur vom Körpergewicht, sondern auch vom Entwicklungszustand des exponierten Organismus ab. Embryonen und Neugeborene verfügen beispielsweise noch nicht über alle Oxidasen, so dass sie manche Alkaloide nicht abbauen können: Die Halbwertszeit von Koffein liegt für Erwachsene bei 4,9 h, für Embryos bei 102,9 h. Jede toxikologische Beurteilung muss also Alter und Konstitution der Konsumenten mitberücksichtigen (Huxtable 1992 S. 283).

Ferner gibt es viele biochemische Verbindungen, die keine akute Vergiftungsgefahr darstellen, die aber bei Dauerexposition zu Gesundheitsschäden führen (Shibamoto und Bjeldanes 1993 S. 20). Die Abschätzung des Risikopotentials bei andauernder subakuter Exposition ist im allgemeinen schwierig (vgl. auch Archibald und Winter 1989 und Kurzer 1993).

Im folgenden werden Substanzen, die sich in Kapitel II als bedeutend bei der Abwehr von Schaderregern erwiesen, im Hinblick auf ihre toxikologische Relevanz diskutiert.

Die meisten endogenen *defense*-Faktoren können im Moment nur mit konventionellen Züchtungsverfahren beeinflusst werden, weil die zugrundeliegenden Gene noch nicht kloniert sind. Gene aus Organismen, die nicht mit der Kulturpflanze kreuzbar sind, können nur mit molekularen Methoden eingebracht werden. In einigen Fällen, z.B. bei endogenen Lectinen und Chitinasen, sind theoretisch beide Wege geeignet, um das Niveau der Substanzen zu erhöhen<sup>16</sup>.

Die toxikologische Beurteilung *des Genproduktes selbst* ist unabhängig von dem Verfahren zur Wahl des Allels, zur Einschleusung des Gens oder zur Konzentrationsveränderung des Genproduktes; ob dies mit konventionellen oder molekularen Methoden geschieht, hat auf die Lebensmittelsicherheit *identischer* Genprodukte keinen Einfluss. Allerdings ist der Handlungsspielraum der Gentechnik bei der Übertragung und Veränderung von Genen unvergleichlich viel grösser. Infolgedessen sind auch mehr (und neue) Sicherheitsfragen zu klären. Zu den Risiken der verschiedenen *Verfahren an sich* vgl. Kapitel V.

## 2. Proteine und Aminosäuren

### 2.1 Lectine

Einen Überblick über Funktion und Toxizität von Lectinen geben Lis und Sharon (1986). Lectine werden in hohen Konzentrationen im Samen von Leguminosen und Gramineen gefunden (Etzler 1986 S. 371 ff). Sie spielen sowohl bei der Pilz- als auch bei der Insektenabwehr eine Rolle und sind Gegenstand von Versuchen zur molekularen Resistenzsteigerung (vgl. Kapitel 2).

Im Kapitel II wurden die Ansätze von Broekaert et al. (1989; antifungales Lectin der Brennessel) und Huesing et al. (1991; insektizides Lectin des Weizenkeims: WGA) vorgestellt. Beide Autoren schlagen die Transformation von geeigneten anfälligen Kulturpflanzen mit den jeweiligen Lectinen (es handelt sich in beiden Fällen um N-Acetylglucosamin-spezifische Agglutinine) vor.

In Kenntnis dieser Vorschläge haben Pusztai et al. (1993) die Lebensmittelsicherheit der zwei Lectine untersucht. Nach zehntägigen Fütterungsversuchen an Ratten stellten sie schwerwiegende negative Effekte der Lectine fest, und zwar insbesondere vermindertes Körperwachstum, Hyperwachstum des Darms und Störungen der Darmfunktion. WGA führte darüberhinaus zu hypertrophem Wachstum der Bauchspeicheldrüse und Thymusatrophie; ferner konnte ein bedeutender Anteil des WGA in aktivem Zustand die Darmwand passieren, zirkulierte in der Blutbahn und wurde schliesslich in den Wänden der Blutgefässe abgelagert. Die Permeabilität der Darmwand wird durch WGA erhöht; infolgedessen können auch andere toxische Proteine leichter passieren.

Die natürliche Konzentration von WGA im Weizenkeim liegt bei ca. 300mg/kg. Die insektizide Wirkung ist für eine Konzentration von 10g/kg nachgewiesen. Pusztai et al. (1993) führten ihre Versuche mit einer vollbalancierten Diät bei einer WGA-Konzentration von 7g/kg durch. Damit ist also in dem Konzentrationsbereich, der für einen wirksamen Pflanzenschutz benötigt wird, mit toxischen Wirkungen des WGA zu rechnen. WGA ist sehr hitzestabil und resistent gegenüber proteolytischem Abbau. Die antinutritiven Effekte des Brennessel-Lectins scheinen weniger ausgeprägt, allerdings ist auch seine insektizide Wirkung geringer (im Gegensatz zur ausgeprägten antifungalen Wirkung).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Herkunft eines Gens keinerlei Aussage über die Lebensmittelsicherheit des codierten Proteins zulässt. Das Lectin der Brennessel hat deutlich weniger negative Auswirkungen als dasjenige der Nahrungsmittelpflanze Weizen. Ausserdem wird deutlich, welche Rolle die Dosis sowohl für die *defense*-Wirkung als auch für die Lebensmittelsicherheit spielt.

Die Rolle weiterer Lectine bei der Pathogenabwehr ist dokumentiert. So stellten Chrispeels und Raikel (1991) eine Funktion von Ricin (aus *Ricinus communis*) bei der Abwehr chitinhaltiger Pilze fest (vgl. Kapitel 2). Ricin gehört bei Injektion zu den potentesten Humantoxinen überhaupt. Nach oraler Aufnahme ist diese Wirkung jedoch wesentlich geringer, und überraschenderweise geht sie dann nicht auf die ribosomeninaktivierende Untereinheit zurück, sondern auf die galactosespezifische Lectinuntereinheit (Pusztai 1989 S. 59).

Ein anderes interessantes Beispiel für den Zusammenhang zwischen Lectinen, *defense*-Status der Pflanze und Lebensmittelsicherheit liegt für Kidneybohnen (*Phaseolus vulgaris*, Lectin PHA) vor. PHA hat *in vitro* nachgewiesene Wirkungen gegen verschiedene Insekten (vgl. Ref. in Pusztai 1989 S. 38) und ist gleichzeitig dafür verantwortlich, dass rohe Kidneybohnen toxisch sind. PHA ist ausserordentlich resistent gegenüber proteolytischem Abbau (Pusztai 1989 S. 42). Wenn Ratten rohe

Kidneybohnen als einzige Proteinquelle erhalten, stellt sich schnell Hypoglycämie und nachfolgend der Tod ein (Grant 1991 S. 59f.).

In einigen Programmen findet sich dementsprechend die Selektion von *P. vulgaris* mit niedrigen Lectingehalten als Züchtungsziel, insbesondere bei einer geplanten Verwendung der Bohnen als Futtermittel (z.B. die PHA-minus Linie "Pinto III" von *P. vulgaris*, vgl. Pusztai 1989 S. 60. vgl. auch Friedman et al. 1991 für Sojabohnen). Untersuchungen über deren agronomischen Wert werden gegenwärtig durchgeführt. Durch ausreichend langes Kochen werden Kidneybohnen geniessbar, denn PHA ist nicht hitzestabil.

Die Lectine weisen in ihrer biologischen Wirkung eine relativ grosse Variationsbreite auf, so dass man toxikologische Risiken nur spezifisch diskutieren kann (s. oben und Pusztai 1989 29 ff.). Ein Zusammenhang mit dem *defense*-Status der Pflanzen ist für einige Lectine nachgewiesen und wird für weitere vermutet. Hitzebehandlung zerstört viele, aber nicht alle Lectine, wie am Beispiel des WGA deutlich wurde (Grant 1991 S. 63 f.).

Resistenz und Lebensmittelsicherheit sind in der Regel keine Alternativen, sondern zwei Voraussetzungen für die Nutzbarkeit einer Sorte. Insbesondere wenn die Nahrungsmittelsicherheit nicht durch Nacherntemassnahmen (Kochen, andere Formen des Prozessierens) gewährleistet werden kann, ist die Akkumulation von bestimmten Lectinen zur Verbesserung des *defense*-Status der Pflanzen nicht akzeptabel.

## 2.2 Protease-Inhibitoren

Protease-Inhibitoren (PIs) sind bedeutende Faktoren der Insektenresistenz von Pflanzen und werden sowohl in klassischen Zuchtprogrammen als auch mit molekularen Methoden bearbeitet (vgl. Kapitel 2). Für die antifungale Wirksamkeit von Protease-Inhibitoren sind ebenfalls Beispiele dokumentiert (vgl. ebenda). Protease-Inhibitoren können bis zu 10% des Gesamtstickstoffs in Samen und Speicherorganen ausmachen (Strittmatter und Wegener 1993); grössere Mengen finden sich in Leguminosensamen (Norton 1991 S. 97 f.) und Getreiden einschliesslich Mais (Xavier-Filho und Campos 1989 S. 3). Man unterscheidet vier Klassen von Proteasen (Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen) und teilt entsprechend die Inhibitoren, die ausnahmslos nur je einen Typ von Proteasen hemmen, ebenfalls in 4 Klassen ein (Norton 1991 S. 69).

Die Forschungsanstrengungen haben sich bisher hauptsächlich auf Serin-Proteaseinhibitoren konzentriert (Xavier-Filho und Campos 1989 S.12). Serin-PIs hemmen unter anderem auch die menschlichen Verdauungsenzyme Trypsin und Chymotrypsin (Strittmatter und Wegener 1993).

Extrakte aus der in Afrika weitverbreiteten Kuhbohne (*Vigna unguiculata*) hemmen das Humanchymotrypsin *in vitro* (Norton 1991 S. 98 f.). Carnovale et al. (1991) verglichen Wildformen und Zuchtsorten nigerianischer Kuhbohnen und fanden, dass sie sich hauptsächlich im Gehalt an Trypsin-Inhibitoren (und Tanninen, s. u.) und in der Feldresistenz unterschieden. Der Gehalt an Protease-Inhibitoren war mit der Verdaulichkeit der Sorten eindeutig und negativ korreliert. Die geringere Krankheits- und Pilzresistenz der Zuchtsorten mit niedrigem PI-Gehalt ist offenbar die Kehrseite des verbesserten Nährwertes.<sup>17</sup>

Friedman et al. (1991) untersuchten eine im Handel erhältliche Sojabohnensorte und eine entsprechende Isolinie mit stark reduziertem Gehalt an Kunitz Trypsin-Inhibitoren (KTI). Rohes wie erhitztes Mehl der Isolinie waren ernährungsphysiologisch günstiger zu beurteilen. Die KTI-Null-Linien haben offenbar keinen signifikant niedrigeren agronomischen Wert als die Elternlinien (Hymowitz 1986, zitiert bei Friedman 1991), obwohl systematische Resistenzprüfungen nicht dokumentiert sind.

Mohamed und Rangappa (1992) fanden bei 56 Linien von Körnersojabohnen und 17 Gemüsesojalinien, die alle auf Ozontoleranz und Resistenz gegenüber dem mexikanischen Bohnenkäfer vorselektiert waren, beträchtliche Unterschiede in den Gehalten an Trypsin-Inhibitoren und anderen antinutritiven Substanzen.

Diese Variabilität bedeutet, dass zumindest in Sojazuchtprogrammen die Ziele Resistenz und niedriger PI-Gehalt gleichzeitig verfolgt werden können.

Die Mehrzahl der PIs aus Pflanzen werden durch Kochen oder andere Hitzeprozessierung unwirksam, allerdings nicht vollständig. Die meisten kommerziell erhitzten Sojamehle behalten 5-20% der ursprünglich gemessenen Trypsin- und Chymotrypsin-Inhibitoraktivität. Längere Hitzebehandlung würde auch wertgebende Inhaltsstoffe weitgehend zerstören (Friedman et al. 1991). Deshalb muss auch bei pflanzlichen Lebensmitteln, die vor dem Verzehr erhitzt werden, mit einer Verminderung von Verdaulichkeit und Qualität gerechnet werden, wenn die PI-Konzentration sehr hoch ist.

PIs werden in der Regel im Darm degradiert und gelangen infolgedessen nicht in den Blutkreislauf (Norton 1991 S. 106). Xavier-Filho und Campos (1989 S. 15f.) weisen aber darauf hin, dass 2-jährige Fütterungsversuche an Ratten zu PI-induzierten Veränderungen der Bauchspeicheldrüse geführt haben und deshalb die menschliche Langzeitexposition überwacht werden sollte, um im Fall einer vermehrten Nutzung der PIs in der (molekularen) Resistenzzüchtung fundierte Aussagen zur Nahrungsmittelsicherheit treffen zu können.

Andererseits liegen aber Resultate vor, die für Soja-PI *in vitro* und *in vivo* eine antikanzerogene, also erwünschte Wirkung belegen und ausserdem darauf hindeuten, dass PIs die T-Zellen des menschlichen Immunsystems stimulieren können (vgl. Friedman 1991).

Bei einer konkreten Beurteilung der Lebensmittelsicherheit von Pflanzen mit erhöhtem PI-Gehalt ist deshalb die erreichte PI-Konzentration und der Ort der Akkumulation entscheidend.

### 2.3 Antifungale Hydrolasen

Die Rolle von Chitinasen und Glucanasen in der Resistenzausstattung der Pflanzen wurde in Kapitel II dargelegt. Etliche Nahrungsmittelpflanzen sind inzwischen mit Chitinasekonstrukten transformiert worden. Wenn sie marktreif sind, müssen sie (vermutlich) einem Verfahren zur Überprüfung ihrer Lebensmittelsicherheit unterzogen werden, es sei denn, weder Struktur noch Konzentration der Hydrolasen wären gegenüber der Ausgangspflanze unverändert (vgl. Kap. 6). Dies ist jedoch unwahrscheinlich, weil dann auch nicht mit einer verbesserten *defense*-Wirkung gerechnet werden könnte.

Vorabuntersuchungen zur Lebensmittelsicherheit solcher transgenen Pflanzen liegen unserer Kenntnis nach nicht vor. Stattdessen wird im allgemeinen festgestellt, dass Hydrolasen zu den häufigsten Enzymen gehören und deshalb sowie von ihrer Struktur und Stabilität her keine toxikologischen Probleme zu erwarten seien. Diese Annahme kann die Untersuchung der Genprodukte und der veränderten Pflanzen vermutlich nicht ersetzen.

Für einige Hydrolasen, z.B. für die  $\beta$ -Glucanasen aus *Aspergillus niger* und *Bacillus subtilis*, liegen Erfahrungen aus der Lebensmitteltechnologie vor. Diese Glucanasen werden heute bei der Prozessierung von Lebensmitteln verwendet und sind auch Bestandteile von Nahrungsmitteln. Erfahrungen mit der Lebensmittelsicherheit der beiden Enzyme liegen daher vor; Probleme oder negative Effekte sind nicht dokumentiert (Parzia und Foster 1983).

## 2.4 Thionine

Thionine sind basische, cysteinreiche Polypeptide mit niedrigem Molekulargewicht, deren Toxizität für Bakterien und Pilze nachgewiesen ist (Molina et al. 1993 und Bohlmann 1994). Apel (pers. Information 1995) schlägt vor, Thionine in Kartoffeln zu exprimieren, um sie vor Pilzbefall zu schützen. Florack et al. (1994) exprimierten Hordeothionine aus dem Endosperm von Gerste (*Hordeum vulgare*) in der Modellpflanze Tabak. Die Thionine machten in den transgenen Pflanzen bis zu 0,7% am gesamten löslichen Protein aus. Neben den von Florack et al. verwendeten Thioninen stehen für Transformationsexperimente noch Viscotoxin (aus *Viscum album*), Crambin (aus *Crambe abyssinica*) sowie Hordeothionine aus Blättern von *Hordeum vulgare* und Purothionine aus dem Endosperm von *Triticum aestivum* zur Verfügung (Apel, pers. Information 1995).

Purothionine sind säugertoxisch, wenn man sie intravenös oder in die Bauchdecke injiziert. Bei oraler Verabreichung hatten Purothionine aber bis zu einer Menge von 229 mg/kg Körpergewicht keine negativen Effekte (Coulson et al. 1942, zit. bei Bohlmann und Apel 1991).

Viskotoxine sind bei Injektion ebenfalls sehr giftig; für Katzen liegt die LD<sub>50</sub> bei 0,1 mg/kg Körpergewicht. Diese Toxizität verliert sich offenbar bei der Aufnahme über den Verdauungstrakt (Samuelsson 1974).

Toxische Thionine zerstören die Zellmembranen, aber der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Bohlmann und Apel 1991, Molina et al. 1993 und Bohlmann 1994). Das einzige nichtbasische und nichttoxische Thionin, das bis jetzt näher charakterisiert wurde, ist das Samenprotein Crambin (Bohlmann 1994).

Ob und in welcher Konzentration einzelne Thionine anti-nutritive oder toxische Eigenschaften haben, wenn sie oral aufgenommen werden, muss im Einzelfall untersucht werden. Die relativ alten Untersuchungen, die zu Purothioninen und Viskotoxinen vorliegen, sind nicht ausreichend, um Aussagen über die Lebensmittelsicherheit transgener Nahrungsmittelpflanzen zu treffen, die Thionine überexprimieren.

## 2.5 Toxische Aminosäuren

Als Beispiel soll hier die insektenhemmende Nicht-Protein-Aminosäure L-Canavanin aus Leguminosensamen dienen (2.2.1). Canavanin hemmt das Wachstum von Küken bei oraler Verabreichung stark, ist aber für Säuger offenbar nur in sehr hohen Dosen bedenklich (D'Mello 1991 S. 48). Toxische Aminosäuren werden unserer Kenntnis nach züchterisch oder molekular nicht gezielt bearbeitet.

## 3. Glykoside

### 3.1 Glucosinolate

Die toxische Wirkung von Glucosinolaten auf bestimmte Schaderreger ist eindeutig dokumentiert; allerdings werden, wie in Kapitel II dargestellt, manche Insekten auch spezifisch angezogen (vgl. Kapitel II, 2.3). Die molekulare Manipulation des Glucosinolathaushalts von landwirtschaftlichen Nutzpflanzen wird erwogen; insbesondere wird die Veränderung des Glucosinolatspektrums zur Abwehr von Schaderregern und zur gleichzeitigen Reduzierung von toxikologischen Risiken diskutiert (Hallahan et al. 1992; vgl. Kapitel II, 2.3).

Glucosinolate gehören zu den Thioglucosiden und sind in Cruziferen (z.B. Raps und Senf, Kohlarten) weit verbreitet. Das pflanzeigene Enzym Myrosinase<sup>18</sup> zerlegt die Glucosinolate in Glucose und ein instabiles Aglucon, das spontan zu einer Anzahl toxischer Metaboliten zerfällt, unter anderem zu Isothiocyanaten und Nitrilen (Duncan 1991 S. 133). Nitrile greifen das Leber- und Nierengewebe an; ausserdem entstehen bei der Biotransformation von Nitrilen freie Cyanide (Duncan 1991 S. 139).

Die negativen Auswirkungen der Glucosinolate auf Haustiere, die einen hohen Teil ihres Proteinbedarfs mit glucosinolathaltigen Rapsextraktionsschroten decken, sind klar belegt. 5-Vinyloxazolidin-2-Thion, das beim Abbau bestimmter Glucosinolate im Rapsamen anfällt, wirkt sehr stark kropfbildend und ist mitverantwortlich für den beschränkten Einsatz von glucosinolathaltigem Rapspresskuchen als Tierfutter (Nordic Council 1991 S. 121).

Realistische Einschätzungen eventueller Gefahren der Langzeitexposition des Menschen stehen noch aus (Duncan 1991 S. 147 und Fenwick et al. 1989 S. 30). Nicht nur die Glucosinolate und ihre Abbauprodukte selber, sondern auch deren Interaktionen im Stoffwechsel können eine Rolle spielen: Freiwerdende Indolderivate stimulieren gewisse körpereigene Entgiftungsenzyme, die möglicherweise vor Krebs schützen (Duncan 1991), andererseits können Glucosinolate mit Nitrit interagieren und dadurch möglicherweise zu Procarcinogenen werden (Fenwick et al. 1989 S. 30).

### 3.2 Cyanogene

Cyanogene Glycoside kommen insbesondere in den Familien Rosaceae, Leguminosae, Gramineae und Euphorbiaceae vor. Bei der Hydrolyse von Cyanogenglycosiden entsteht Cyanid, das die Zellatmung hemmt und deshalb extrem giftig ist (Majak 1992). Die hauptbetroffene Region ist das Afrika südlich der Sahara, wo die Euphorbiacee Cassava (*Manihot esculenta* Crantz; auch Maniok genannt) eine Grundlage der Ernährung ist. Durch langwieriges Prozessieren wird Cassava essbar (Tewe und Iyayi 1989). Bei Stichproben von kommerziellem Maniokmehl in Nigeria wurden allerdings Cyanidgehalte von bis zu 35mg/750g (750 g sind eine Tagesration) gefunden, was der Hälfte der letalen Dosis entspricht (Johne 1991 S. 83). Insbesondere sind Probleme der chronischen Cyanogentoxizität von Bedeutung.

Der *defense*-Status von cyanogenen Pflanzen wird mit ihrem Gehalt an Cyanoglycosiden in Zusammenhang gebracht (Ames et al. 1990b), allerdings existieren widersprüchliche Ergebnisse (vgl. John 1991 S 73f.). Eine Selektion auf niedrige Cyanogengehalte ist möglicherweise ohne Resistenzverluste möglich.

### 3.3 Saponine

Saponine sind fungitoxisch gegenüber Pilzen, die cholesterolhaltige Membranen besitzen; ferner sind sie antimikrobiell (Oakenful und Sidhu 1989 S. 121 f). Saponine sind Triterpene oder Steroide, die mit einer oder mehreren Gruppen von Zuckern verbunden sind, liegen also ebenfalls glycosidisch vor (Oakenful and Sidhu 1989 S. 99). Saponine mit Triterpenoidaglyconen sind in Nahrungsmittelpflanzen am häufigsten. Manche Saponine sind hochgiftig, wenn sie Säugetieren intravenös gegeben werden (Fenwick et al. 1989 S. 316 f.). Bei oraler Verabreichung verliert sich die Toxizität oft. Saponine sind in ihrer anti-nutritiven Wirkung sehr variabel, so wie es auch bei den exponierten Säugern grosse Unterschiede in der Empfindlichkeit gibt (Oakenful und Sidhu 1989 S. 126). Liener (zit b. et al. Fenwick 1989) schlägt vor, manche Saponine wegen ihrer offensichtlichen Unbedenklichkeit nicht länger zu den anti-nutritiven Faktoren zu rechnen. Ein Problem bleibt aber, dass Saponine die Durchlässigkeit der Zellmembranen erhöhen können, womit die Aufnahme anderer Toxine erleichtert wird (Fenwick et al. 1989 S. 316 f. und Oakenful und Sidhu 1989 S.

124). Sojasaponine besitzen in bestimmten Konzentrationen eine anticancerogene Wirkung. Ferner verfügen Saponine über die Fähigkeit, die Cholesterolkonzentration im Blutplasma und in der Leber zu senken (Oakenful und Sidhu 1989 S. 127, vgl. auch Thompson 1993).

## 4. Aromatische Verbindungen

### 4.1 Einfache Phenole

Phenole haben vielfältige Funktionen in der Pflanze, unter anderem auch als endogene *defense*-Faktoren (vgl. Kapitel II, sowie Nicholson und Hammerschmidt 1992).

Die Phenole gehören zu einer extrem grossen und heterogenen Gruppe von biochemischen Komponenten, die nur dadurch definiert ist, dass ein aromatischer Phenolring mit einer oder mehreren Hydroxylgruppen direkt verbunden ist (Appel 1993). Dieser Vielfalt entsprechend lassen sich über die Humantoxizität von Phenolen wenig allgemeine Aussagen machen. Allgemein lässt sich sagen, dass während der Phenoloxidation Sauerstoffradikale entstehen, die Zellmembranen angreifen können (Appel 1993).

Bei Getreiden werden insbesondere die Hydroxycinnamylsäuren Chlorogensäure, Kaffeesäure und Ferulsäure gefunden (Huang und Ferraro 1992). Ito et al. (1992) fanden, dass Kaffeesäure die Anfälligkeit von Ratten für Magen- und Nierenkrebs erhöht, während andere Hydroxycinnamylsäuren manche Krebsarten zu hemmen und andere zu fördern scheinen. Einige Hydroxycinnamylsäuren hemmen die Bildung von (cancerogenen) Nitrosaminen (Huang und Ferraro 1992). Die direkte Hemmung mancher Krebsarten durch Chlorogensäure ist ebenfalls nachgewiesen (Huang und Ferraro 1992). Huang und Ferraro (1992) kommen zu dem allgemeinen Schluss, dass die Hydroxycinnamylsäuren *in vivo* und in den üblicherweise verzehrten Mengen nicht toxisch sind. Sie weisen jedoch darauf hin, dass einige dieser Substanzen bei hohen Konzentrationen synergistisch wirken und sich negativ auf die Gesundheit auswirken können.

Kinsella et al. (1993) berichten, dass die antioxidative Wirkung von Phenolen vor coronaren Herzkrankheiten schützen kann.

Diese widersprüchlichen Gesundheitswirkungen sowie der komplizierte Zusammenhang der Phenole mit dem *defense*-Status der Pflanzen ist charakteristisch für die Rolle sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe (vgl. Thompson 1993). Traditionelle Erfahrungen im Umgang mit phenolhaltigen Nahrungsmittelpflanzen erweisen sich vor diesem Hintergrund als besonders wertvoll (Kinsella et al. 1993). Die Auswirkungen von Eingriffen in den Sekundärstoffhaushalt auf die Nahrungsmittelqualität und -sicherheit sind aufgrund der unvollständigen Kenntnis biochemischer und medizinischer Zusammenhänge generell schwer vorherzusagen.

### 4.2 Tannine

Tannine sind hochmolekulare phenolische Substanzen, die in zwei Hauptgruppen, nämlich in die hydrolysierbaren und die kondensierten Tannine unterteilt werden. Die anti-nutritiven Eigenschaften kondensierter Tannine gehen hauptsächlich auf ihre Interaktionen mit für die Ernährung essentiellen Makromolekülen zurück. Techniken, um Tannine aus Nahrungs- und Futtermitteln zu lösen, sind verfügbar, aber nur bis zu einem gewissen Grad wirksam (Griffith 1991 S.199f).

Helsper et al. (1993) verglichen die Futterqualität von tanninfreien Ackerbohnen (*Vicia faba* L.) mit den tanninhaltigen Ausgangslinien (Near Isogenic Lines, NILs)<sup>19</sup>. In Feldversuchen wurde festgestellt, dass der Ertrag der tanninfreien Bohnen im

allgemeinen geringer ist. Dies wurde mit erhöhter Krankheitsanfälligkeit erklärt, wobei aber widersprüchliche Daten vorliegen: Villalobos und Jellis (1990, zit. b. Helsper et al. 1993) fanden eine signifikant bessere Fusarium-Resistenz bei tanninhaltigen Linien, während Helsper et al. (1993) keine Korrelation zwischen dieser Krankheit und dem Tanningehalt feststellten.

Interessant ist die Bewertung der Tanninfreiheit als Qualitätsmerkmal: Sie hängt offenbar von der zu fütternden Tierart ab. Bei Wiederkäuern verzögert die Bildung von Tannin-Protein-Komplexen die Proteinverdauung, was positiv zu sehen ist, da Blähungen verhindert werden. Bei einmägigen Säugetieren (z.B. Schweinen) vermindern Tannine die Verdaulichkeit in negativer Weise (Helsper et al. 1993).

Dieses Beispiel zeigt, dass die Beziehungen Resistenz-(Ertrag)-Qualität oft nicht eindeutig sind und ausserdem nur im Kontext, also unter Einbeziehung des Verwendungszwecks, beurteilt werden können.

### 4.3 Aromatische Carbonsäurederivate

Einige Pflanzen, darunter z.B. Pastinaken und Sellerie, produzieren als Reaktion auf Krankheitsbefall hohe Konzentrationen des Furocumarins Psoralen. Psoralen ist also in diesen Fällen ein Phytoalexin. Seine Konzentration bei infizierten Pflanzen kann hundert bis tausende ppm betragen. Psoralen ist in diesen Konzentrationen toxisch, mutagen und carcinogen (Ivie et al. 1981). Von therapeutisch nicht notwendiger Exposition wird abgeraten (Ivie et al. 1981).

Der Psoralengehalt in nicht-infiziertem Sellerie liegt normalerweise bei ca. 800 ppb. Nach der Markteinführung einer konventionell gezüchteten insektenresistenten Sorte gingen bei den amerikanischen Centers of Disease Control auffallend viele Klagen über Hautausschläge und "Verbrennungen", insbesondere nach Sonneneinstrahlung ein, und zwar von Menschen, die mit den Selleriepflanzen (Haut-)kontakt hatten. Es stellte sich heraus, dass die Sorte einen Psoralengehalt von 6200 ppb hatte, worauf sie zurückgezogen werden musste (Ames et al. 1990 b).

Da Insektenresistenz oft auf einem konstitutiv erhöhten Spiegel an "endogenen Pestiziden" beruht, ist bei herausragender Insektenresistenz, deren biochemische Grundlage man nicht kennt, unter Umständen eine toxikologische Prüfung notwendig. Dies gilt insbesondere dann, wenn die Pflanze einer botanischen Familie entstammt, in der (potentiell) humantoxische Verbindungen synthetisiert werden. Andererseits ist bei Krankheitsbefall in Reaktion auf die Besiedlung der Pflanze mit Mikroorganismen mit einer induzierten Toxinbildung zu rechnen, so dass in manchen Fällen die toxikologische Überprüfung an infizierten Pflanzen erwogen werden sollte (vgl. Cerkauskas und Shiba 1991).

## 5. Alkaloide

Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) und Tomaten (*Lycopersicon esculentum*) sind die wichtigsten alkaloidhaltigen Nahrungsmittelpflanzen (Pettersson et al. 1991 S. 148 f.)

Kartoffeln enthalten in den Knollen zwischen 20-150 mg/kg Glycalkaloide (Nordic Council 1991 S. 110). Sowohl das  $\alpha$ -Solanin als auch das  $\alpha$ -Chaconin der Kartoffeln (die zusammen 95% der vorliegenden Glycalkaloide ausmachen, vgl. Nordic Council 1991 S. 111) hemmen die Acetylcholinesterase, ein Schlüsselenzym bei der Signalübertragung des Nervensystems (Majak 1992). Das zugehörige Aglycon Solanidin ist weniger aktiv (Majak 1992)<sup>20</sup>.

Der Verzehr von Kartoffeln mit hohen Glycalkaloid(GA-)gehalten kann zu Gastritis, Durchfall und Übelkeit führen. Auch Unruhe, Verwirrtheit, Koma und Todesfälle sind

dokumentiert (Nordic Council 1991 S. 110f.). Diese Vergiftungserscheinungen treten beim Menschen ab einer Aufnahme von 2-5 mg Glycalkaloiden pro kg Körpergewicht auf, womit das toxische Potential der Kartoffelalkaloide demjenigen von Strychnin entspricht (Pettersen et al. 1991 S 173; vgl. auch Huxtable 1992 S. 243). Die normalen GA-Gehalte in Kartoffeln liegen nur um das zwei- bis dreifache unter der Konzentration, für die toxikologische Effekte dokumentiert sind. Die Sicherheitsmarge ist also extrem gering (Van Gelder 1991 S. 124). Die Fütterung von Kartoffeln mit hohen Alkaloidgehalten führte bei verschiedenen Labortieren zu Fruchtbarkeitsstörungen, erhöhter Embryosterblichkeit und neurologischen Defekten bei den Nachkommen (Pettersen 1991 S. 173). Entsprechend wird als besonders wichtig angesehen, dass schwangere Frauen die Grenzwerte beachten.

Der Glycalkaloidgehalt wird durch Kochen, Backen, Braten oder Hitzetrocknung kaum beeinflusst (Sharma und Salunkhe 1989 S. 180), hängt aber stark von den Kultur- und Lagerbedingungen der Kartoffeln ab (Lichtexposition, Verletzungen der Knollen, vgl. Pettersen S. 150). Todesfälle infolge des Verzehrs von hochalkaloidhaltigen grünen oder verletzten Kartoffeln sind dokumentiert (vgl. Sharma und Salunkhe 1989 S. 218). Das Nordic Council (1991) empfiehlt bei der Neuzulassung von Kartoffelsorten eine maximale Gesamtkonzentration an Glycalkaloiden von 100mg/kg. 1970 wurde die Kartoffelsorte Lenape vom Markt genommen, nachdem Gehalte von bis zu 650 mg/kg festgestellt worden waren. Die eingekreuzte wilde Kartoffelverwandte *S. chacoense* wurde als Ursache dieser exzessiven Gehalte ausgemacht (Van Gelder 1991 S. 121)<sup>21</sup>. Die fungitoxischen Wirkungen der Glycalkaloide aus Kartoffeln auf *Helminthosporium carbonum* und *Fusarium ssp.* sowie ihre Eigenschaft als *defense*-Faktor gegen den Coloradokäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) sind nachgewiesen (vgl. Sharma und Salunkhe 1989 S.222 und Kapitel II). Allerdings ist der auf Kartoffeln spezialisierte *L. decemlineata* durch niedrige oder mittlere Solaningehalte nicht abzuschrecken. Bei unverändertem Alkaloidmuster und herausragender (polygener) Resistenz gegen *L. decemlineata* muss deshalb eventuell mit Solaningehalten gerechnet werden, die für Speise- und Futterkartoffeln nicht mehr akzeptiert werden können.

Bei der Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Alkaloidgehalt und Pilzinfektion fanden Frank et al. (1975, zit. bei Sharma und Salunkhe 1989 S. 209) allerdings keine Korrelation, was bedeutet, dass eine konventionelle Resistenzverbesserung hier auch ohne gleichzeitige Erhöhung des Alkaloidspiegels möglich sein sollte.

Van Gelder (1991) weist darauf hin, dass bei der Verwendung von Züchtungstechniken wie der somatischen Hybridisierung Gene für Wildtyp-Alkaloide überführt werden, die eventuell unter "Normalbedingungen" abgeschaltet sind und erst unter Stress exprimiert werden. Ausserdem kann die Rekombination von Genen, welche den Glycosidaufbau oder den Aglycontyp kontrollieren, zu Glycalkaloiden führen, die in keinem der Eltern vorlagen, eventuell sogar zu wirklich neuen GAs.

Auch bei Getreiden gibt es Beispiele für *defense*-Alkaloide. Entsprechende Wirkungen des Indolalkaloides Gramin aus *Hordeum vulgare* sind nachgewiesen. Insbesondere auf Schafe hat Gramin in den natürlicherweise gefundenen Konzentrationen (bei Verzehr der ganzen Pflanze, gut dokumentiert für das Futtergras *Phalaris*) toxische Wirkung. Die Züchtung von Sorten mit niedrigem Gehalt an Gramin wird erwogen; allerdings wird deren erhöhte Anfälligkeit gegenüber *Schizaphis graminum* und anderen Insekten befürchtet (Corcuera 1989 S. 174 f.).

Samen der Leguminose Lupine (*Lupinus ssp.*) enthalten bis zu 5% Quinolizidin-Alkaloide. Sie hemmen die Vermehrung von Viren, Bakterien, Pilzen (z.B. Mehltau) und sind toxisch für Schnecken, viele Insekten und andere Frassfeinde (Hasen, Wild). Ausserdem hemmen sie die Keimung anderer Pflanzen (Wink 1988). Wegen der ebenfalls damit einhergehenden Haustier- und Humantoxizität und des

bitteren Geschmacks wurden nahezu alkaloidfreie "Süsslupinen" gezüchtet. Sie sind in beeindruckendem Mass anfälliger als die Bitterlupinen (Wink 1988). Um ausreichend resistente Körnerlupinen zu erhalten, müsste der Alkaloidgehalt in den Samen stark gesenkt werden, ohne dass er auch in der Restpflanze zurückgeht (Wink 1988). Um die Gesamtpflanze verwertbar zu machen, sollte bekannt sein, ob Alkaloidmuster und -konzentrationen so kombiniert werden können, dass nur die schützende, nicht aber die human- (oder haustiertoxische) Wirkung erhalten bleibt.

## 6. Echte Resistenzgene

Bis heute sind erst 5 Resistenzgene (Krankheits- Schädlings- und Virusresistenzgene) kloniert. Es zeichnet sich jedoch ab, dass die Resistenzgenprodukte eine Rolle bei der Erkennung von Pathogenen und bei der Signaltransduktion spielen (Dangl 1995, Lamb 1994).

In der klassischen Pflanzenzüchtung wurde von Anfang an mit Resistenzgenen gearbeitet, ohne dass man deren Produkte kannte. Sie sind in manchen Sorten der Kulturformen schon vorhanden oder wurden/werden aus kreuzbaren Wildarten eingekreuzt. Gelegentlich wurde über eine Verschlechterung der Qualitätseigenschaften berichtet, insbesondere bei der Übertragung grösserer Chromosomenbruchstücke (vgl. Baum 1992).

Toxikologische Implikationen dieser Nutzung von Resistenzgenen sind nicht dokumentiert. In Anbetracht der mutmasslichen "Feinheit" des Resistenzmechanismus (Erkennung des Mikroorganismus, Signaltransduktion, Akkumulation von *defense*-Chemikalien, oft nachfolgender lokaler Zelltod, der das weitere Wachstum/die weitere Vermehrung eindringender Schaderreger verhindert) ist auch nicht zu erwarten, dass die Resistenzgenprodukte selber toxikologisch bedenklich sein werden. Im Grunde ist man aber, zum Beispiel beim Getreide, auf diese theoretische Ableitung nicht angewiesen, denn das Erntegut von Sorten, die ein oder mehrere (Pilz-) resistenzgene enthalten, wird seit langem verzehrt und hat sich empirisch als unbedenklich herausgestellt.

Die Aktivierung von Resistenzgenen führt möglicherweise dazu, dass andere *defense*-Faktoren in den Pflanzen akkumuliert werden. Zu ihrem toxikologischen Potential vgl. Abschnitt 3 bis 5.

Gene, die nicht der eigenen Art oder kreuzbaren Verwandten entstammen, sind den Methoden der klassischen Pflanzenzüchtung nicht zugänglich. Trotzdem werden im folgenden nicht die Risiken der Gentechnik, sondern nur toxikologische Risiken der Genprodukte, für die die übertragenen *defense*-Gene codieren, erörtert. Zu den anderen toxikologisch und allergologisch relevanten Risikokategorien der Gentechnik vgl. die Kapitel Sekundäreffekte, Markergene und allergologische Risiken.

Die toxikologische Prüfung transgener Pflanzen steht in der Risikoforschung zeitlich nicht an erster Stelle. Bisher wurde in den meisten Freisetzungsversuchen die Stabilität der Transgenen untersucht; die Risikodebatte konzentrierte sich stark auf ökologische Gefahrenpotentiale. Deshalb (und aufgrund des Mangels an klonierten *defense*-Genen) liegen heute erst wenige aussagekräftige Untersuchungen zur Lebensmittelsicherheit transformierter Pflanzen mit neuen Resistenzeigenschaften vor. Zwei Beispiele sollen im folgenden näher erläutert werden, da sie in absehbarer Zeit auf den Markt kommen werden.

## 7. Virushüllproteine

Die OECD (1993, S.52) erörtert in ihren "Konzepten und Prinzipien zur Sicherheitsevaluierung von gentechnisch veränderten Lebensmitteln", welche Informationen zur Beurteilung von transgenen virusresistenten Nutzpflanzen vorgelegt werden müssen. Das normale Infektionsniveau in nichttransformierten Ausgangssorten und die Variation der Virusstämme sollen bestimmt werden. Da die im Erntegut enthaltenen Viren mitverzehrt werden, wird diese "Normalexposition" zur Vergleichsbasis für die Beurteilung von Transgenen, die ein Virushüllprotein exprimieren.

Quemada (1994) berichtet über eine Sicherheitsevaluierung von transgenem Kürbis. Die Vorgehensweise ist übertragbar (vgl. OECD 1993).

Der Autor stellt zunächst fest, dass die zwei Donorviren ZYMV und WMV2 in der toxikologischen Literatur nicht erwähnt werden. Es sind trotz eines üblicherweise hohen Durchseuchungsgrades im Erntegut keine Fälle von Vergiftungen oder anderen Schädigungen durch die Viren dokumentiert.

Die zwei Hüllprotein-codierenden Gene wurden leicht verändert: Das rekombinante WMV 2 ist ein Fusionsprotein aus WMV2 und den 16 aminoterminalen Aminosäuren des CMV-Hüllproteins. Im Falle des ZYMV wird ein vollständiges Hüllprotein mit einem zusätzlichen Methionin produziert. Die Autoren argumentieren, dass diese rekombinanten Proteine von den als sicher definierten Originalproteinen nicht stärker abweichen als verschiedene Virusstämme sich natürlicherweise voneinander unterscheiden.

Quantitative Messungen des "Normalbefalls" mit den zwei Viren in untransformierten Kontrollen wurden vorgenommen und dienen als Vergleichsbasis. Das Expressionsniveau der rekombinanten Hüllproteine lag mengenmässig im unteren Bereich der Schwankungsbreite bei normalen Virusbefall, d.h. die transgenen Pflanzen enthielten weniger bis gleichviel Virusprotein wie der Durchschnitt des Erntegutes.

Dieses Vorgehen wird als ausreichend beschrieben, um die Lebensmittelsicherheit der Virushüllproteine konstatieren zu können.

Bei anderen Nutzpflanzen, wie z.B. Zuckerrüben, wird angenommen, dass die rekombinanten Virushüllproteine nicht verzehrt werden<sup>22</sup>, wodurch sich die Diskussion theoretisch auf ökologische, ökonomische und ackerbauliche Gesichtspunkte, sowie auf die Futtermittelsicherheit (Rübenblatt) konzentrieren könnte.

## 8. *Bacillus thuringiensis* ssp.

Das Bodenbakterium *Bacillus thuringiensis* wird seit einigen Jahrzehnten als biologisches Kontrollagens zur Bekämpfung von Lepidopteren ausgebracht und ist in dieser Anwendung im allgemeinen als sicher zu betrachten (Dixon 1994)<sup>23</sup>. Daraus kann aber nicht direkt auf die Sicherheit transgener Nahrungsmittelpflanzen mit Bt-Toxin-codierenden Genen geschlossen werden (Goldburg und Tjaden 1990).

Die Primärstruktur der Bt-Endotoxine hängt vom jeweiligen codierenden Gen ab. Die Gene *cry I* (gegen Lepidopteren), *cry II* (gegen Dipteren und Lepidopteren), *cry III* (gegen Coleopteren) und *cry IV* (gegen Dipteren) sind in Bezug auf ihre Aminosäuresequenzen sehr homolog und gehen offenbar auf ein ursprüngliches Gen zurück (Gill et al. 1992).

Die grossen Bt-Endotoxine sind Protoxine von 130-140 kDa, die bei hohem pH von Proteasen zu aktiven Toxinen (60-70 kDa) zerlegt werden. Beim aktivierten Toxin

können drei Regionen unterschieden werden: Die N-terminale toxische Domäne, bestehend aus einigen konservierten hydrophoben Regionen, die konservierte C-terminale Region und ein wenig konservierter Abschnitt zwischen diesen beiden (Gill et al. 1992).

Im Insektendarm binden die Bt-Toxine spezifisch an bestimmte Vesikel der Apikalmembran, allerdings ist die Affinität des Toxins zum Rezeptor mit der Toxizität nicht in allen Fällen positiv korreliert (Wolfersberger 1990). Haider und Ellar (1989, zit. b. Goldberg und Tjaden) stellten fest, dass ein Toxin von *B.t. var. aizawai*, welches identisch mit dem Endotoxin von *B.t.k. strain HD1* ist, Poren in Phospholipidvesikeln formen kann. Sie schlossen daraus, dass Rezeptoren die Porenformation zwar beschleunigen, dass sie aber keine notwendige Voraussetzung der Porenbildung sind. Aktivierte Bt-Toxine durchdringen offenbar die Zellmembran und bilden wahrscheinlich nichtselektive Ionenporen. Dies bedeutet eine Zerstörung der Membranfunktion mit resultierendem Verlust des elektrischen, des Kalium- und des pH-Gradienten. Die nachfolgende Darm- und Körperlähmung führt, je nach Empfindlichkeit des betroffenen Insektes, frühestens nach ca. einer Stunde, spätestens nach sieben Tagen zum Tod (Gill et al. 1992).

Goldberg und Tjaden (1990) und andere stellten eine Reihe von Fragen, deren Beantwortung darüber Aufschluss geben kann, ob die Bt-Genprodukte bei oraler Aufnahme eine Gefahr für Säuger darstellen:

1. Haben Bt-Toxine im Intestinaltrakt von Säugern ähnliche Auswirkungen wie im Insektendarm?
2. Werden die Bt-Toxine, die im aktivierten Zustand relativ proteaseresistent sind, schnell und komplett verdaut oder muss mit der Aufnahme von intaktem Protein durch die Darmwand gerechnet werden?
3. Sind toxische Effekte in Säugerfütterungsversuchen festzustellen?
4. Ist bei Langzeitexposition mit negativen Auswirkungen zu rechnen?
5. Besitzen die CRY-Proteine ein haemolytisches Potential?

Kuiper und Noteborn (1994) haben im Rahmen eines 3-jährigen internationalen Projektes die Untersuchungen zur Lebensmittelsicherheit transgener Tomaten, die ein modifiziertes Bt-Gen aus *B. t. var. berliner 1715* exprimieren, koordiniert. Dieses Gen codiert für ein CRYIA(b) Protein. Ziel des Projektes war es vor allem, eine angemessene Untersuchungsstrategie zu etablieren. Folgende Ergebnisse sind dokumentiert:

Zu 1): Rekombinantes CRYIA(b) Protein wurde in *E. coli* produziert. Anschliessend wurde das Protein mit Trypsin und Chymotrypsin verdaut, um das aktive Toxin zu erhalten. In den Tomatenlinien selber war das Expressionsniveau mit 7,5 bis 25,4 ng/mg in der Regel zu niedrig, um genügend Untersuchungsmaterial zu gewinnen<sup>24</sup>. In Rattenfütterungsversuchen mit einer Proteinmenge, die dem Verzehr von 2000 kg transgenen Tomaten täglich äquivalent war<sup>25</sup>, wurde mit immunologischen Methoden keine Bindung des Proteins im Darmtrakt beobachtet. Histopathologische Veränderungen des Intestinaltraktes wurden nicht festgestellt.

Zu 2.) *In vivo* Untersuchungen zur Verdaulichkeit des Toxins im Magendarmtrakt von Säugern wurden bei der gleichen Bt-Aufnahmemenge ebenfalls an Ratten durchgeführt. Dem Darmtrakt der Ratten wurden Breiprobe entnommen. Mittels Immunoblotting konnten fünf Stunden nach der oralen Aufnahme keine intakten Proteine mehr nachgewiesen werden, sondern nur noch Fragmente von 20-30 kDa. Nach sieben Stunden wurden auch keine Bruchstücke mehr nachgewiesen. Dies bedeutet einen Abbau zu Peptiden < 9 kDa.

*In vitro* Versuche unter simulierten humanen gastro-intestinalen Bedingungen wurden wie folgt durchgeführt: Inkubation des Proteins bei pH 2 unter Zugabe von Pepsin;

anschliessend Wechsel zu pH 8 im Beisein von Chymotrypsin und Trypsin. Dabei wurde festgestellt, dass CRYIA(b) im menschlichen Verdauungstrakt in zwei Schritten abgebaut wird. Nach zwei Stunden bei pH 2 mit Pepsin entsteht ein 15 kDa Fragment. Beim Wechsel zu alkalischen Bedingungen entstehen Fragmente von < 10 kDa.

Zu 3): Mäuse wurden 28 Tage lang mit Dosen bis zu einem Äquivalent der menschlichen Aufnahme<sup>26</sup> von 500 kg Tomaten täglich gefüttert. Zwischen ihnen und der Kontrollgruppe wurde kein Unterschied in Bezug auf Körpergewicht, absolutes und relatives Gewicht von Leber und Niere und Blutbild gefunden. Die histopathologische Untersuchung des Magen-Darm-Traktes ergab ebenfalls keine Unterschiede. Ähnliche Versuche wurden über 31 Tage an Kaninchen durchgeführt, allerdings mit dem Äquivalent zur menschlichen Aufnahme von 60 kg Tomaten täglich. In allen oben beschriebenen Parametern wurden keine Unterschiede zwischen der behandelten und der Kontrollgruppe gefunden.

Zu 4): Schliesslich wurde eine Langzeitfütterungsstudie über 91 Tage an Ratten durchgeführt. Die als Bt-Toxin-Lieferant verwendeten Feldtomaten enthielten 7,5 ng des Proteins pro mg. Die Diät war semi-synthetisch und bei einem Drittel der Tiere mit 10% (w/w) lyophilisiertem transgenem Tomatenmaterial versetzt. Ein zweites Drittel der Tiere erhielt diesselbe Diät mit Tomatenmehl aus nicht-transgenen Kontrollpflanzen, das letzte Drittel (Kontrollgruppe) ohne Tomatenmehl. Dies entspricht einer Aufnahme von 200g Tomaten/kg Körpergewicht und ist einer Aufnahme von täglich 13 kg Tomaten durch den Menschen äquivalent. Untersucht wurden die Parameter Verhalten, Überleben, Körpergewicht, Futtermittelaufnahme, Futtermittelverwertung absolute und relative Organengewichte, Blutwerte und klinische Auffälligkeiten. Auf der makroskopischen Ebene wurden keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Die Veröffentlichung der mikroskopischen und immunologischen Daten steht noch aus.

Zu 5): Gill et al. (1987, zit. in Gill et al. 1992) fanden, dass *B.t. israelensis* mit Zellmembranen interagiert. Gill et al. (1992) diskutieren als Interaktionsort der B.t. Toxine unter anderem auch ATPasen. Da ATPasen u.a. auf der cytoplasmatischen Seite der Membranen von roten Blutkörperchen lokalisiert sind, untersuchten Kuiper und Noteborn (1994) das haemolytische Potential des CRYIA(b) Proteins. Nachdem das Protein mittels Dialyse in die roten Blutkörperchen eingeschleust wurde, wurde ein (im Vergleich zur Kontrolle mit Albumin) vernachlässigbares Ausmass an Haemolyse festgestellt.

## 9. Bewertung der toxikologischen Daten

Die Sichtung der toxikologischen Literatur ergibt, dass viele der biochemischen Stoffgruppen, die für die Resistenz von Nahrungsmittelpflanzen gegen Schaderreger verantwortlich sind, in Abhängigkeit von der Konzentration auch säugertoxisch sein können (vgl. oben und Ames und Gold 1990). Dieselben Substanzen, die in Konzentration akut toxisch oder antinutritiv sind, besitzen aber in geringerer Menge eventuell positive Gesundheitswirkungen (Thompson 1993; Prochaska et al. 1992 und Caragay 1992).

Es wurden einige Beispiele negativer Beeinflussung der Lebensmittelqualität und -sicherheit in Folge klassischer Resistenzzüchtung gegeben. Dabei muss beachtet werden, dass es sich um seltene Ausnahmen handelt. Andererseits erscheinen die zitierten gentechnisch erzeugten Virus- und Insektenresistenzen im Augenblick toxikologisch unbedenklich. Daraus wiederum kann man nicht auf eine grundsätzliche Sicherheit der molekularen Resistenzzüchtung schliessen.

Nähere Aussagen müssen für den jeweiligen Einzelfall getroffen werden.

Der Verzicht auf Resistenzzüchtung bzw. auf den Anbau resistenter Sorten ist in der Regel keine Alternative. Denn dies bedeutet nicht nur Ertragsverluste, sondern eventuell auch eine Kontamination mit extrem bedenklichen natürlichen Toxinen, insbesondere bei Pilzbefall. Massiver Insektenbefall ist zwar meist kein toxikologisches Problem, aber das Erntegut kann vollständig vernichtet, unbrauchbar oder zumindest unverkäuflich werden. In vielen (nicht in allen) Fällen sind synthetische Pflanzenschutzmittel eine Alternative zur pflanzeigenen Resistenz. Dies bedeutet im vorliegenden Zusammenhang, dass das toxikologische Potential der "endogenen Pestizide" bzw. der Fremdgene mit demjenigen der synthetischen Pestizide und mit einer eventuellen toxikologischen Implikation des Schaderregerbefalls verglichen werden muss (vgl. hierzu Ames et al. 1990b und Culliney et al. 1993 S. 129 ff)<sup>27</sup>.

## 10. Toxikologische Risiken *mangelnder* Resistenzausstattung

Anhand eines ausgewählten Beispiels, nämlich des Systems Getreide-Pilzkrankheiten, soll aber die toxikologische Relevanz mangelnder Resistenzausstattung erläutert werden, um Fehleinschätzungen des komplexen Problems "Lebensmittelsicherheit" zu verhindern (vgl. Dawson 1991).

Der weit verbreitete Pilz *Fusarium ssp.* kommt in zwanzig verschiedenen Arten vor, von denen insbesondere *F. graminearum Grp1* und *Grp2* und *F. culmorum* Getreide befallen (Blaney 1991). Deren Mycotoxine<sup>28</sup> Zeralenon und Deoxynivalenol sind zwar als nicht karzinogen eingestuft (Trucksess 1994), aber Zeralenon hat eine östrogenähnliche Wirkung, die zu Fehlgeburten und Unfruchtbarkeit führen kann (Müller und Schwadorf 1993) und die Aufnahme des Trichothecens Deoxinivalenol kann zu Durchfall, Erbrechen, Fruchtbarkeitsstörungen und Veränderungen im Blutbild führen (Wong et al. 1995). Zur Toxinproblematik bei Befall mit *Fusarium moniliforme* vgl. Visconti und Doko (1994) und Ross (1994). Ross berichtet von schweren Vergiftungserscheinungen bei Pferden und Schweinen, die klar mit einer Kontamination des Futtergetreides durch das Mycotoxin Fumonisin zusammenhängen. Rheeder et al. (1992) fanden einen mutmasslichen Zusammenhang zwischen der Fumonisinexposition und dem Auftreten von Speiseröhrenkrebs in der Transkei. In chinesischem Weizenmaterial wurden Resistenzen gegenüber *Fusarium* befall auf der Ähre gefunden, so dass eine gezielte Züchtung auf Resistenz gegenüber *Fusarium ssp.* bei Weizen möglich ist (Wong et al. 1995, vgl. Shelby 1994 für Mais).

Der Pilz *Aspergillus flavus* produziert nach heutigem Kenntnisstand das potenteste überhaupt natürlich auftretende Karzinogen: Aflatoxin B1 (Payne 1992). Mais gehört zu den hauptbetroffenen Kulturarten (Braedburn et al. 1993). *Aspergillus flavus* kann Mais sowohl auf dem Feld als auch nach der Ernte befallen. Der Befall hängt zwar in hohem Masse von der Umweltbedingungen ab (Wood 1992), aber genetische Varianzkomponenten sind nachgewiesen (Payne 1992). Damit ist das Problem einer züchterischen Bearbeitung zugänglich (vgl. auch Garg und Gupta 1989).

*Alternaria alternata* ist in einigen Gegenden der Welt der häufigste Pilz auf abreifenden Weizenähren. Das *Alternaria*-Toxin Alternariol wurde in der Hälfte der 1993 in Australien eigentlich auf *Fusarium* untersuchten Weizenproben gefunden. *Alternaria*isolates sind toxisch für Ratten, Hühner und menschliche Zellkulturen. Die Toxine sind mutagen und stehen im Verdacht, bei der Entstehung von Speiseröhrenkrebs in China eine Rolle zu spielen (Blaney 1991).

Bei mangelnder Resistenz gegenüber Schaderregern greifen konventionell wirtschaftende Landwirte, sofern geeignete Mittel zur Verfügung stehen, auf Methoden des chemischen Pflanzenschutzes zurück (vgl. Fried 1993). Insektizide haben zwar

generell eine höhere Akuttoxizität als Fungizide (Schumann 1993 S. 165), aber für 60% des geschätzten Krebsrisikos durch den Mitverzehr von Pestizidrückständen sind Fungizide verantwortlich (NAS 1987, zitiert bei Culliney et al. 1993 S. 140).<sup>29</sup> Diese relativen Zahlen lassen natürlich keine Aussage über die absolute Toxizität und das absolute Krebsrisiko zu, die Gegenstand offener Kontroversen sind (z.B. zwischen NAS und Bruce Ames, vgl. Culliney et al. 1993 S. 145). Einige dokumentierte Fälle von Vergiftungserscheinungen und Todesfällen (Kidd 1994) gehen auf falsche Handhabung von Pestiziden oder Unfälle zurück (Schuman 1993 in Pimentel und Lehman S. 106 f). In verschiedenen gründlich durchgeführten epidemiologischen Studien wurde ein erhöhtes Krebsrisiko für Landwirte nachgewiesen, die direkt mit Pflanzenschutzmitteln arbeiten (Culliney et al. 1993 S. 134 f.). Culliney et al. (1993) kommen nach Durchsicht einer grösseren Zahl von epidemiologischen Studien zu dem Schluss, dass das Krebsrisiko durch Pestizidaufnahme via Nahrungsmittel für die amerikanische Gesamtbevölkerung mit  $1 \times 10^{-3}$  eher gering ist. Die Autoren weisen aber auch darauf hin, dass das Rückstandsniveau wohl unterschätzt wird, da die in den USA eingesetzte analytische Methodik nur ca. ein Drittel der über 600 verwendeten Pestizide erfasst (die Zahlen gelten für 1988).

### Schlussfolgerungen

- Viele biochemische *defense*-Faktoren aus Nahrungsmittelpflanzen sind in hohen Konzentrationen für den Menschen toxisch oder antinutritiv. Es sind Fälle dokumentiert, bei denen klassische Resistenzzüchtung, besonders gegen Insekten, zu toxikologisch bedenklichen Konzentrationen von endogenen *defense*-Chemikalien geführt hat. Diese Fälle sind seltene Ausnahmen und betreffen Pflanzen aus Familien, bei denen Toxinbildung erwartet werden konnte. Bei den allermeisten Nahrungsmittelpflanzen, insbesondere den Getreiden, sind keine negativen Folgen für die Lebensmittelsicherheit aufgetreten.
- Die Herkunft eines Genproduktes (aus einem Nahrungsmittel vs. aus noch nie als Nahrungsmittel genutzten Organismen) gibt für sich genommen keinerlei Hinweis auf seine Lebensmittelsicherheit.
- Gentechnische Veränderungen an Nahrungsmittelpflanzen sind aus toxikologischer Sicht nicht *per se* gefährlich oder harmlos. Die Genprodukte der übertragenen Gene müssen *case by case* toxikologisch untersucht werden. Daraus lassen sich allerdings über die Unbedenklichkeit der *host*-Pflanze als Ganzes keine Schlüsse ziehen, da Sekundäreffekte nicht miterfasst werden. Vgl. hierzu Kap. V.
- Toxikologische Untersuchungen identischer *defense*-Genprodukte sind im Prinzip übertragbar, sofern einerseits das Expressionsniveau des Gens, andererseits die übliche Verzehrsmenge und die Zubereitungsart der verschiedenen *host*-Pflanzen ähnlich sind. Diese Grundsätze gelten z.B. für die Sicherheitsbeurteilungen von *Bacillus thuringiensis*-Toxinen und auch von Virushüllproteinen.
- Die konstitutive Überexpression von nicht oder nur wenig modifizierten Virushüllproteinen scheint toxikologisch unbedenklich zu sein.
- Die veröffentlichten Untersuchungen zur Verzehrssicherheit von Toxinen aus *Bacillus thuringiensis* geben bis jetzt keine Hinweise auf toxikologische Bedenken.
- Einige der vorgeschlagenen Ansätze zur gentechnischen Verbesserung des Resistenzniveaus sind toxikologisch bedenklich. Die Abschätzung von Risiken der *Genprodukte* ist mit den etablierten Methoden der Toxikologie und Medizin im Prinzip möglich. Schwierigkeiten ergeben sich bei der Beurteilung der Langzeitexposition mit subtoxischen Substanzmengen.
- Um die drei in der TA vorgegebenen Alternativen unter toxikologischen Gesichtspunkten beurteilen zu können, muss für jedes einzelne Paar (Pflanze-Schaderreger) folgendes gegeneinander abgewogen werden: Toxikologische Risiken des *defense*-Genproduktes gegenüber Risiken, die aus der Kontamination mit dem Schaderreger erwachsen und den toxikologischen Folgen der Pflanzenschutzmittelapplikation. Voraussetzung dieser Abwägung sollte sein, dass die Lösung tatsächlich relevanter Probleme des landwirtschaftlichen Pflanzenbaus angestrebt wird. Es hat selbstverständlich keinen Sinn, irgendwelche auch nur kleinen Risiken in Kauf zu nehmen, wenn das vorliegende Problem mit agronomischen Mitteln gelöst werden kann<sup>30</sup>.

**Tab.3.1: Akuttoxizität von chemischen Substanzen**

LD 50	Dosis, bei der 50% der exponierten Organismen sterben
Extrem toxische Substanz	LD 50 < 1 mg/kg Körpergewicht
Hoch toxische Substanz	LD 50 1-50 mg/kg Körpergewicht
Moderat toxische Substanz	LD 50 50-500 mg/kg Körpergewicht
Nicht toxische Substanz	LD 50 > 500 mg/kg Körpergewicht

Quelle: Shibamoto und Bjeldanes (1993)

## IV. Klassische und molekulare Resistenzzüchtung: Abschätzung des allergenen Potentials

*"Experts (...) left little doubt that the study of food allergies is a poor stepchild of immunologic research. Although problematic and sometimes deadly, food allergies remain wrapped in mystery." (Fox 1994)*

Bei der toxikologischen Untersuchung von Lebensmitteln werden eventuelle Risiken für Allergiker nicht miterfasst. Dies liegt zum einen oft daran, dass die Ursache der allergischen Reaktion auf ein bestimmtes Lebensmittel unbekannt ist. Das analytische Instrumentarium der Toxikologie kann aber nur dann sinnvoll eingesetzt werden, wenn sich definieren lässt, woraufhin eine Probe analysiert werden soll. Zum anderen sind selbst bekannte Substanzen, die Allergien auslösen können (=Allergene), keine typischen Untersuchungsobjekte der Toxikologen, denn die meisten unter ihnen sind für Nicht-Allergiker harmlos und in den üblicherweise enthaltenen Konzentrationen völlig ungiftig. Deshalb ist es notwendig, das allergene Potential von krankheits- und schädlingsresistenten Sorten als eigenständige Fragestellung zu diskutieren.

### 1. Bedeutung von Nahrungsmittelallergien

#### 1.1 Begriffe und Klassifizierung

Lebensmittelallergien haben im Gegensatz zu Lebensmittelintoleranzen eine immunologische Basis (vgl. zur internationalen Standardterminologie: Bargmann et al. 1992 S. 338-339; vgl. zu Lebensmittelunverträglichkeit: Klein 1991 S.452). Typische Lebensmittelintoleranzen sind der Lactasemangel bei Erwachsenen, der zur Milchzuckerunverträglichkeit führt, und der Favismus, bei welchem aufgrund eines erblichen Mangels an Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmte Bohnen (*Vicia faba*) nicht vertragen werden. Favismus ist mit ca. 100 Mio. Betroffenen der weltweit häufigste enzymatische Defekt (Lemke und Taylor 1994 S. 125).

Echte Lebensmittelallergien sollten nicht mit Intoleranzen verwechselt werden. Allergien sind definitionsgemäss nur solche Unverträglichkeitsreaktionen, bei denen das Immunsystem beteiligt ist.

Der Darm ist aufgrund seiner zahlreichen Immunoglobulin<sup>31</sup>-A-Antikörper eines der grössten immunologischen Organe (Brandzaeg et al. 1991). Diese Barriere kann gelegentlich von intakten, aktiven Proteinen durchbrochen werden (Gardner 1988). Sie gelangen damit in die Blutbahn und können die Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern auslösen (Sensibilisierung). Diese IgEs sind an Mastzellen oder basophile Granulozyten gebunden. Gelangt nun das allergene Protein zum zweitenmal in die Blutbahn, so lagert es sich an "seine" IgEs an. Infolge der Anlagerung werden unter anderem Histamine freigesetzt; diese prägen dann das klinische Bild (Aulepp und Viehls 1992). Man teilt die Allergien anhand des ihnen zugrundeliegenden immunologischen Mechanismus in vier Kategorien ein (Lemke und Taylor 1994 S. 119). Vgl. hierzu auch Tab. 4.1.

Lebensmittelallergien können auf Reaktionstyp I, III oder IV beruhen (Lemke und Taylor S. 117). Typ-II- Reaktionen spielen bei Nahrungsmittelallergien offenbar keine Rolle. Verschiedene Autoren weisen darauf hin, dass eine klare Einteilung in die vier Kategorien oft nicht möglich ist (Houben und Penninks 1995). In Anlehnung an

Bargmann wird deshalb in der vorliegenden Studie nur zwischen IgE-Reaktionen (Typ I) und Nicht-IgE-Reaktionen unterschieden (Bargmann 1992 S. 339).

### 1.2 Häufigkeit von Lebensmittelallergien

Die Daten über das prozentuale Auftreten von Lebensmittelallergien sind widersprüchlich. Schäfer (1995) geht von zwischen 0,8 und 2,4% Lebensmittelallergikern im Durchschnitt der deutschen Bevölkerung aus. Die geographische Herkunft, ethnische Zusammensetzung und Sozialstruktur der jeweils untersuchten Gruppe hat einen grossen Einfluss auf das Vorkommen allergischer Erkrankungen. So sind etwa in der japanischen Bevölkerung die Reis- und Sojaallergien wesentlich häufiger als in europäischen Stichproben (Bargman 1992 S. 341). Allgemein ist das Risiko, eine Allergie zu entwickeln, um so höher, je intensiver man dem entsprechenden Lebensmittel ausgesetzt ist (Schäfer 1995). Lemke und Taylor (1994) weisen aber ebenso wie Bargman (1992) darauf hin, dass die Häufigkeit echter Lebensmittelallergien von der Bevölkerung regelmässig überschätzt wird.

### 1.3 Zusammenhang zwischen Pollen- und Lebensmittelallergien

Die Zunahme der *Pollenallergien* ist in der Schweiz statistisch hochsignifikant. 1926 waren 0,82 % der Gesamtbevölkerung betroffen, bis 1991 stieg der Anteil auf 11,1% (Wüthrich 1995b). Ein Zusammenhang zwischen Pollen- und Lebensmittelallergien ist eindeutig erwiesen. Zwischen 50 und 93% der Birkenpollenallergiker entwickeln nach der Aufnahme bestimmter Lebensmittel allergische Symptome (Viehts et al. 1995). Van Ree et al. (1992) fanden in einer Gruppe von Pollenallergikern, dass bei 35% der untersuchten Patienten die vorhandenen IgE-Antikörper auch mit Extrakten aus pflanzlichen Nahrungsmitteln reagierten. Die IgE- Antikörper "erkennen" demnach ähnliche Strukturen in den Proteinen von botanisch nicht verwandten Arten (van Ree et al. 1992). Dieser Befund entspricht der Beobachtung vieler Ärzte, dass Pollenallergiker oft ein auf ein bestimmtes Cluster nicht verwandter Obst- und Gemüsearten kreuzreagieren (Van Ree et al. 1992, Wüthrich 1995a und b, Profet 1991), und zwar in der Regel beim Verzehr der rohen Pflanze. Infolge der starken Zunahme von Pollenallergien muss deshalb bei Erwachsenen in Zukunft vermehrt mit Lebensmittelallergien gegen Obst und Gemüse gerechnet werden (vgl. auch Wüthrich 1995 und Viehts 1995)<sup>32</sup>.

### 1.4 Dosiseffekte

Bei hohem Sensibilisierungsgrad eines Patienten können schon extrem geringe Mengen eines Allergens (< 1 Picogramm) heftige Reaktionen auslösen (Aulepp und Viehts 1992, vgl. auch Potter et al. 1990). Ob es Schwellenwerte gibt, bei deren Unterschreitung nicht mehr mit Immunantworten gerechnet werden muss, ist nicht bekannt (Fox 1994). Allerdings reagieren beispielsweise Patienten mit Soja-, Sonnenblumen- oder Erdnussallergie in keinem dokumentierten Fall auf die aus diesen Pflanzen gewonnenen Öle, d.h. die in den Ölen enthaltenen minimalsten Protein-Kontaminationen liegen offensichtlich unterhalb des Schwellenwertes (Bush et al. 1985).

Die Heftigkeit der allergischen Reaktionen ist dosisabhängig, sie nimmt in der Regel mit der Menge des aufgenommenen Allergens zu. Die Hauptallergene aus den Nahrungsmittelpflanzen mit hohem allergenem Potenzial liegen dementsprechend in relativ grossen Mengen vor: typischerweise machen sie zwischen 1,0% und 80% des Gesamtproteingehaltes aus (A. Hugget, pers. Information 1995).

### 1.5 Ursachen und Funktion (?) allergischer Reaktionen

Alle bis heute identifizierten Allergene sind Proteine, aber verschiedene Autoren werfen die Frage auf, ob sie alleine auch ursächlich verantwortlich sind für die allergische Reaktion (Profet 1991). Hannuksela und Haathela (1987, zit. b. Bargman 1992) weisen darauf hin, dass Nicht-Protein-Lebensmittelzusätze Reaktionen vom Typ I, also IgE-Reaktionen, hervorrufen können. Die Autoren vermuten, dass die Additive als Haptene agieren und an Carrier-Proteine gebunden in die menschliche Blutbahn eindringen.

Bei verschiedenen Pflanzenarten mit bekanntem allergenem Potential wurden hohe Konzentrationen von toxischen Phenolsäuren gefunden, insbesondere Kaffeesäure, Chlorogensäure und Neochlorogensäure. Es gibt einige Indizien für die Hypothese, dass an sich "harmlose" Proteine dieser Arten allergen werden, weil pflanzeigene toxische Phenole kovalent an sie binden. Das gebundene toxische Hapten kann durch die Nieren nicht herausgefiltert werden; es gelangt mit seinem Carrier in die Blutbahn und kann dort die Bildung von IgE-Antikörpern provozieren (Profet 1991). Diese "Toxinhypothese" unterscheidet zwischen drei funktionellen Kategorien von Allergien:

A) Die adaptive (=sinnvolle) Abwehrreaktion gegen den Carrier einer niedermolekularen toxischen Substanz.

B) Die nicht adaptive (=fehlgesteuerte) Reaktion gegen ein (ohne gebundenes Hapten harmloses) Trägerprotein.

C) Die adaptive (=sinnvolle) Abwehrreaktion gegen höhermolekulare, toxische Verbindungen/Proteine.

Die Ovalbuminfraktion aus Hühnereiern gehört zu den häufigsten Allergenen und ist an sich völlig harmlos. Die Fraktion ist allerdings ein effizienter Carrier für Haptene und wird deshalb üblicherweise bei Experimenten eingesetzt, die einen solchen Carrier erfordern (Profet 1991). Die Allergie gegen Ovalbumin an sich ist offensichtlich "maladaptiv", also funktional sinnlos (Kategorie B).

Als Beispiel für hochmolekulare Verbindungen mit toxischer Eigenwirkung (C) mögen die Lectine dienen. Die antinutritiven Effekte der Lectine sind seit langem bekannt; sie können zu beträchtlichen physiologischen Störungen bei Menschen und Haustieren führen (vgl. Kap. III). Lectine, die oft weder durch Kochen noch durch Verdauung degradiert werden können, haben ein erhebliches allergenes Potential. Manche Lectine binden an praktisch alle Typen von Säugerzellen; die am stärksten cytotoxischen sind mit der grössten Wahrscheinlichkeit auch allergen (Freed 1987). Eine allergische Reaktion auf Lectine wäre also eventuell funktionell adaptiv im Sinne von C).

Die charakteristischen Symptome der Typ-I-Reaktion - schnelles Auftreten von Niesen, Husten, Juckreiz, tränenden Augen und vermindertem Blutdruck - sind aus Sicht der Toxinhypothese sinnvolle Massnahmen, um den Gefahrstoff wieder loszuwerden bzw. seinen Transport zu lebenswichtigen inneren Organen zu verlangsamen. Da diese Symptome ausserdem als sehr unangenehm empfunden werden, ist gewährleistet, dass eine Vermeidung ihrer Ursache angestrebt wird (Profet 1991).

## 2. Nahrungsmittelpflanzen mit bekanntem allergenem Potential

### 2.1 Zusammenstellung der wichtigsten allergenen Pflanzenarten

Viehts et al. (1994, zitiert in Viehts 1995) haben die vorhandene Literatur über schwere anaphylaktische Reaktionen nach der Aufnahme von pflanzlichen Lebensmitteln zusammengestellt: Erdnuss, Haselnuss, andere Nüsse, Sellerie, Gewürze (besonders aus der Familie der *Umbelliferae*) und verschiedene Ölsaaten wie z.B. Sonnenblume,

Sesam und Mohnsamen können diese zum Teil lebensbedrohlichen allergischen Reaktionen auslösen.

Nimmt man tierische Nahrungsmittel in die Betrachtung auf, so wird deutlich, dass insgesamt nur wenige Substanzen für einen Grossteil aller Lebensmittelallergien verantwortlich sind (vgl. Tab. 4.2).

## 2.2 Bekannte Kreuzreaktionen

Die Birkenpollenallergie geht oft einher mit einer Nahrungsmittelallergie gegen rohe Äpfel, Kirschen, Aprikosen, Pfirsiche, Pflaumen, Erdbeeren und Mandeln (Rosaceae), Haselnüsse (Betulaceae), Karotten (Umbelliferae), Kartoffelschalen (Solanaceae), Walnüsse (Juglandaceae) und, in geringerer Masse, rohen Sellerie, Orangen, Erdnüsse, rohe Tomaten, Zwiebeln, Petersilie und Kokosnüsse (Profet 1991). Eine Analyse der 15 N-terminalen Aminosäurereste der Allergene aus Apfel, Kirsche, Sellerie und Karotte ergab, dass sie zwischen 28% und 67% Sequenzidentität mit der entsprechenden Region des Hauptallergens aus Birkenpollen Bet v I aufweisen (Vieths 1994,1995). Ausserdem besitzen sie zwischen 36% und 66% Sequenzidentität mit einem PR-Protein aus Petersilie (PcPR 1-1, Somssich 1988). Vieths et al. (1995) schliessen aus den vorliegenden Daten, dass alle diese Allergene vermutlich zur Gruppe der PR-Proteine gehören und eine Rolle im *defense*-Mechanismus spielen.

Beifusspollenallergiker sind gegen ein anderes Cluster sensibilisiert: sie reagieren allergisch auf rohen und gekochten Sellerie, verschiedene *Compositae* (Sonnenblumen, Kamille, Arnika, Löwenzahn und Artischocken) sowie auf einige Gewürzpflanzen (Pfeffer, Paprika, Muskat und andere) (vgl. hierzu Wüthrich 1995a).

Ca. 10-20% aller Pollenallergiker sind allergisch auf Profiline (Vieths et al. 1995). Wenn Profiline am Allergiegeschehen beteiligt sind, ist eine grosse Anzahl an Kreuzreaktionen zu erwarten. Valenta et al. (1991) wiesen nach, dass Profiline aus verschiedenen Pflanzenfamilien hochkonserviert, also strukturell ähnlich sind und gemeinsame IgE-bindende Epitope<sup>33</sup> besitzen; Profilin wird deshalb von diesen Autoren als Panallergen bezeichnet (Valenta et al.1991). Profiline sind im Pflanzenreich ubiquitär und haben möglicherweise eine Funktion bei der Signaltransduktion. Van Ree et al. (1992) isolierten ein allergenes Profilin aus dem Pollen von *Lolium perenne* und fanden, dass Blutserum mit Antikörpern gegen dieses Profilin eine positive Kreuzreaktion auf Sellerie- und Kartoffel-Extrakte zeigte. Das Nahrungsmittelallergen Mal d 1 aus Apfel gehört selbst zur Gruppe der Profiline. In Sellerie und Tomaten wurden ebenfalls Profiline als Allergene identifiziert (Vieths et al. 1995)<sup>34</sup>.

## 2.3 Einfluss von Sorte und Umwelt auf das allergene Potential von Nahrungsmitteln

Offenbar hängt das allergene Potential einer Pflanzenart auch von der verzehrten Sorte und vom Reifegrad ab. Die Apfelallergie wurde beispielsweise erst nach Markteinführung der beiden Sorten Granny Smith und Golden Delicious Ende der 60er Jahre zu einem klinisch auffälligen Phänomen (Aulepp und Vieths 1992). Manche Apfelallergiker vertragen klassische Sorten wie Cox Orange, Berlepsch, Goldparmäne, Boskop und Gravensteiner (Aulepp und Vieths 1992).

Das Hauptallergen der Birkenpollen Bet v 1 und das 17,5 kD Apfelallergen Mal d 1 weisen gemeinsame IgE-bindende Epitope auf (Ebner et al. 1991). Golden Delicious enthält 1-5 mg des Mal d 1 Allergens pro 100g Frischgewicht.

Vieths et al. (1995) untersuchten auch die Kreuzreaktion der Profilin-Extrakte verschiedener Apfelsorten und stellten signifikante Unterschiede fest.

Der Zusammenhang zwischen Apfelsorte, Gehalt an Mal d 1 und Allergenizität ist aber noch nicht restlos aufgeklärt.

### 3. Identifizierte und charakterisierte Allergene aus Nahrungsmittelpflanzen

#### 3.1 Allgemeine Charakteristika von identifizierten Nahrungsmittelallergenen

Die meisten der identifizierten Allergene aus Lebensmitteln sind wasserlösliche, säurestabile Glycoproteine mit Molekulargewichten zwischen 18'000 und 70'000 kD (Lemke und Taylor 1994 S. 121 und Fox 1994). Bargman et al. (1992 S. 353) geben 10'000 Dalton als Untergrenze für die Fähigkeit an, eine Immunantwort auszulösen. Kleinere Moleküle können als Haptene agieren, was bedeutet, dass sie an ein Carrierprotein gebunden werden; dieser Komplex ruft dann die allergische Reaktion hervor (Bargman 1992 S. 353). Bei Molekulargewichten über 80'000 ist offenbar die intestinale Absorption nicht mehr möglich: die Substanz gelangt nicht in die Blutbahn und also nicht in Kontakt mit IgE-Antikörpern.

Der Glykosylierungszustand eines Proteins hat einen entscheidenden Einfluss auf seine Allergenizität (Sanchez-Monge et al. 1992, vgl. Garcia-Casado et al 1995).

Säureresistenz führt in Verbindung mit der Widerstandskraft gegenüber Verdauungsenzymen dazu, dass die entsprechenden Proteine im Magen nicht abgebaut werden. Allergene Proteine sind teilweise sehr hitzestabil: diejenigen aus Soja, Erdnuss, Milch und Fisch werden beim Kochen nicht degradiert, wohingegen die Allergene aus Früchten oft hitzelabil sind (vgl. Lemke und Taylor 1994 S. 121).

Eine umfassende Übersicht über die Stabilität bekannter Allergene gegenüber Hitze, Säure und enzymatischer Hydrolyse geben Viehls et al. (1995).

#### 3.2 Identifizierte Allergene mit mutmasslicher oder bekannter *defense*-Funktion

Die Tabelle 4.3 gibt einen Überblick über diejenigen Allergene, die möglicherweise oder erwiesenermassen im Zusammenhang mit der pflanzeigenen Pilz-, Insekten- und Virusabwehr stehen.

Wie Tabelle 4.3 zeigt, gibt es Hinweise darauf, dass ein Zusammenhang zwischen dem *defense*-Status der Pflanzen und ihrem allergenen Potential nicht ausgeschlossen werden kann.

#### *$\alpha$ -Amylase-Inhibitoren*

Barber et al. (1989) fanden in Gerste ein 14,5 kDa Protein, das die  $\alpha$ -Amylase von Insekten hemmt und gleichzeitig ein Hauptallergen ist. Dieses 14,5 kDa  $\alpha$ -Amylase Protein reagiert mit IgE-Antikörpern aus dem Serum von Bäckerasthma-Patienten. Ein homologes 13,5 kDa-Protein aus Roggen zeigte in Tests mit den Seren von Bäckerasthmapatienten ein grösseres allergenes Potential als das Gerstenprotein, hatte allerdings selber keine inhibitorische Wirkung auf  $\alpha$ -Amylase (Garcia-Casado et al. 1995). Aus der  $\alpha$ -Amylase-Familie des Weizens stammen die Hauptallergene des Bäckerasthmas (Garcia-Casado et al. 1995). Bäckerasthma ist keine Nahrungsmittelallergie, denn die allergische Reaktion tritt nach der *Inhalation* von Mehlstaub auf. Schata (1995) berichtet aber, dass allergische Reaktionen auf die hitzestabile  $\alpha$ -Amylase auch nach *Verzehr* von Brot und anderen Gebäcken beobachtet werden. Ausserdem wird das Bild dadurch kompliziert, dass die  $\alpha$ -Amylase aus *Aspergillus oryzae* ein gebräuchlicher Mehlzusatzstoff mit eigenem, relativ hohem Potential als Nahrungsmittelallergen ist.

Izumi et al. (1992) klonierten ein Hauptallergen aus Reissamen, das Sequenzhomologien mit dem Inhibitor für heterologe  $\alpha$ -Amylase aus Weizen (40%) sowie mit den Trypsin-Inhibitoren aus Gerste (20%) und Mais aufweist. Das

Vorratsprotein aus der Castor-Bohne gehört ebenfalls zur  $\alpha$ -Amylase/Trypsin-Inhibitor-Familie (Izumi et al. 1992).

Es ist eindeutig erwiesen, dass die meisten Mitglieder der  $\alpha$ -Amylase/Trypsin-Inhibitor-Familie *in vitro* IgE-Bindungskapazität besitzen. Ihr allergenes Potential weist *in vivo* eine beträchtliche Variationsbreite auf, wobei die glycosylierten Komponenten die reaktivsten Allergene sind (Sanchez-Monge et al. 1992 und Garcia-Casado et al. 1995).

Für die  $\alpha$ -Amylase aus *Aspergillus oryzae* ist die Hitzestabilität nachgewiesen (Schata 1995).

### **Lectine**

Die zweite Gruppe potentiell allergener Substanzen, die gleichzeitig eine Rolle bei *defense*-Prozessen spielen, sind die Lectine. Wie Tabelle 4.3 zu entnehmen ist, sind Lectine mit diesen Eigenschaften aus der Erdnuss und aus verschiedenen Weizen (-verwandten) isoliert worden. Lectine sind bekannte anti-nutritive Substanzen, die in höheren Konzentrationen auch für Nicht-Allergiker problematisch sind (vgl. Kapitel III).

Die häufigste allergische Reaktion auf Weizen ist Zöliakie, eine Nicht-IgE-Allergie. Typischerweise werden bei Zöliakie<sup>35</sup> auch Antikörper gegen das Weizenlectin WGA (wheat germ agglutinin) gefunden: Brandtzaeg et al. (1991) stellen fest, dass IgG- und IgA-Antikörper gegen WGA für Zöliakie genauso spezifisch sind wie diejenigen gegen Gliadin (S. 46). WGA ist sehr resistent gegen Hitze und Säuren, d.h. es wird weder beim Kochen noch durch die Verdauung zerstört (Pusztai 1993).

WGA ist andererseits ein Weizenlectin mit hervorragender Wirkung gegen Insekten, dessen Übertragung in anfällige Arten erwogen wird (Huesing et al. 1991, Pusztai et al. 1993). Vom Genuss solcher transgener Pflanzen müsste Zöliakiepatienten genauso abgeraten werden wie vom Verzehr der meisten Getreide. WGA ist in den Dosen, die einen *defense*-Effekt vermitteln, vermutlich auch für Nicht-Allergiker toxisch (vgl. Pusztai et al. 1993 und Kapitel III).

### **3.3 Identifizierte Allergene mit struktureller Verwandtschaft zu *defense*-Genen**

Das Hauptallergen aus Birkenpollen Bet v I wurde von Breiteneder et al. (1989) charakterisiert. In Birkenpollen aus schadstoffbelasteten Industriegebieten wurde eine signifikant grössere Menge Bet v I gefunden als in Pollenproben aus ländlichen Gegenden (Scheiner 1992). Dieses Expressionsmuster ist vielleicht eine Teilerklärung dafür, dass Menschen in Industriegebieten wesentlich häufiger unter Birkenpollenallergie leiden als Vergleichsgruppen aus ländlichen Räumen. Swoboda et al. (1994 und 1995) berichten, dass es sich bei Bet v I um eine Genfamilie handelt, zu der auch pathogen-induzierbare Gene gehören. Die Proteinsequenz von Bet v I ist zu 55% identisch mit derjenigen des PR-Gens I49 aus Erbsen (Fristensky et al. 1988), das durch *Fusarium solani* und *Pseudomonas syringae* induziert wird, und zu 44% mit derjenigen eines PR-Proteins aus Bohnen (*Phaseolus vulgaris*) Walter et al. 1990).

Bet v I und pI49 gehören ebenso wie die PR-Gene aus Bohnen, Kartoffeln und Petersilie zu einer strukturell eng verwandten Proteinfamilie, die Van Loon et al. (1994) als PR-10 Familie mit "nuclease-ähnlichen" Eigenschaften bezeichnen.

Das Bet v I Allergen ist relativ verdauungsstabil, und die vorliegende 44%-Homologie zwischen Bet v I und PvPR 1/2 ist zum Beispiel ausreichend gross, um den Verdacht naheulegen, dass es sich bei dem Bohnen-PR-Protein selbst um ein Lebensmittelallergen handeln könnte (Dr. Erika Jensen-Jarolin, Institut für Experimentelle Pathologie AKH Wien/Erweiterungsbau Ost Währinger Gürtel 1090 Wien Tel.: 40400-5131, Fax 40400-5130, mündl. Auskunft am 3. August 1995).

Scheiner (1992) gibt einen Überblick über klonierte Allergene, die eine Sequenzhomologie zu PR-Proteinen aufweisen.

Eine Veränderung des Expressionsmusters (z.B. konstitutiv statt pathogeninduziert) oder des Expressionsniveaus von PR-Proteinen dieses Typs müsste deshalb von einer gründlichen immunologischen Untersuchung des gewonnenen Produktes begleitet werden.

#### 4. Prüfung und Abschätzung des allergenen Potentials von "defense"-Genen

Zur *ex ante* Abschätzung des allergenen Risikos von krankheits- und schädlingsresistenten Nutzpflanzen mit neu eingeführten Genen muss ein Katalog von Eigenschaften und Methoden vorliegen, anhand dessen das Genprodukt beurteilt werden kann. Die oben dargestellten, relativ neuen Erkenntnisse über die molekularen Strukturen und die Ähnlichkeitsverhältnisse von Allergenen liefern nun die Grundlage für eine Annäherung an dieses Problem.

Bei der Sicherheitsevaluierung genetisch modifizierter Nahrungsmittelpflanzen in Bezug auf ihre Risiken für Allergiker muss zunächst die *Genquelle* betrachtet werden (diese und alle folgenden Informationen ohne direkte Referenzangabe: A. Hugget, pers. Information am 27/7 1995).

Man unterscheidet drei Kategorien von Genquellen<sup>36</sup>:

1. Die Genquelle ist ein Nahrungsmittel mit hohem allergenem Potential
2. Die Genquelle ist ein Nahrungsmittel mit geringem allergenem Potential oder ein nicht als Nahrungsmittel genutzter Organismus mit bekanntem allergenem Potential
3. Die Genquelle hat kein dokumentiertes allergenes Potential.

In jedem Fall gilt, dass die DNA- und Aminosäuresequenzen der interessierenden Proteine bekannt sein müssen. Der Sequenzvergleich via Datenbank (GenBank/EMBL/GenPept/SwissProt/PIR) mit allen bekannten Allergenen gibt einen ersten Hinweis auf eventuelle allergene Eigenschaften. *Neue* Allergene können so nicht identifiziert werden. In der Regel sind T-Zellen-bindende Epitope zwischen 8 und 12 Aminosäuren lang, B-Zellen-spezifische Epitope tendenziell etwas länger (man nimmt an, dass T-Zellen-Epitope linear sind, während diejenigen von B-Zellen konformationale sind, aber es gibt einige Ausnahmen).

Dies bedeutet, dass eine immunologisch signifikante Sequenzidentität sich über mindestens 8 Aminosäuren erstrecken muss. Findet sich diese Sequenzidentität nicht, so teilt das infragestehende Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit kein lineares Epitop mit bekannten Allergenen. Sogenannte diskontinuierliche Konformationsepitope, die von der Tertiärstruktur des Allergens abhängen, können mit dieser Methode nicht identifiziert werden. Bei der Interpretation von Sequenzvergleichen ist deshalb Vorsicht geboten: Auch strukturell total verschiedene Proteine haben manchmal kurze, ähnliche Aminosäuresequenzen, die sowohl für Kreuzreaktionen als auch für die allergische Reaktion an sich verantwortlich sein können (Fox 1994). Auf der anderen Seite können engst verwandte Proteine ein sehr unterschiedliches allergenes Potential haben. Zum Beispiel ist das Tropomyosin aus Shrimps allergen, die sehr ähnlichen Tropomyosine aus Huhn und Rind dagegen überhaupt nicht (Fox 1994).

Ausserdem werden sich bei einfachen Sequenzvergleichen viele "falsch positive" Identitäten zwischen konservierten Regionen verschiedener Proteine finden, die mit deren eventueller Allergenität nichts zu tun haben<sup>37</sup>.

Das weitere Vorgehen im Evaluierungsprozess hängt nun von der Genquelle ab (s.o. Kategorien 1-3).

#### **4.1 Die Genquelle ist ein Nahrungsmittel mit hohem allergenem Potential**

Welche Nahrungsmittelpflanzen, -tiere oder -mikroorganismen darunter genau zu verstehen sind, muss festgelegt werden. Sicher werden die Urheber der häufigsten und der schweren Nahrungsmittelallergien hier einzuordnen sein (vgl. Tab. 4.2 und Viehts 1995).

Die im folgenden skizzierten Tests müssen unabhängig vom Ergebnis des Sequenzvergleichs durchgeführt werden (denn es ist bei negativem Ergebnis nicht auszuschließen, dass es sich bei dem infragestehenden Protein um ein bisher unbekanntes Allergen der Pflanze mit "neuen" allergenen Proportionen handelt).

Sera von mindestens 30 Patienten mit sicher dokumentierter Geschichte allergischer Reaktionen auf die infragestehende Pflanze werden in quantitativen Tests<sup>38</sup> auf ihre immunologische Reaktion mit dem isolierten Protein untersucht. Sobald ein positives Ergebnis auftritt, muss die Kennzeichnung des Produktes unter Angabe der Genquelle erwogen werden<sup>39</sup>.

Sind alle Reaktionen negativ, so werden *in vivo*-Tests durchgeführt. Bei mindestens 30 Patienten, die bekanntermassen allergisch auf die Genquelle reagieren, werden Hautritztests durchgeführt. Wiederum sollte schon 1 positives Ergebniss zur Kennzeichnung führen.

Falls alle 30 Patienten keine Reaktion auf das zu untersuchende Protein zeigen, kann die Standardmethode DBPCFC<sup>40</sup> durchgeführt werden; es sollen mindestens 10 Patienten getestet werden. Bei einer (oder mehreren) positiven Reaktionen muss ein Labeling erwogen werden.

Falls alle diese Tests negativ waren, lässt sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit sagen, dass das infragestehende Protein *nicht* das Allergen ist, aufgrund dessen die Pflanze in die Kategorie "mit hohem allergenem Potential" eingeordnet wurde.

#### **4.2. Die Genquelle ist ein Nahrungsmittel mit geringem allergenem Potential oder ein nicht als Nahrungsmittel genutzter Organismus mit bekanntem allergenem Potential**

*In vitro* Analysen sollen durchgeführt werden wie unter 1, falls genügend Patientensera (mindestens 5) zur Verfügung stehen. Wenn mindestens ein Serum positiv mit dem infragestehenden Protein reagiert, muss eine Kennzeichnung erwogen werden<sup>41</sup>.

Wenn weniger als 5 Seren verwendet wurden oder die Ergebnisse negativ waren, müssen die Charakteristika des Proteins untersucht werden. Gastrische und intestinale Verhältnisse können simuliert und die Abbaugeschwindigkeit des Proteins betrachtet werden. Falls die Zielpflanze nie roh verzehrt wird, spielt auch die Hitze- und Verarbeitungsstabilität des Proteins eine Rolle. Wenn das infragestehende Protein dem proteolytischen Abbau sowie Kochprozessen etc. widersteht und >1% des Gesamtproteins ausmacht, muss ein Labeling erwogen werden<sup>42</sup>.

In diese Kategorie gehört das Beispiel der transgenen Sojabohnen, die mit einem 2S-Albumin der Paranuss (*Bertholletia excelsa*) transformiert wurden, um den Gehalt an Methionin und Cystein zu steigern<sup>43</sup> (Nordlee et al. 1995). Der Verzehr von Paranüssen kann für die betroffenen Allergiker lebensbedrohlich sein. Neun verschiedene Seren von Paranussallergikern standen für RAST-Inhibitions-Tests zur Verfügung. Die Untersuchungen ergaben, dass es sich bei dem übertragenen Protein um ein bisher unbekanntes Hauptallergen der Paranuss handelt. (Ein vor Beginn der Transformationsexperimente durchgeführter Tierversuch ergab keine Hinweise auf Allergenizität des Paranussproteins). Infolgedessen müssten bei einer Vermarktung der

transgenen Sojabohne auch alle Folgeprodukte mit der Information "enthält Proteine der Paranuss" gekennzeichnet werden.

#### **4.3. Die Genquelle hat kein dokumentiertes allergenes Potential**

Wenn das interessierende Gen aus einem Organismus stammt, über dessen Allergenizität nichts bekannt ist, können in Ermangelung von Patientensera keine immunologischen Untersuchungen durchgeführt werden. Wenn sich ferner auf DNA- und Proteinebene keine Sequenzidentität mit bekannten Allergenen zeigt, kann das Protein auf "verdächtige" Eigenschaften wie Resistenz gegen proteolytischen Abbau, Säure- und Hitzestabilität untersucht werden. Die abgeleitete Aussage kann nur sein, dass keine Ähnlichkeit mit *bekannt* Allergenen vorliegt. Verlässliche Methoden zur prospektiven Untersuchung "neuer" Proteine auf Allergenizität stehen nicht zur Verfügung (Nordlee et al. 1995, Fox et al. 1994).

#### **4.4 Die "Zielpflanze" ist für ihr allergenes Potential bekannt**

In diesem Fall muss überprüft werden (z.B. per ELISA), ob das Expressionsniveau des bekannten Allergens sich aufgrund der Genübertragung verändert hat<sup>44</sup>.

### **5. Anwendung der dargestellten Prinzipien auf marktreife gentechnisch veränderte Nutzpflanzen**

Verschiedene DNA- und Proteinsequenzen der Toxine aus *Bacillus thuringiensis* sowie die Herbizidresistenzmarker CP4, EPSPS, PAT und GOX und der Antibiotikaresistenzmarker NPTII wurden mit den Sequenzen aller bekannten Allergene verglichen; es ergaben sich keine Ähnlichkeiten. Die Genquellen wurden der Kategorie 3 zugeordnet: keine dokumentierte Geschichte als Auslöser von Lebensmittelallergien. Infolgedessen steht für keines der Proteine Patientenserum zur Verfügung. Unter simulierten gastrischen Verhältnissen blieben die Markerproteine weniger als 15 Sekunden stabil, die B.t.-Toxine bis zu einer halben Minute. Die Prozentanteile am Gesamtprotein liegen zwischen <0.01% und <0.1% (A. Hugget, pers. Information am 27/7/1995).

Wendet man das vom IFBC vorgeschlagene Entscheidungsprozedere auf diese Daten an, so muss (jedenfalls solange die Betrachtung auf allergene Risiken beschränkt ist) kein Labeling erwogen werden.

### **Schlussfolgerungen**

- Der molekularen Züchtung steht die Gesamtheit aller Organismen als Genquelle zur Verfügung, während die klassische Züchtung auf kreuzbare Verwandte mit in der Regel ähnlichem allergenem Potential beschränkt ist. Die gezielte Veränderung des Expressionsmusters arteigener Gene in einer Weise, wie sie innerhalb der natürlichen Variation nicht gefunden wird, ist ebenfalls nur mit gentechnischen Methoden möglich. Das Risiko unerwarteter Allergien ist deshalb beim Einsatz gentechnischer Zuchtmethoden generell grösser als in der klassischen Züchtung.
- Für die Beurteilung potentieller allergener Risiken ist die Genquelle ausschlaggebend.
- Ist für die "Zielpflanze" ein allergenes Potential nachgewiesen, so muss untersucht werden, ob es sich durch die Transformation verändert hat.
- Einige Genprodukte, die nachweislich insektizide oder antifungale Wirkung haben, sind Lebensmittelallergene. Einige PR-Proteine aus Pflanzen weisen mittlere bis grosse Homologie zu identifizierten Allergenen auf. Ein Zusammenhang zwischen dem *defense*-Status der Pflanze und ihrem allergenem Potential kann in manchen Fällen nicht ausgeschlossen werden.
- Die Methodik zur Überprüfung des allergenem Potentials von in Frage stehenden Genprodukten greift nur, wenn Allergien gegen die Genquelle dokumentiert sind und Blutserum von Allergikern zur Verfügung steht. Die Übertragung bekannter Allergene kann mittels der zur Verfügung stehenden Testmethoden ausgeschlossen werden.
- Eine Vorhersage des eventuellen allergenem Potentials von Proteinen, die noch nie oder noch nicht in den jetzt angestrebten Mengen Bestandteil der menschlichen Ernährung waren, ist nicht möglich. (Hier besteht allerdings kein prinzipieller Unterschied zur Unvorhersagbarkeit allergischer Reaktionen auf neu eingeführte Gesamtpflanzen wie z.B. die Kiwifrukt, gegen die einige Patienten nach mehrfacher Exposition Allergien entwickelten).

**Tabelle 4.1: Typen allergischer Reaktionen (Typ I-IV)**

Reaktionstyp	Mechanismus	Klinisches Beispiel
Typ I	vermittelt durch IgE-Antikörper	Anaphylaktischer Schock
Typ II	vermittelt durch IgG oder IgM Antikörper; Aktivierung des Komplementsystems	Milchinduzierte neonatale Thrombozytopenie (?)
Typ III	Immunkomplexe aus IgG und lösl. Antigenen; Aktivierung des Komplementsystems	Bei Kindern: induzierte Alveolitis
Typ IV	vermittelt durch spezifisch sensibilisierte T-Lymphozyten	

Quelle: nach Aulepp und Viehls (1992), verändert. (?) im Original.

**Tabelle 4.2: Zusammenstellung der zehn wichtigsten allergenen Lebensmittel**

Allergene Lebensmittel (verantwortlich für über 60% der Lebensmittelallergien bei Kindern)	Allergene Lebensmittel (gemeinsam mit den Substanzen der linken Spalte verantwortlich für 90% der Lebensmittelallergien bei Erwachsenen)
Erdnuss Soja Weizen Kuhmilch Hühnerei Fisch	Nüsse (verschiedene) Meeresfisch und Krustentiere Früchte (z.B. Äpfel) Gemüse (z.B. Sellerie, Karotten)

Quelle: Schäfer (1995) und A. Hugget, pers. Information am 27/7/1995

Tabelle 4.3: Allergene mit mutmasslicher oder bekannter *defense*-Funktion

Pflanze	Datenbank nummer (Ref.Nr.)	Allergen	Bemerkungen: Homologien und evtl. Zusammenhang mit Resistenzreaktionen
Erdnuss	S14765 (13)	Lectin-reaktives Glycoprotein	Pilz- und Insekten?
Soja	X80039 (11)	Kunitz-Trypsin-Inhibitor	Insekten?
Weizen (14): <i>T.aestivum</i>	M25536 (1) S25537 (2)	WGA A (Lectin) WGA D "	Insekten "
<i>T.durum</i>	J02961 (3)	WGA "	"
<i>T.turgidum</i>	S19296 (4)	16 kDa	$\alpha$ -Amylase-Inhibitor
Reis	X66257 (5a,b)	16 kD Protein	Homologie zu $\alpha$ -Amylase-Inhibitoren aus Weizen, Trypsin-Inhibitor aus Gerste, Speicherprotein der Castorbohne. Insekten?
Gerste	S26197 (6) (7)	Hor v I (15 kDa)	$\alpha$ -Amylase/Trypsin-Inhibitor
Apfel	X83672 (10)	Mal d 1 (17,5 kD): Profilin	Homologien zu PR-Protein aus Erbse, Stress-induziertem Protein aus Soja, (Bet v I): Pilze?
Kidneybohne ( <i>P.vulgaris</i> )	S11929 (8) S11930 (9)	PR 1 PR 2	Pathogenesis-related "

(1,2): Smith und Raikhel 1989  
 (3): Raikhel und Wilkins 1987  
 (4): Sanchez-Monge et al. 1992  
 (5a): Izumi et al. 1992  
 (5b): Matsuda et al. 1995  
 (6): Mena et al. 1992

(7): Astwood et al. 1995  
 (8,9): Walter et al. 1990  
 (10): Schoening et al. submitted, Viehts et al. 1995  
 (11): Gotor et al., submitted to the Databases in July 1994  
 (13): Young et al. 1991  
 (14): Wright und Raikhel 1989

**Tabelle 4.4: Identifizierte Allergene mit struktureller Verwandtschaft zu *defense*-Genen**

Allergen	Homologe PR-Proteine* (alle aus der Familie PR-10 nach van Loon et al. 1994)	Referenzen
Mal d 1 (Nahrungsmittelallergen)	pl49/pl176 (Erbse)	Schoening et al. subm. Viehts et al. (1995) Fristensky et al. (1988)
Bet v I (Pollenallergen)	pl49 (Erbse) PvPR1/2 (Bohne)**	Breiteneder et al. (1989) Walter et al. (1990) Fristensky et al. (1988) Swoboda et al. (1994, 1995)
Aln g I (Pollenallergen)	PcPR1-1 (Petersilie)	vgl. Scheiner (1992) Somssich et al. (1988)
Cor a I (Pollenallergen)	pl49/pl176 (Erbse) STH2 (Kartoffel)	vgl. Scheiner (1992) Fristensky et al. (1988) Matton and Brisson (1989)

\* Die homologen PR-Proteine weisen *untereinander* Homologien zwischen 37% und 64% auf (Walter et al. 1990).

## Kapitel V: Unbeabsichtigte pflanzenphysiologische Veränderungen: Sekundäreffekte der Genübertragung

Unerwartete Phänomene, die nach einer Genübertragung auftreten, werden Sekundäreffekte genannt. Sie sind in der Regel deshalb unerwartet -und damit unbeabsichtigt- weil sie entweder nichts mit dem *Genprodukt* zu tun haben oder weil die nun als Sekundäreffekte wahrgenommenen "Nebenwirkungen" des Genproduktes vor der Transformation nicht bekannt waren.

Die Einzelübertragung von Genen, welche an nicht vorhersagbarer Stelle ins Genom integriert werden, ist typisch für den gentechnischen Transfer in der molekularen Züchtung. Die klassische Züchtung arbeitet meist nicht mit der Integration von Einzelgenen, sondern in der Regel mit der Auswahl günstiger Allele<sup>45</sup> an schon vorhandenen Loci (Regal 1994). Beim Einkreuzen von Resistenzgenen aus verwandten Wild- oder Kulturarten bleibt ein Teil des Donorgenoms und insbesondere das direkte Umfeld des interessierenden Gens auch bei langjähriger Rückkreuzung erhalten (Allard 1992). Hierin liegt der Hauptunterschied zum molekularen Transfer von Resistenzen.

Nach der Transformation von genetisch identischem Pflanzenmaterial mit dem gleichen Konstrukt finden sich oft grosse Unterschiede zwischen den Nachkommen. Dies kann auch hinsichtlich der Menge des gebildeten Genproduktes und der Stabilität der Genexpression gelten. Mögliche Ursachen sind:

- Positionseffekte
- Kopienanzahl
- Somaklonale Variation
- Pleiotropie
- Umwelteinflüsse

### 1. Positionseffekte und *insertional mutagenesis*

#### 1.1 Positionseffekte

Alle bekannten Verfahren des Transfers von Genen in pflanzliche Genome sind in bezug auf den Integrationsort dieser Gene weitgehend unspezifisch (Wobus 1994 S. 175). Da aber das Genom einen grossen und bislang kaum verstandenen Einfluss auf die Expression eines Gens ausübt, liefern diese Unterschiede im Integrationsort eine (Teil-)erklärung für die Variation zwischen unabhängigen Transformanden<sup>46</sup>. Meistens ist das Expressionsmuster des eingeführten Gens in der Pflanze qualitativ korrekt, während die quantitative Variation der Genexpression in der Regel beträchtlich ist (Breyne et al. 1992).

Peach und Velten (1991) untersuchten die quantitative Variation in der Expression der Reportergene Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) und  $\beta$ -Glucuronidase (GUS). Die Gene für CAT und GUS wurden gekoppelt unter der Kontrolle zweier *mas*-Promotoren mittels *Agrobacterium tumefaciens* in Tabak eingebracht. Die Aktivität der Genprodukte im Kallusgewebe wurde analysiert, wobei sich zwischen den einzelnen Klonen Schwankungsbreiten in der Enzymaktivität um den Faktor 136 (CAT) und 175 (GUS) ergab. Die Autoren nehmen an, dass positionsabhängige Modifikationen der Promotorfunktion eine primäre Ursache dieser Variabilität in der Genexpression sind.

Goldsbrough et al. (1993) untersuchten den Einfluss von Positionseffekten bei transgenen Tomaten. Ein Transformationssystem mit Elementen des Ac/Ds-Transposonsystems aus Mais erlaubt es, die Position des Transgens im Zielgenom *nach* erfolgter Integration zu verändern. Es ergab sich eine klare Positionsabhängigkeit der Aktivität des Reportergens GUS.

Topping et al. (1991) untersuchten das Aktivitätsniveau von GUS in transgenem Tabak. Sie versahen ihr Konstrukt mit einem veränderten, "abgeschwächten" 35S-Promotor. Man geht davon aus, dass das umliegende Genom einen grösseren Einfluss auf die Expression des Transgens hat, wenn der Promotor schwach ist. Deshalb sollten die hier aufgetretenen Schwankungen der GUS-Aktivität um das 300-fache hauptsächlich auf Positionseffekte zurückzuführen sein. Um sicherzugehen, dass die Variation auf Positions- und nicht auf *copy number* Effekten beruht, untersuchten die Autoren 18 zufällig aus der Transformationspopulation gewählte Pflanzen mit je nur einer *single locus* Kopie. Jede dieser unabhängig transformierten Einzelpflanzen hatte ein individuelles GUS-Expressionsmuster; die GUS-Aktivität in den Blättern schwankte um das 450-fache.

Breyne et al. (1992) kamen bei ihren Untersuchungen zur Konfiguration der T-DNA zu dem Schluss, dass die Aktivität des transferierten Gens von der benachbarten DNA direkt beeinflusst wird. Dean et al. (1988) fanden hingegen, dass ein flankierendes 23 kb DNA Stück die Variabilität in der Expression des eingeführten Gens nicht verringern konnte.

Auch die sogenannte "Transinaktivierung" von vorhandenen oder transferierten Genen (durch neu eingeführte Gene mit Sequenzhomologien zu den schon vorhandenen Genen) ist offenbar positionsabhängig. So fanden Neuhuber et al (1994), dass identische Gene, die an verschiedenen Stellen ins Genom eingebaut wurden, unterschiedlich anfällig für *transgene inactivation* sind. Es zeigte sich also, dass die Stabilität der Expression ebenfalls von der Position des Fremdgens abhängt<sup>47</sup>.

Im Gegensatz zur normalen Gameten-DNA fehlen der "Fremd-DNA" zum Zeitpunkt der Transformation alle für die Zielpflanze typischen Modifikationen und Chromatinstrukturen. Stabil integrierte Fremd-DNA zeigt aber "normale" Chromatinstrukturen. Es ist möglich, dass die flankierenden Regionen der *host*-DNA den "Endzustand" des Transgens beeinflussen, aber ebenso kann die Fremd-DNA vor der Integration mit Chromatin-Proteinen interagieren, zufällig und unabhängig von der "Position" (Peach und Velten 1991). Dass die DNA-Methylierung das Expressionsmuster eines Transgens beeinflussen kann, ist klar erwiesen (Matzke et al. 1989).

Fujiwara und Beachy (1993) bearbeiteten ein speicherproteincodierendes Gen der Sojabohne, das für seine relative Unabhängigkeit von Positionseffekten bekannt ist. Sie klonierten DNA-Teilstücke dieses Gens in ein GUS-Konstrukt, aber die Übertragung der Positionsunempfindlichkeit gelang nicht.

Um unerwünschte Positionseffekte ausschliessen zu können, werden Methoden zur Steuerung der Genintegration gesucht.

Dale und Ow (1991) berichten von einem Ansatz zur homologen Rekombination bei Pflanzen. Hierbei sollen die Fremdgene an definierbaren Stellen ins pflanzliche Genom eingebaut werden. Die Methode ist bis jetzt nicht verfügbar.

McBride et al. (1995) gelang die gezielte homologe Insertion eines Gens in die Chloroplasten-DNA von Tabak. Sie brachten ein unverändertes *cryIA(c)*-Gen aus *Bacillus thuringiensis* unter die Kontrolle eines konstitutiven ribosomalen RNA-Operon-Promotors und konstruierten damit einen Vektor, der ausserdem homologe Regionen flankierender Tabakplastiden-DNA enthielt. Dies erlaubte eine zielgenaue Integration des Bt-Gens zwischen zwei Tabakloci, so dass Positionseffekte ausgeschlossen werden können.

## 1.2 Insertional mutagenesis

Unter *insertional mutagenesis* versteht man die Veränderung oder Zerstörung eines pflanzeigenen Gens durch die Integration des Fremdgens. Redenbaugh et al. (1992), die Autoren der "Calgene-Studie" über die Sicherheitsevaluierung der FLAVR SAVR-Tomate, argumentieren, dass die Wahrscheinlichkeit der nicht-letalen Zerstörung eines wichtigen Pflanzengens sehr gering sei<sup>48</sup>. Sie schliessen dies unter anderem daraus, dass weniger als 5% des Genoms von typischen landwirtschaftlichen Nutzpflanzen funktionsfähige Gene enthalten. Ausserdem, so die Autoren, lägen vielfach Genfamilien vor, die aus 5-10 funktionalen Mitgliedern bestehen, so dass der Ausfall eines Einzelgens sich wahrscheinlich im Phänotyp nicht manifestieren werde. Topping et al. (1991) stellen allerdings fest, dass Fremdgene meistens in aktives (transkribiertes) oder kompetentes (transkribierbares) Chromatin eingebaut werden, was die Wahrscheinlichkeit einer Mutation natürlich erhöht. Innerhalb dieser Genomabschnitte ist die Integration dann offenbar zufällig.

Die Zerstörung eines endogenen Gens durch die Integration von T-DNA am entsprechenden Locus ist möglich (Feldman et al. 1989, Van Lijsebettens et al. 1991, Errampalli et al. 1991, Walbot 1992, Behringer und Medford 1992) und wird zur Genisolierung durch *gene-tagging* benutzt.

Van Lijsebettens et al. (1991) fanden in 110 transgenen *Arabidopsis*-Linien eine rezessive Mutation, die sehr wahrscheinlich durch die Integration der T-DNA ausgelöst wurde. Feldman et al. (1989) konnten nach T-DNA-"Tagging" eine *dwarf*-Mutante von *Arabidopsis* isolieren, deren Entstehung klar auf *insertional mutagenesis* zurückgeht. Von 136 untersuchten T3-Familien zeigten 36 Familien mendelsche Aufspaltung für sichtbare Merkmale. Da die Autoren keimende Samen transformierten und infolgedessen ohne Gewebekulturschritt auskamen, können diese unterschiedlichen Phänotypen nicht auf somaklonale Variation (vgl. unten) zurückgehen. Wären alle 36 Varianten Insertionsmutanten, so hätten 19% der Inserts Mutationen ausgelöst.

Redenbaugh et al. (1992) verweisen in der FLAVR SAVR-Studie darauf, dass das Genom der Tomate zehnmal grösser als dasjenige von *Arabidopsis* ist; damit sei die Wahrscheinlichkeit, dass durch die Integration einer T-DNA eine Mutation entsteht, entsprechend geringer. Feldman et al. (1989) beschreiben darüber hinaus den geringen Anteil repetitiver Sequenzen im Arabidopsisgenom (10-14%) als Vorteil für die gewünschte Mutationsauslösung durch T-DNA-Tagging.

Dies bedeutet, dass die Gefahr von *insertional mutagenesis* in Kulturpflanzen entsprechend geringer ist als bei *Arabidopsis*. Ausgeschlossen werden kann sie nicht. *Insertional mutagenesis* kann theoretisch auch zur Aktivierung "schweigender" Gene führen. Die Weltgesundheitsorganisation WHO sieht in der Aktivierung stillgelegter Stoffwechselwege, die in nahe verwandten Wildarten oder auch in nicht verzehrten Teilen der Kulturpflanze noch existieren, die grösste potentielle Gefahr für die Lebensmittelsicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen (WHO 1991 S. 33). Diese weitere Möglichkeit von *insertional mutagenesis* besteht vor allem bei einer schwachen oder abwesenden Terminationssequenz des eingeführten Gens. Das dann eventuell auftretende Phänomen des Durchlesens könnte ein vorher nicht transkribiertes Gen, zum Beispiel für einen toxischen Sekundärstoff, aktivieren (Redenbaugh et al. 1992 S. 210).

Bei der Sicherheitsevaluierung der FLAVR SAVR-Tomate wurde dieses Problem untersucht. Die mRNA der transgenen Tomaten wurde mit der codierenden Sequenz des eingeführten Gens (der "Sonde") hybridisiert ("northern blots"); damit wird sichtbar, ob die RNA des Transgens der erwarteten Grösse entspricht. Ein Durchlesen

wäre aufgrund wesentlich grösserer Banden zu identifizieren (vgl. Redenbaugh et al. 1992 S. 98 ff).

## 2. Anzahl integrierter Genkopien

Wieviele Kopien eines Gens in das Zielgenom integriert werden, hängt unter anderem von der Transformationsmethode ab. Die Transformation mittels *Agrobacterium tumefaciens* führt meist zur Integration einer kleinen Anzahl von entweder tandemartig aufgereihten oder nicht gekoppelten Kopien (van der Hoeven et al. 1994), während bei den direkten Methoden<sup>49</sup> eng gekoppelte<sup>50</sup> multiple Integrationen häufig sind (De Block 1993). Dies bedeutet, dass bei direktem Gentransfer sehr viele unabhängige Transformationen durchgeführt werden müssen, um Pflanzen mit der gewünschten geringen Kopienzahl zu erhalten, denn die enge Kopplung erlaubt kein einfaches "herauskreuzen" überzähliger Kopien (De Block 1993).

Topping et al. (1991) zitieren Berichte über positive und negative und in der Mehrzahl Berichte über fehlende Korrelationen zwischen der Anzahl der integrierten Kopien und der Höhe der Genexpression.

Hobbs et al. (1990) fanden in ihren eigenen Untersuchungen an *Agrobacterium*-transformiertem Tabak eine klar negative Beziehung zwischen der Kopienanzahl und der Höhe der Genexpression. Zwei nicht allele Kopien des Transgens reduzierten seine Expression deutlich. Van der Hoeven et al. (1994) sowie Gendloff et al. (1990) berichten hingegen von positiven Korrelationen zwischen der Anzahl eingeführter Gene und dem Expressionsniveau des Genproduktes.

Ein Ansatz zur Reduzierung der gegenseitigen inhibitorischen Effekte bei hoher Kopienanzahl ist es, das Fremdgen mit einer sogenannten *scaffold attachment region* (SAR; Allen et al. 1993) zu flankieren. Allen et al. beschreiben ihre Hypothese für die Funktion der SARs wie folgt: "...SARs definieren unabhängige Domänen, in denen Chromatinstrukturen höherer Ordnung unabhängig von denjenigen der Umgebung bestimmt werden. Darüberhinaus reduzieren die SARs möglicherweise den Einfluss... regulatorischer Elemente am Ort der Genintegration." Die Autoren transformierten *N. tabacum* per ballistischer Methode mit einem Konstrukt aus GUS, flankiert durch zwei SARs. Die Kopienanzahl war aufgrund der gewählten direkten Methode hoch; bei einer Anzahl von zwischen 30 und 40 Kopien konnte die GUS-Expression durch die SARs erheblich gesteigert werden; ausserdem war sie konstanter (verglichen mit der Kontrolltransformation ohne SARs). Die Autoren interpretieren diesen Befund als eine Reduzierung der inhibitorischen Effekte, die normalerweise durch hohe Kopienzahlen ausgelöst werden.

Bei der relativ neuen Methode der Chloroplastentransformation führt die grosse Anzahl (ca. 10.000) zu einem hohen Expressionsniveau des Transgens (McBride et al. (1995).

### 3. Somaklonale Variation

Unter somaklonaler Variation versteht man Veränderungen, die während einer *in vitro* Kultur vegetativer Zellen, also Zellen des Sporophyten, auftreten oder über sie fassbar werden (Hess 1992 S.127f.). Diese Veränderungen können genetisch oder epigenetisch<sup>51</sup> bedingt sein. Sie können als Punktmutationen oder als strukturelle und numerische Veränderungen der Chromosomen auftreten und auch komplexe, polygen vererbte Merkmale betreffen (Wobus 1994 S.165). Somaklonale Variation ist eine Methode der "klassischen" Mutationszüchtung: schon diese Einordnung macht deutlich, dass genetische Veränderungen in der Gewebekultur geradezu erwartet werden. Somaklone von Tomate, Kartoffel und Zuckerrohr werden als Sorten genutzt (Wobus 1994 S. 165). Die genetische und biochemische Basis der Veränderungen ist allerdings oft nicht bekannt (Wobus 1994 S. 166). Ausser eventuell gewünschten Mutationen finden sich meist auch in grösserem Umfang Negativmutationen. Dies ist bei manchen Kulturarten auch ohne zusätzliche Anwendung molekularer Transformationstechniken als eine mögliche Quelle von Risiken für die Lebensmittelsicherheit einzuschätzen (Hess 1992 S. 134).

Die somaklonale Variation tritt bei allen Transformationsprozessen mit Gewebekulturschritt auf (De Block 1993). Peach und Velten (1991) fanden bei ihrer quantitativen Analyse der Expression von CAT und GUS unter der Kontrolle zweier *mas*-Promotoren eine *intraclonale* Variation um den Faktor 3-4. Sie kann weder mit Positions- noch mit Kopienzahl-Effekten erklärt werden, denn alle Zellen eines Klones gehen auf einen einzigen transformierten Protoplasten zurück; die Reportergene liegen infolgedessen in allen Zellen mit der gleichen Kopienzahl an der gleichen Stelle vor. Deshalb wird die gemessene intraklonale Variation mit somaklonalen Effekten erklärt.

Eine umfassende Studie zur somaklonalen Variation (ohne gentechnische Transformation) führten Rietveld et al. (1991) an Kartoffeln durch. Sie verglichen ihre aus *tuber discs* gewonnene somaklonale Population (die also einen Gewebekulturschritt durchlaufen hat) mit einer Vergleichspopulation derselben Sorte aus Stecklingen. Bei 16 von 22 untersuchten agronomisch bedeutenden Merkmalen wichen die Populationsmittel signifikant und heritabel voneinander ab.

Dale and McPartlan (1992) verglichen in Feldversuchen transgene, aus *tuber discs* regenerierte Kartoffeln mit ebenso hergestellten, untransformierten Kontrollen sowie mit Pflanzen aus Stengelschnitten. Bei den Regeneraten aus Knollenscheiben war in beiden Fällen somaklonale Variation festzustellen. Für alle untersuchten Merkmale waren die Mittelwerte niedriger und die Varianzen meist höher als bei den Regeneraten aus Stengelschnittkultur, bei der keine ungeordnete Kallusphase durchlaufen werden musste. Pflanzenhöhe und Ertrag waren allerdings bei den Transformierten geringer als bei den Knollenscheiben-Kontrollen; dies deutet zusätzlich auf Effekte der verwendeten Reportergene hin<sup>52</sup>.

In einigen Ländern müssen neuangemeldete Genotypen von gewebekultur-geeigneten Arten im Laufe des Zulassungsverfahrens auch toxikologisch untersucht werden. Dies ist insbesondere dann von Bedeutung, wenn (wie bei den Solanaceen) toxische Inhaltsstoffe gebildet werden, und die somaklonale Variation zu ihrer unbeabsichtigten Erhöhung führen könnte.

#### 4. Pleiotropie

"Pleiotropie" ist ein Ausdruck aus der klassischen Genetik, der die (züchterisch "unbeabsichtigten") Auswirkungen eines Gens auf ein scheinbar unabhängiges Merkmal bezeichnet, der also multiple phänotypische Konsequenzen eines Einzelgens oder -allels beschreibt: *"It is now understood in principle that such effects are all related as consequences of complex interactions among biochemical and developmental processes (...) effects appear distinct only if we do not understand the connection between them"* (Gottlieb und Vienne 1988). Korrelationen zwischen verschiedenen Merkmalen haben oft Pleiotropie<sup>53</sup> als genetische Ursache. Kopplung, die andere mögliche Ursache, tritt besonders in Kreuzungspopulationen aus sehr divergenten Elternstämmen auf (Falconer 1984 S. 394). Da Pleiotropie auf der phänotypischen Ebene beobachtet wird, bleibt ihre genetische Ursache meistens ungeklärt<sup>54</sup>.

Die generelle Bedeutung der Pleiotropie für die Sicherheit gentechnisch veränderter Lebensmittel wird kontrovers diskutiert. Redenbaugh et al. (1992 S.208) sind ebenso wie die Autoren der WHO-Studie (1991)<sup>55</sup> ohne nähere Begründung der Auffassung, dass pleiotrope Effekte im allgemeinen in der Gentechnik keine grössere Rolle spielen als in der klassischen Züchtung: *"The probability of incurring pleiotropic effects relevant to food safety as a result of genetic engineering process is low and likely not significantly different than the probability of pleiotropic effects resulting from other plant breeding techniques"* (Redenbaugh et al. 1992 S.228). Im Gegensatz dazu vertritt Regal (1994) die Ansicht, dass klassische Pflanzenzüchter die ihnen unterstellte Erfahrung mit pleiotropen Effekten von neu eingeführten Genen gar nicht haben können, da sie überwiegend an *vorhandenen* Genorten "Wildtypallele" durch agronomisch günstige Allele ersetzen. Selbst sogenannte weite Kreuzungen seien nur unter relativ eng verwandten Arten möglich und, wegen der sehr grossen genetischen Ähnlichkeit von Kulturpflanzen aus derselben Familie, quasi "konservativ". *"...in fact both evidence and theory do suggest that pleiotropic effects are and should commonly, though not always, be greater in transgenic than in normal forms.(...) The bizarre nontarget effects commonly and indisputably seen in transgenic organisms may in theory be caused by many factors (s.oben, d. Verf.), not simply pleiotropy (...). In any case, the result and the concern is similar; new factors may be added to the host's biochemical milieu and cause quantitative or qualitative changes in the output of existing biochemical pathways. Systematic research would very much help to develop a body of precise knowledge about the side-effects so commonly produced by genetic engineering"* (Regal 1994).

Die Gegenüberstellung dieser direkt widersprüchlichen Auffassungen soll illustrieren, dass die Diskussion im Augenblick noch weitgehend theoretisch geführt wird. Bei der Sicherheitsbeurteilung gentechnisch veränderter Sorten muss generell beachtet werden, dass die Wahrscheinlichkeit nachteiliger pleiotroper Effekte von Fall zu Fall unterschiedlich hoch ist. So gibt es einzelne Gene, für die eine pleiotrope Wirkung auf viele "unverwandte" morphologische Merkmale geradezu charakteristisch ist (vgl. Dehio und Schell 1993, Dehio et al. 1993). Auch im Ansatz von Smigocki et al. (1993) zur Erhöhung der Insektenresistenz wird Pleiotropie erwartet und ist sozusagen der Kerngedanke des Experiments: Das eingeführte bakterielle *ipt*-Gen erhöht den Cytokininspiegel. Die Autoren gehen davon aus, dass infolgedessen das Expressionsniveau verschiedener, nicht näher identifizierter Sekundärmetaboliten erhöht wird, die ihrerseits dann insektentoxisch sind.

Ein klassisches Beispiel pleiotroper Effekte gelangte 1969/70 in den USA ins öffentliche Bewusstsein. In den 50er und 60er Jahren begann dort der grossflächige Anbau

von Maishybriden, wobei 85% der Hybridsorten das sogenannte Texas-Cytoplasma enthielten. Texas-Plasma verleiht der jeweiligen Trägerpflanze männliche Sterilität. Diese Sterilität erlaubt eine ökonomischere Herstellung von F1-Hybriden, denn das mechanische Entfernen der männlichen Blütenstände bei den "Müttern" entfällt. Die damit möglich gewordene Einsparung teurer Handarbeit lässt unmittelbar einleuchten, warum das Texasplasma schnell weite Verbreitung fand. 1969/70 kam es dann, absolut unerwartet, zu einer epidemieartigen Ausbreitung der Krankheit *Southern corn leaf blight*, von der Maissorten mit "normalem" Plasma praktisch nicht befallen werden. (Der Erreger dieser Krankheit *Bipolaris maydis* Rasse T, früher *Helminthosporium maydis* ist ebenso wie auch *Phyllosticta maydis* nur auf Texasplasmapflanzen virulent). Ein Mitochondriengen<sup>56</sup>, das sogenannte *T-urf13*, ist verantwortlich für die männliche Sterilität. Sobald aber *T-urf13* aktiv wird, tritt nicht nur die Sterilität, sondern auch die Krankheitsanfälligkeit auf. Umfassende Untersuchungen führten zu dem Schluss, dass die beiden Merkmale nicht zu trennen sind und gleichermassen auf das Genprodukt von *T-urf13* zurückgehen (Levings und Siedow 1992). Das gebildete URF13 Protein führt in Anwesenheit des *B. maydis*-Toxins zur Bildung von Poren in der Mitochondrienmembran. Resistente Maislinien sind also nicht aufgrund eines aktiven Mechanismus geschützt, sondern einfach deshalb, weil sie kein URF13 bilden (vgl. auch Chasan 1995). Mit solchen (negativen) pleiotropen Auswirkungen eines Gens muss im Prinzip immer gerechnet werden, solange die Biochemie des Genprodukts und der beteiligten Stoffwechselwege nicht vollkommen aufgeklärt ist. Pleiotrope Effekte sind also letztlich oft nicht voraussehbar.

Allard (1992) berichtet von einem über 40-jährigen Grossversuch mit Gerste, der mit *near isogenic lines* (NILs) durchgeführt wurde und dessen Ziel es war, die Effekte einzelner Allele eines Locus (in diesem Fall für Resistenz gegenüber *Rhynchosporium secalis*) auf verschiedene quantitative Merkmale abzuschätzen. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass in allen Fällen statistisch signifikante Additiveffekte auf mehrere quantitative Merkmale auftraten; dies kann bedeuten, dass die untersuchten Loci nicht nur für "ihr" diskretes Merkmal kodieren, sondern auch zu verschiedenen quantitativen Merkmalen beitragen<sup>57</sup>.

Hilder und Gatehouse (1991) untersuchten die Folgen einer Übertragung des Gens für den Trypsin-Inhibitor der Kuhbohne (CpTI) in Tabakpflanzen (vgl. Hilder et al. 1987). Sie verwendeten ein *sense*-Konstrukt mit dem CaMV 35S Promotor sowie ein "*antisense*"-Konstrukt, bei dem das Trypsininhibitor-Gen der Kuhbohne in umgekehrter Orientierung mit dem Promotor verbunden wurde. Die Untersuchungen wurden an Nachkommenschaften der primären Transformanten ausgeführt. Als Kontrolle dienten untransformierte Pflanzen. Die Autoren fanden signifikante Unterschiede zwischen den Transgenen und den Kontrollen in einigen morphologischen, vegetativen und reproduktiven Merkmalen. Dies ist auf Effekte der Gewebekultur, "*disruption*" des *host*-Genoms oder die Expression des Markergens zurückzuführen, aber nicht auf die Expression des Trypsin-Inhibitors, da *sense*- und die "*antisense*"-Pflanzen im gleichen Masse von der untransformierten Kontrolle abwichen. Der Prozess der Transformation selber (mit der anschliessenden Regeneration) kann also Auswirkungen auf wichtige Merkmale haben, während die *Expression* des Fremdgenprodukts in diesem Fall nicht zu zusätzlichen pleiotropen Effekten und auch nicht zu Ertragsverlusten führte. Die Autoren weisen aber darauf hin, dass unter unkontrollierbaren Umweltbedingungen (Feld) und bei züchterisch intensiver bearbeiteten Kulturen evtl. mit grösseren "Nebenwirkungen" zu rechnen ist. Die Ergebnisse von Van den Elzen et al. (1993) scheinen diese Überlegung zu stützen. Die Autoren transformierten die Kartoffelsorten Bintje und Escort mit einem Gen für Virushüllprotein-Bildung. Die erhaltenen PVX-resistenten Sorten wurden auf

ihre Ähnlichkeit mit den jeweiligen Ausgangssorten untersucht. Nur 18% der Bintje-Transformanden und 82% der Escortpflanzen behielten den sogenannten *true type*<sup>58</sup> bei, also diejenigen Charakteristika der Sorte, die für die beschreibenden Sortenlisten erfasst werden. Diese Beobachtung lässt natürlich keine Aussage darüber zu, ob es sich bei den Ursachen für die Abweichung nur um Pleiotropie oder auch um somaklonale Variation und andere der oben diskutierten Effekte handelt; sie zeigt aber, dass verschiedene Sorten unterschiedlich "transformationsstabil" sind.

## 5. Genetische und Umwelt-Stabilität transgener Pflanzen<sup>59</sup>

Bei der Risikobeurteilung transgener Pflanzen wird auch immer wieder diskutiert, inwieweit Umwelteffekte das Fremdgenprodukt beeinflussen können bzw. ob mit der Stabilität der Genexpression über Generationen hinweg gerechnet werden kann.

Dymock et al. (1991) zogen transgene Kartoffeln in der Klimakammer und untersuchten deren Blätter. Sie fanden, dass die Expression eines bestimmten GUS-Konstruktes bei *in vitro* kultivierten Pflanzen völlig anders sein kann als bei denselben, aber auf Boden gewachsenen Pflanzen. Die Kulturbedingungen haben also einen grossen (reversiblen, nicht-heritablen) Einfluss auf die Expression des Fremdgens.

Van den Hoeben et al. (1994) fanden bei 140 GUS-transformierten Tabakpflanzen unter der Kontrolle des *par*-Promotors, die alle auf ein einzelnes Transformationsereignis zurückgehen, eine beträchtliche Variation über die Zeit. Bei wiederholten Messungen über 18 Monate fanden sie je Einzelpflanze Schwankungen im Expressionsniveau um 15-175%.

Dehio und Schell (1993) mutagenisierten 360'000 mit dem leicht screenbaren Gen *rolA* transformierte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen mit EMS (Ethyl-Methan-Sulfonat). Nur 12 Pflanzen mutierten zurück zum Wildtyp. Sie trugen eine rezessive *loss of function mutation* am *rolA*-Locus. Dehio und Schell schliessen daraus, dass die Transformation stabil ist, weil sonst unter dem starken EMS-Stress eine grössere Anzahl von Rückmutationen hätte gefunden werden müssen.

In den USA wurden bis 1995 über 3'000 Feldversuche mit transgenen Pflanzen durchgeführt, ohne dass Berichte die über eine Inaktivierung des Transgenes veröffentlicht worden wären (Brandle et al. 1995).

In Deutschland wurde bei einem Freisetzungsversuch mit Petunien, die ein Transgen aus Mais enthielten, eine Abhängigkeit der Transgenexpression vom Alter der Ausgangspflanze und von Umweltfaktoren festgestellt (Meyer et al. 1992). Im Gewächshaus zeigten die transgenen Petunien ein wesentlich geringere Variabilität.

Eine französische Untersuchung an Tabak ergab, dass Co-Suppression zwischen einer transferierten Nitratreduktase und den endogenen Nitratreduktasen im Feld bei bis zu 60% der Homozygoten auftraten, während diese Co-Suppression im Gewächshaus unter bestimmten Umweltbedingungen verzögert wurde (Dorlhac de Borne et al. 1994).

Transgener chlorsulfuronresistenter Tabak mit einem homozygot vorliegenden Gen aus *Arabidopsis* erwies sich in Gewächshausversuchen als stabil und einheitlich resistent gegenüber Chlorsulfuron. Das eingeführte Fremdgen codiert ein mutiertes, chlorsulfuronstabiles Enzym (Acetohydroxyacidsynthase), dessen herbizidempfindliche Form im Tabak endogen vorliegt. In Feldversuchen hatten jedoch

bis zu 59% der homozygoten Pflanzen diese Herbizidresistenz verloren<sup>60</sup>. Schwer herbizidgeschädigte und unversehrte Kontrollpflanzen wurden vom Feld ins Gewächshaus gebracht, geselbstet und die Nachkommenschaft untersucht. Alle Sämlinge waren herbizidresistent, die Eigenschaft war also heritabel (unabhängig vom Phänotyp der Elternpflanzen). Ein Verlust des Transgens (wie auch Unterschiede im Methylierungszustand) konnten damit ausgeschlossen werden, so dass offenbar nur *die Expression* des Transgens von den Feldbedingungen behindert wurde. Um die Frage zu klären, warum Pflanzen unter Feldbedingungen die Herbizidresistenz verlieren, während sie sich im Gewächshaus als stabil erwies, wurde die normale agronomische Praxis des Feldtabakanbaus analysiert: Die Samen werden im Gewächshaus angezogen und dann versetzt. Je vorsichtiger das Umtopfen vonstatten geht, desto grösser ist der Anteil von Pflanzen, die die Herbizidresistenz verlieren; werden sie jedoch gar nicht umgetopft, so bleibt die Resistenz erhalten. Das Auftreten von Co-Suppression ist also unerwarteterweise abhängig von der Behandlung der jungen Pflanzen (Brandle et al. 1995).

Hart et al. (1992) fanden bei transgenem Tabak mit einer eingeführten Chitinase genau dasselbe Phänomen: Die Co-Suppression wurde verursacht durch ein Umtopfen der Sämlinge.

Die Stabilität der Expression und Aktivität von Transgenen wird also eindeutig von vielen, auch unerwarteten Faktoren beeinflusst.

### Schlussfolgerungen

- Im Augenblick sind viele Einflussfaktoren der Genexpression nicht direkt beherrschbar und nicht vorhersehbar: "Only a few plants from a transgenic population will behave in the expected way" (De Block 1993). Die meisten Autoren stellen fest, dass eine grosse Anzahl unabhängiger Transformationen ausgeführt werden muss. Die resultierenden Transformanden unterscheiden sich aus im Augenblick letztlich ungeklärten Ursachen voneinander. Aus dieser Transformationspopulation werden diejenigen Pflanzen ausgewählt, die den Vorstellungen vom erwünschten Pflanzentypus in agronomischer, morphologischer und biochemischer Hinsicht entsprechen (vgl. Dale and McPartlan (1992), Van den Elzen et al. (1993) Belknap et al. (1994)).
- Dieses Vorgehen eignet sich im Prinzip, um unerwünschten Auswirkungen von Positionseffekten, somaklonaler Variation und *insertional mutagenesis* zu begegnen. Die Schwierigkeit liegt jedoch darin, dass ein morphologisch und in einigen biochemischen Hauptsubstanzen normaler Phänotyp keine sichere Aussage über mögliche "kleine" Veränderungen zulässt: " ...it is likely that insertion mutagenesis also causes more subtle changes in the phenotype" (Dale und McPartlan 1992).
- Es liegen nur wenige systematische Untersuchungen zu den pleiotropen Effekten von *defense*-Genen vor. Ob infolge der Verwendung gentechnischer Methoden generell mehr oder grössere pleiotrope Effekte zu erwarten sind als in der klassischen Züchtung, ist im Augenblick noch Gegenstand wissenschaftlicher Kontroversen. *Case by case* Überlegungen sind notwendig, da sowohl das spezifische Genprodukt als auch die jeweilige Zielpflanze einen grossen Einfluss auf die Ausprägung pleiotroper Effekte haben.
- Die hier dargestellten Untersuchungen zu den Sekundäreffekten der molekularen und klassischen Resistenzzüchtung sind im Sinne der Lebensmittelsicherheit nicht direkt zu interpretieren. Es gibt nach unserer Kenntnis bis heute keine Berichte über gesundheitsgefährdende "Nebenwirkungen" von molekularen Ansätzen zur Resistenzsteigerung.

# Kapitel VI: Lebensmittelsicherheit selektierbarer Marker

## 1. Einführung

### 1.1 Nutzung und Verbreitung

Die Notwendigkeit, neben dem gewünschten Gen auch ein sogenanntes Markergen in die Zielpflanze zu transformieren, ergibt sich aus der in aller Regel sehr niedrigen Transformationseffizienz (Fralely 1989). Um die erfolgreich transformierten Pflanzen von den Wildtypen<sup>61</sup> unterscheiden zu können, wird zusätzlich zum eigentlich interessierenden Gen ein sogenanntes Markergen in den Transformationsvektor kloniert. Ein Markergen zeichnet sich dadurch aus, dass die Wirkung seines Genproduktes in der Zielpflanze leicht nachzuweisen ist, während die Expression des Hauptgens oft erst mittels aufwendiger Analysen, nach künstlicher Infektion oder im adulten Stadium nachgewiesen werden kann.

Es gibt grundsätzlich zwei verschiedene Typen von Markern, nämlich selektierbare und diagnostizierbare Marker (Bowen 1993). Für die Standardanwendungen der Gentechnik werden selektierbare Marker benötigt. Selektierbare Marker erlauben dem transgenen Organismus, auf einem sogenannten Selektionsmedium zu überleben, während die nicht erfolgreich transformierten Wildtypen eingehen.

Zwei Gruppen selektierbarer Marker sind von Bedeutung: Antibiotikaresistenzen und Herbizidresistenzen. Selektierbare Marker arbeiten grundsätzlich auf eine der drei folgenden Weisen (Bowen 1993, S. 95)<sup>62</sup>:

- 1) Entgiftung des Selektionsagens durch Enzymmodifikation
- 2) Expression eines modifizierten Proteins mit geringerer Affinität zum Selektionsagens
- 3) Überexpression des Wildtypgens und vermehrte Synthese des Zielproteins

Die Tabellen 6.1 und 6.2 geben einen Überblick über die am häufigsten eingesetzten Selektionsmarker.

Gene, die Resistenzen gegen Aminoglycosidantibiotika verleihen, spielen im Moment bei der Transformation von dikotylen Nahrungsmittelpflanzen die bedeutendste Rolle (Flavell 1992, Ritchie and Hodges 1993 S. 149-154).

Das Gen *aph 3'-II* aus *E.coli* codiert für das Protein Aminoglycosid-3-Phosphotransferase II (APH(3')II), auch Neomycin-Phosphotransferase (NPTII) genannt, welches die Antibiotika Kanamycin und Neomycin durch Phosphorylierung inaktiviert (vgl. Shaw et al. 1993). Die Anwesenheit von NPTII ist in den nächsten Jahren bei den meisten kommerziell genutzten, gentechnisch veränderten Dikotylen zu erwarten (Flavell 1992, Ritchie and Hodges 1993 S. 149-154). Die WHO geht davon aus, dass die bis Ende der Dekade zugelassenen transgenen Kartoffeln (*Solanum tuberosum*) und Zuckerrüben (*Beta vulgaris*) alle mit Kanamycin/Neomycinresistenz<sup>63</sup> ausgestattet sein werden (WHO 1993 S. 25). Für die Nutzung der Kanamycinresistenz als Selektionsmarker bei Monokotylen finden sich in der Literatur ebenfalls Beispiele (vgl. Ritchie und Hodges S. 153-154). Natürliche Kanamycin-Resistenzen sind allerdings besonders unter den Gräsern, zu denen auch die Getreidearten gehören, weit verbreitet (Hauptmann et al. 1988). Bei der Transformation der monokotylen Arten Weizen (*Triticum aestivum*) und Mais (*Zea mays*) wird deshalb hauptsächlich mit dem Herbizidresistenzgen *bar* gearbeitet (WHO 1993 S. 25), während Reis (*Oryza sativa*) meist mit einer Hygromycin-Resistenz ausgestattet wird (WHO 1993 S. 25). Herbizidresistenzen spielen aber auch bei dikotylen Kulturarten eine Rolle. So sind zum

Beispiel etliche transgene Brassicaceen mit Glyphosat- oder Glufosinat-Resistenz ausgestattet<sup>64</sup>.

## 1.2. Lebensmittelsicherheit von Markergenen

Bei der Evaluierung der Lebensmittelsicherheit sowohl von Antibiotika- als auch von Herbizidresistenzmarkern muss untersucht werden, ob die Produkte der Markergene toxisch oder potentiell allergen sind<sup>65</sup>. Im Falle der Verwendung von Antibiotikaresistenzen ist ausserdem von Belang, ob die Wirksamkeit therapeutisch verabreichter Antibiotika dadurch eingeschränkt wird und ob funktionsfähige DNA, die für das inaktivierende Markerenzym codiert, auf die Darmflora bzw. auf im Körper vorhandene Pathogene übertragen werden kann.

## 2. Antibiotikaresistenzgene

Resistenzen gegen die Aminoglycosid-Antibiotika Kanamycin, Neomycin und Hygromycin sind im Moment von vorherrschender Bedeutung als Markergene. Alle Antibiotika dieser Gruppe können beim Menschen zu Taubheit und Nierenfunktionsstörungen führen. Ausserdem sind weitverbreitete Resistenzen auf Pathogenseite festgestellt worden (WHO 1993 S. 4, vgl. auch Levy et al. 1988). In der Humantherapie sind die Aminoglycosid-Antibiotika deshalb inzwischen weitgehend durch neuere Antibiotika ersetzt worden<sup>66</sup>, während ihr Einsatz in der Tiermedizin zum Teil noch beträchtlich ist<sup>67</sup>. In den Zellen anfälliger Pflanzen unterbinden die Aminoglycosid-Antibiotika die Proteinsynthese (Waldron et al. 1995; Nap et al. 1992).

### 2.1 Toxikologie der Antibiotikaresistenzgene

Die Weltgesundheitsorganisation ist der Auffassung, dass Antibiotikaresistenzgene im Hinblick auf ihre Funktion, also ihre enzymatische Aktivität, und nicht anhand ihrer Struktur evaluiert werden sollten, da sie keinerlei Verwandtschaft mit bekannten toxischen Proteinen aufweisen (WHO 1993 S.9). Folgende Argumente oder Untersuchungen wurden zur Sicherheitsevaluierung von NPTII herangezogen:

1. Die Aufnahme von Kanamycinresistenzgenen- und genprodukten findet seit geraumer Zeit statt. Bakterien auf rohem Gemüse und Salat sind die Hauptquellen. Flavell et al. (1992) gehen von  $1,2 \times 10^6$  täglich aufgenommenen kanamycin-resistenten Mikroorganismen aus. Diese "natürliche" Kanamycin-Resistenz beruht mindestens zum Teil auf dem Gen *npt II*. Flavell et al. (1992) schliessen daraus, dass es sich bei diesem Resistenzmarker für den Menschen nicht um ein "neues" Produkt handelt.
2. Unter simulierten gastrischen und intestinalen Bedingungen wurde das Enzym sehr schnell zerlegt und innerhalb von 20 Minuten total abgebaut (Fuchs et al. 1993 und Calgene 1990, zitiert bei Redenbaugh et al. 1994). Die Fütterung von Wiederkäuern mit transgenem Tomatenmehl führte nicht zu negativen Effekten (Flavell et al. 1992). Fuchs et al. (1993) verabreichten Mäusen 8 Tage lang eine NPTII-Dosis von 5000mg/kg Körpergewicht. Um die äquivalente Menge NPTII aufzunehmen, müsste ein Mensch ca. eine Million transgene Tomaten pro Tag verzehren. Die Autoren stellten weder morphologische noch physiologische Veränderungen an den Tieren fest.
3. Kasid et al. (1990) berichten von der *in vivo* festgestellten Unbedenklichkeit des *nptII*-Gens. In der gentherapeutischen Krebsbehandlung beim Menschen wurde APH(3')II *in vivo* intrazellulär produziert, ohne dass negative Auswirkungen festgestellt worden sind. Blaese and Anderson (1990, Zulassungsunterlagen für NIH, zitiert bei Redenbaugh et al. 1994) setzten das mit dem *kan-r* verwandte Gen *neo-r* bei der

gentherapeutischen Behandlung von ADA (Adenosin-Deaminase-Deficiency) ein. Auch sie beobachteten keine negativen Effekte.

## 2.2 Allergenizität

Das APH(3')II Protein zeigt keine Sequenzhomologie mit bekannten, in den Datenbanken GenBank, EMBL, PIR oder SwissProtDatabases erfassten Allergenen (Fuchs et al. 1993, Redenbaugh et al. 1994).

APH(3')II wird in Eukaryoten nicht glycosyliert, da es keine Signalpeptidsequenz für den Transport ins endoplasmatische Retikulum enthält, wo die Glycosylierung stattfindet (Redenbaugh et al. 1994)<sup>68</sup>.

APH(3')II ist nicht hitzestabil und wird *in vitro* unter simulierten gastrischen Bedingungen in 3 Minuten, unter simulierten intestinalen Bedingungen in 30 Sekunden abgebaut (Fuchs et al. 1993 und Redenbaugh et al. 1994). Dies bedeutet, dass einige wesentliche Charakteristika bekannter Allergene nicht vorhanden sind. Insbesondere ist nicht zu erwarten, dass intaktes APH(3')II-Protein die Darmwand passieren kann und in die Blutbahn gelangt (vgl. Kapitel IV).

Noteborn et al. (1993) untersuchen die Lebensmittelsicherheit des APH(3')II in einem europäischen Projekt. Sie kommen ebenfalls zu dem Schluss, dass Allergenizität nicht zu erwarten ist, weisen aber darauf hin, dass keine *in vivo* oder *in vitro* Methode zur Verfügung steht, mittels derer sich das allergene Potential von Proteinen in der Nahrung sicher vorhersagen lässt.

## 2.3 Inaktivierung von therapeutisch verabreichtem Kanamycin

Hier geht es um die Frage, ob therapeutisch verabreichtes Kanamycin/Neomycin durch das Genprodukt des *kan-r* Gens, wie es in transformierten Lebensmitteln enthalten sein wird, inaktiviert werden kann.

Das Enzym Aminoglycosid-O-Phosphoryltransferase (APH(3')II) ist sehr substratspezifisch: es kann lediglich die Antibiotika Kanamycin, Neomycin und Geneticin zerlegen. Das modernere und noch gebräuchliche Antibiotikum Amikacin wird durch das Enzym sehr langsam modifiziert, so dass laut Nap et al. (1992) die therapeutische Wirksamkeit nicht gefährdet ist.

Zur Entfaltung seiner katalytischen Aktivität benötigt das Enzym APH(3')II als Cofaktor Adenosintriphosphat. Da ATP aber im sauren Milieu des Magens instabil ist und APH(3')II bei normalen Magen-pH-Verhältnissen schnell abgebaut wird, wird eine Aktivität des *kan-r*-Genproduktes im menschlichen Verdauungstrakt nicht angenommen (Nap et al. 1992)<sup>69</sup>.

## 2.4 DNA-Übertragung

Über die Nahrung aufgenommene DNA wird, unabhängig von ihrer Herkunft, im Verdauungstrakt abgebaut: Das Pankreassekret enthält Endonucleasen, welche die Nucleinsäure zu Polynucleotiden zerlegen. Da ein einziger Bruch in der codierenden Sequenz genügt, um ein Gen funktionsunfähig zu machen, schätzen Berkowitz und Chambers (1990) die Wahrscheinlichkeit, dass ein intaktes Gen die Passage durch den Verdauungstrakt übersteht, auf Null. Die Transformation von Zellen *im* Darmtrakt (also vor Abschluss des Verdauungsvorganges) ist dennoch möglich (Corpet 1988). Als "host"-Zellen kommen im wesentlichen die Darmepithelzellen sowie intestinale Bakterien in Frage. Über die Fähigkeit der Darmepithelzellen, Fremd-DNA aufzunehmen, existieren keine Daten (Nap et al. 1992). Ihre geringe Lebensdauer wird von Nap et al. (1992) aber als Argument dafür angeführt, dass dieses Problem vernachlässigt werden kann: die transformierte Zelle teilt sich nicht, sondern stirbt ab, so dass eine Weiterverbreitung ausgeschlossen sei. Bei den intestinal siedelnden,

teilungsfähigen Bakterien liegen die Verhältnisse anders. Zwar ist auch über die Transformationsraten der menschlichen Darmflora nichts bekannt, aber im unteren Dünndarm und im Dickdarm, wo sich die zu verdauende Nahrung relativ lang aufhält, können Transformationsereignisse nicht ausgeschlossen werden.

Nap et al. (1992) zitieren die Calgene-Eingabe von 1990, in der ein hypothetisches Szenario zur Transformationswahrscheinlichkeit von *Streptococcus* im menschlichen Darm vorgelegt wurde. Calgene kommt zu dem Schluss, dass die Anzahl potentieller Transformanden im Vergleich zur Menge der bereits vorhandenen *kan-r*-Träger auch im *worst-case-scenario* vernachlässigbar sein wird. Bei der Aufnahme einer durchschnittlichen Menge von Tomaten sollte die maximale Zunahme *kan*-resistenter Bakterien 0,000001% betragen<sup>70</sup>. Die U.S. Food and Drug Administration (FDA) hat diese Berechnungen 1994 endgültig akzeptiert (Redenbaugh et al. 1994)<sup>71</sup> und kam zu dem Schluss, dass der Einsatz von APH(3')II als lebensmittelsicher zu betrachten sei (Federal Register 59:26646 und 59: 26700, zit. bei Redenbaugh et al. 1994).

### 3. Herbizidresistenzmarker

Einen Überblick über die am häufigsten verwendeten Herbizidresistenzmarker gibt Tab. 6.2. Die Mechanismen, die die Resistenz verleihen, sind unterschiedlich: das *bar* Genprodukt inaktiviert Phosphinotricin (Basta<sup>R</sup>) durch Acetylierung, das Nitrilase-codierende Gen *bxn* führt zur Degradierung von Bromoxynil, und *aroA* codiert für ein Enzym mit reduzierter Affinität zu Glyphosat (Roundup<sup>R</sup>). Die Monooxygenase *TdfA* degradiert das auxin-analoge 2,4D (Wilmink und Dons 1993).

#### 3.1 Toxikologie des Genprodukts

Die Gene für Herbizidresistenzen stammen zum Teil aus traditionellen Lebensmittelpflanzen, zum Teil aus Pilzen oder Bakterien (vgl. Tab. 6.2). Wie im Kapitel 3 gezeigt wurde, lässt die Genquelle prinzipiell keine Aussage über die Lebensmittelsicherheit eines Genproduktes zu. In der Diskussion über Herbizidresistenzmarker wird deshalb auch nicht die Herkunft der Gene thematisiert, sondern ihre Struktur und enzymatische Funktion. Die vertretenen Enzymfunktionen sind nicht aussergewöhnlich, deshalb wird allgemein davon ausgegangen, dass die Genprodukte kein spezifisches Risiko bergen, das sich aus ihrer enzymatischen Funktion herleitet<sup>72</sup>. Die Enzymstruktur ist oft verändert.

Beim OECD-"Workshop on Food Safety Evaluation" in Oxford, England (1994) wurde eine Einschätzung der Lebensmittelsicherheit glyphosatresistenter Sojabohnen gegeben (Fuchs 1994). Die Glyphosatresistenz beruht auf einer modifizierten Enolpyruvyl-Shikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS). Die EPSPS ist ein Enzym des Biosyntheseweges der aromatischen Aminosäuren, die von Pflanzen, Bakterien und Pilzen hergestellt werden. Die sojaeigene EPSPS wird durch Glyphosat gehemmt, wogegen die CP 4 EPSPS aus *Agrobacterium* CP 4 ihre enzymatische Funktion auch in Anwesenheit von Glyphosat nicht verliert. Deshalb wurde das CP 4-Gen von den Autoren zur Transformation von Sojabohnen eingesetzt. Fuchs (1994) weist darauf hin, dass alle Nahrungsmittelpflanzen und -mikroorganismen EPSP-Synthasen enthalten, die teilweise homolog sind und deren codierende DNA hochkonserviert ist. Die Tertiärstruktur der CP 4 EPSPS gleicht derjenigen von EPSPS aus *E.coli*, die schon immer Nahrungsbestandteil ist. Das Genprodukt erreichte bis zu 0,1 % Anteil am Gesamtprotein. Unter simulierten gastrischen und intestinalen Bedingungen wurde das CP 4 Protein schnell abgebaut, der Sequenzvergleich ergab keine Ähnlichkeit mit bekannten Toxinen. Allerdings wurden diese Daten mit CP 4 EPSPS aus transgenen

*E.coli*-Bakterien gewonnen. Die Autoren weisen auf diese Tatsache hin, postulieren aber Äquivalenz zum CP 4 aus transgenen Sojazellen. Kleine Unterschiede zwischen dem untersuchten und dem in der Sojabohne tatsächlich produzierten Protein aufgrund posttranslationaler Modifikation sind dennoch nicht auszuschließen. Dieses Problem stellte sich beispielsweise auch Fuchs et al. (1993), es wird aber im Moment als nicht sehr bedeutend eingeschätzt (Jonas 1994; A. Hugget 1995, pers. Information).

Die transgenen Sojabohnen wurden auf Makronährstoffgehalt analysiert, der gegenüber der untransformierten Kontrolle unverändert war. Auch der Gehalt an aromatischen Aminosäuren zeigte keine Abweichung von der Kontrolle.

Kritiker wie Befürworter des Einsatzes von herbizidresistenten Pflanzen in der Landwirtschaft nennen übereinstimmend die zum Teil toxikologisch nicht genau definierbaren/definierten Abbauprodukte des Herbizides als wesentlichen Problembereich der Herbizidresistenzen (WHO 1993 S.15 und Tappeser Ökoinstitut Freiburg/Deutschland, 1995, pers. Information). So berichtet Tappeser (1995, pers. Information) von einem jahrelangen Streit zwischen der Hoechst AG und einem unabhängigen Toxikologen über die Frage, ob beim Abbau des Totalherbizides Basta in resistenten Pflanzen drei oder vier Abbauprodukte entstehen. Obwohl diese Problematik nicht unterschätzt werden darf, kann sie im Rahmen der vorliegenden Studie nicht behandelt werden, denn die Applikation von Herbiziden ist keine zwingende Folge des Einsatzes von Herbizidmarkergenen in der Pflanzentransformation<sup>73</sup>.

### 3.2 Allergenizität

Über die potentielle Allergenizität von Herbizidresistenz-Markergenprodukten ist wenig publiziert. Fuchs (1994) berichtet von den Untersuchungen zur Allergieproblematik bei transgenen Sojabohnen mit der bakteriellen CP 4 EPSP-Synthase. Von den üblichen Eigenschaften der Nahrungsmittelallergene (häufige Proteine von 10-70 kDa, glycosyliert, hitze- und säurestabil) teilt das CP 4 Protein nur das Molekulargewicht. Der Sequenzvergleich mit bekannten Allergenen auf Aminosäureebene ergab keine Ähnlichkeiten.

## 4. Alternativen zum Einsatz von Antibiotika- und Herbizidresistenzmarkern

### 4.1 Excisionssysteme und markerfreie Systeme

Die Frage, auf welche Weise markergenfreie Nahrungsmittelpflanzen hergestellt werden können, wird kaum wegen möglicher gesundheitlicher Probleme diskutiert, sondern in der Regel wegen der ökologischen Risiken (Gressel 1992, Bryant and Leather 1992), der Vorbehalte von Konsumenten und aufgrund von praktischen Problemen bei Mehrfachtransformationen (Goldsbrough 1992).

Yoder und Goldsbrough (1994) geben einen Überblick über die verschiedenen Möglichkeiten, markerfreie Transformanden zu erhalten.

- Co-Transformation. Zwei Gene, das Zielgen und ein Markergen, werden unabhängig voneinander in die Pflanze eingebracht. Wenn die Insertion in genügendem Abstand voneinander erfolgt, kann durch normale Rekombination das Markergen wieder eliminiert werden. Yoder und Goldsbrough (1994) halten die Methode unter bestimmten Umständen für praktikabel.
- *Site specific recombination*: Sequenzspezifische Rekombination kann genutzt werden, um selektierbare Marker "auszuschneiden", wie zuerst von Cregg und Madden (1989) bei Hefe entdeckt. Die sogenannten *asymmetric inverted repeat*

- sequences* dienen einer sequenzspezifischen Rekombinase als Substrat. Cregg and Madden (1989) klonierten ein Markergen zwischen zwei solche Sequenzen. Das Konstrukt wurde in eine Hefemutante eingebracht. Anschliessend wurde dieselbe Hefe mit dem Rekombinase-codierenden Gen transformiert, woraufhin keine Aktivität des Markergens mehr nachgewiesen werden konnte. Lyznik et al. (1993) wiesen die Arbeitsfähigkeit dieses Systems in Mais und Reis-Protoplasten nach. Inzwischen stehen drei weitere sequenzspezifische Rekombinationssysteme zur Verfügung (Yoder and Golsbrough 1994), wobei das *Cre/lox* System des Bacteriophagen P1 bei Pflanzen am weitesten entwickelt ist (Dale and Ow 1991).
- Transposon-vermittelte Eliminierung von Markergenen durch *Ac/Ds* Transposition. Die seit langem bekannten und sehr gut charakterisierten Transposonelemente aus Mais behalten ihre Fähigkeit zur Transposition auch nach der Übertragung in andere Pflanzen. Das agronomisch wertvolle oder das Markergen werden bei der Konstruktion des Übertragungsvektors zwischen zwei *Ds*-Sequenzen positioniert. Wenn gleichzeitig (oder später via Kreuzung oder Sekundärtransformation) ein *Ac*-Transposase in die Pflanze gebracht wird, wird das *Ds* Element und mit ihm das Zielgen zu einer neuen Position im Genom transferiert. Rekombinationsereignisse zwischen der neuen und der originalen Integrationsstelle führen dann zu Nachkommenschaften, die im Hinblick auf die Anwesenheit der zwei Gene spalten. Somit können markerfreie Pflanzen, die das eingeführte agronomisch wichtige Gen enthalten, selektiert werden. Golsbrough et al. (1993) etablierten dieses System bei Tomaten.
  - Gewebespezifische Expression von selektierbaren Markergenen. Markergene werden nur zur Unterscheidung zwischen erfolgreicher und misslungener Transformation gebraucht, infolgedessen ist ihre konstitutive Expression eigentlich sinnlos. Ozcan et al. (1993) brachten das *npt II* Gen unter die Kontrolle des wundinduzierbaren Promotors *AoPR1*. Nach der künstliche Verwundung von Tabak-Blattsstücken war das Expressionsniveau hoch genug für einen effizienten Selektionsvorgang, während im älteren Blattgewebe das Expressionsniveau sehr gering oder nicht nachweisbar war.
  - Homologe Rekombination. Dieses System, das in der Zoologie häufig verwendet wird, ist in der Lage, eine definierte endogene DNA-Sequenz durch das Transgen zu ersetzen. Im Augenblick ist dieses System bei Pflanzen nicht verfügbar (Yoder and Golsbrough 1994).

#### 4.2 Andere Marker

Negative selektierbare Marker (Perera et al. 1993 und Xiang und Guerra 1993) dienen ausschliesslich wissenschaftlichen Zwecken. Anwendungen bei routinemässiger Transformation sind nicht publiziert. Mit der Entwicklung weiterer selektierbarer Marker ist zu rechnen (Bowen 1993; vgl. auch Goddijn et al. 1993, Ludwig et al. 1990 sowie Matsumoto et al. 1990).

### **Schlussfolgerungen**

Bei dieser Darstellung der Problematik von Markergenen muss zweierlei beachtet werden:

- Es handelt sich um eine Momentaufnahme. Im Augenblick sind nur Sicherheitsevaluierungen zu Antibiotikaresistenzmarkern und zu einem Herbizidresistenzmarker verfügbar.
- Mit der Zulassung weiterer transgener Nutzpflanzen mit denselben Markergenen ist zu rechnen. Damit kann sich das Expositionsniveau der Konsumenten über das jetzt anhand der ersten transgenen Pflanzen diskutierte Mass hinaus erhöhen.
- Viele der vorliegenden Publikationen zur Sicherheit von Markergenprodukten beruhen auf *in vitro* Untersuchungen und statistischen Berechnungen. Es besteht allerdings relativ grosse wissenschaftliche Übereinstimmung, dass das Risiko für die Konsumenten unter normalen Umständen (normale Magen/Darmbedingungen) vernachlässigbar klein ist.

Tab 6.1: Antibiotikaresistenzmarker

Resistenzen gegen Aminoglycosid-Antibiotika	Wirkungsweise, Abkürzung und Herkunft des Gens	Antibiotikum/ selektives Agens	Klinische Verwendung des Antibiotikums (USA)*	Referenz(en)
Streptomycin/Spectinomycin-Resistenz	Aminoglycosid-3'-Adenyltransferase <i>aadA(3')</i> , Streptomycin-phosphotransferase <i>spt</i> aus <i>E.coli</i>	Streptomycin Spectinomycin	Verwendung in der Humanmedizin	Svab et al. 1990; Maliga et al. 1988
Gentamycin-Resistenz	<i>aacIV</i> aus <i>E.coli</i>	Gentamycin	Verwendung in der Humanmedizin	Hayford et al. 1988
Hygromycin-resistenz	Hygromycin-Phosphotransferase <i>aph IV</i> aus <i>E.coli</i>	Hygromycin	Verwendung i.d. Tiermedizin	Waldron et al. 1985
Kanamycin-resistenz	Neomycin-Phosphotransferase II <i>aph 3'-II</i> , <i>npt II</i> aus <i>E.coli</i>	Kanamycin Paromomycin Geneticin	selten (Verwendung in der Tiermedizin)	Fraley et al. 1983;
Kanamycin-resistenz	Neomycin-Phosphotransferase I <i>aph 3'-I</i> , <i>npt I</i> aus <i>E.coli</i>	Kanamycin	selten	Fraley et al. 1983

\* Bei der Anwendung von Antibiotika gibt es beträchtliche Unterschiede zwischen verschiedenen Ländern.

Tab. 6.2: Herbizidresistenzmarker

Wirkungsweise, Gen, Herkunft*	Selektionsagens	Bemerkungen**	Referenz(en)
Phosphinothricin-acetyltransferase <i>bar</i> aus <i>Streptomyces</i>	Phosphinothricin (=Glufosinat): BASTA <sup>74</sup> Bialaphos	Genquellen auch: <i>Medicago sativa</i> <i>Streptomyces ssp.</i>	De Block et al. 1987
Acetolactatsynthase <i>als</i> aus <i>Nicotiana tabacum</i>	Sulfonylurea (Chlorsulfuron) Imidazolinon	Genquellen auch: <i>A. thaliana</i> <i>Beta vulgaris</i> <i>Glycine max</i> <i>Zea mays</i> <i>Gossypium hirsutum</i> und andere	Lee et al. 1988
5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphatsynthase (EPSPS) <i>aroA</i> aus <i>Salmonella typhimurium</i>	Glyphosat: ROUNDUP <sup>75</sup>	Genquellen auch <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Petunia hybrida</i> <i>E. coli</i>	Comai et al. 1985
2,4-Dichlorophenoxyacetat-Monooxygenase <i>tfdA</i> aus <i>Alcaligenes eutrophus</i>	2,4D	<i>Alcaligenes</i> ist ein Bodenbakterium	Streber und Willmitzer 1989
Bromoxynilspezifische Nitrilase <i>bxn</i> aus <i>Klebsiella ozaenae</i>	Bromoxynil	<i>Klebsiella</i> ist ein Bodenbakterium	Stalker et al. 1988

\* Als Herkunft des Gens ist hier verzeichnet, aus welchem Organismus die zitierten Autoren das Gen isoliert haben.

\*\* Zu allen hier angegebenen zusätzlichen Genquellen vgl. Bowen 1993

# Kapitel VII: Verfahren zur Überprüfung der Lebensmittelsicherheit gentechnisch veränderter Nahrungsmittelpflanzen

## 1. Das Konzept der substantiellen Äquivalenz

Mit dem Instrument Gentechnik können die Inhaltsstoffmuster von Nutzpflanzen stark verändert werden, unter anderem zur Erzeugung von neuen Resistenzen (vgl. Kapitel II). Damit sind die empirisch und zum Teil über Jahrtausende gewonnenen Ansichten über die optimale Verzehrsmenge, geeignete Zubereitungsarten und gesundheitliche Wirkungen von Nahrungsmittelpflanzen eventuell nicht länger gültig. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, sind zwar traditionelle Nahrungsmittel nicht unbedingt in allen Komponenten "sicher", aber die Menschheit verfügt über lange Erfahrung im Umgang mit ihnen (vgl. Kapitel III).

In Anbetracht des gegenüber der klassischen Züchtung extrem erweiterten Handlungsspielraums der Gentechnik herrscht inzwischen international Einigkeit darüber, dass eine Kontrolle der Produktesicherheit von Staats wegen notwendig ist. Die Details der gesetzlichen Regulationen und Fragen der Kennzeichnung sind nicht Gegenstand des vorliegenden Gutachtens; es soll im folgenden aber kurz dargestellt werden, mit welcher Behandlung der hier untersuchten Kategorien "toxikologische Risiken der Genprodukte" und "unbeabsichtigte Sekundäreffekte" innerhalb des Überwachungsverfahrens zu rechnen ist<sup>76</sup>.

Das grundlegende Konzept zur Erfassung der Risiken von gentechnisch veränderten Lebensmitteln ist dasjenige der "substantiellen Äquivalenz" (vgl. die grundlegende Literatur: FAO/WHO 1990, UK Advisory Committee 1991 und OECD 1993). Bei der Anwendung dieses Konzeptes geht man davon aus, dass bekannte, allgemein für sicher gehaltene Organismen (GRAS = generally regarded as safe) als Vergleichsbasis für die Beurteilung von veränderten Organismen dienen können. Im Falle transgener Pflanzen muss also die Identität der nicht-transgenen Kontrolle bekannt sein (Noteborn 1994). Der Autor umreisst die Schwierigkeiten des Konzepts: "(...) Kenntnisse über die Zusammensetzung der meisten Nahrungsmittelpflanzen sind ziemlich beschränkt (...) Auch das Wissen über die Variation der Inhaltsstoffe in verschiedenen Sorten und aus verschiedenen Umwelten steht noch absolut am Anfang." Da in der Regel mit grösseren umwelt- und sortenbedingten Schwankungen bei morphologischen und biochemischen Merkmalen zu rechnen ist, werden in verschiedenen Ländern Datenbanken eingerichtet, die über natürliche Variationen der Inhaltsstoffzusammensetzung Auskunft geben sollen.

Der praktische Ablauf bei der Untersuchung einer gentechnisch veränderten Pflanze wird in etwa folgendermassen organisiert werden (nach Jonas 1994): Zunächst wird untersucht, ob die transgene Pflanze sich, abgesehen von dem bewusst veränderten Merkmal, vom Elternorganismus unterscheidet. Phänotypische Merkmale und biochemische Daten werden verglichen. Da nicht jeder einzelne Inhaltsstoff analysiert werden kann, wird eine Auswahl von wichtigen Substanzen getroffen. Als wichtig in diesem Sinne werden Makronährstoffe (Kohlenhydrate, Eiweiss, Fett), bekannte in der Pflanzenfamilie auftretende Toxine (z.B. Alkaloide bei den Nachtschattengewächsen) und besondere wertgebende Inhaltsstoffe (z. B. Vitamin C) erachtet. Diese Vorgehensweise kann nicht *alle* sekundären (unbeabsichtigten) Veränderungen aufdecken; aber die Mehrheit der Physiologen und Toxikologen gehen

davon aus, dass alle *relevanten* Sekundäreffekte auf diese Weise erfasst werden können.

Falls keine unbeabsichtigten Veränderungen festgestellt werden und der elterliche Organismus als GRAS gilt, wird als nächstes untersucht, ob das Produkt des eingeführten oder modifizierten Gens<sup>77</sup> im zu verzehrenden Erntegut vorhanden ist; ist dies nicht der Fall, sind keine weiteren Untersuchungen vorgeschrieben (Bsp: Öle und Zucker aus transgenen Pflanzen).

Ist das Fremdgenprodukt Bestandteil des Lebensmittels, so muss seine Verzehrsicherheit nachgewiesen werden. Falls das Genprodukt in ähnlicher Menge schon vorher Nahrungsbestandteil war, werden keine weiteren Analysen verlangt (Bsp: Expression des unveränderten Hüllproteins von Viren, sofern die Viren schon früher Bestandteil des Lebensmittels waren).

Ist das Genprodukt hingegen in dieser Form oder in dieser Menge noch nie Nahrungsmittelbestandteil gewesen, so müssen Daten über toxikologische Risiken, den Abbau im Magen-Darmtrakt etc. erhoben werden (Bsp: Antibiotikaresistenzgene, Einzelgene aus *Bacillus thuringiensis*).

In allen Fällen muss auch über den angestrebten Einsatz des veränderten Lebensmittels Klarheit herrschen. Verändert sich Art oder Menge des üblichen Verzehr aufgrund der Modifikation entscheidend, ist substantielle Äquivalenz nicht gegeben.

## 2. Die Ausarbeitung des Konzeptes

Es herrscht international Einigkeit darüber, dass ein *case by case* Vorgehen notwendig sein wird (Notborn 1994). Die etablierten oder geplanten Regulationen unterscheiden sich aber in der Interpretation des Begriffes "substantielle Äquivalenz" (A. Hugget, pers. Information).

Frankreich hat einen Kompromissentwurf für die vorgeschlagene EC-Regulierung Nr. 7757/95 zum Thema "Novel Food" (Stand 30.5.95) erarbeitet, der offenbar der angestrebten Endfassung schon sehr nahe kommt (A. Hugget, pers. Information). Darin werden folgende im vorliegenden Zusammenhang relevante Kategorien von "Novel Food" aufgeführt<sup>78</sup>:

a: Lebensmittel, die aus gentechnisch<sup>79</sup> veränderten Organismen bestehen oder solche enthalten.

b: Lebensmittel, die von gentechnisch veränderten Organismen produziert werden, aber solche nicht enthalten.

e: Lebensmittel, die von Pflanzen stammen, ausser solchen, die mittels traditioneller Methoden der Züchtung und Vermehrung gewonnen wurden und ausser solchen, die schon bisher als sicheres Lebensmittel bekannt waren.

Experten des ILSI-Europa haben (unter der organisatorischen Leitung von D. Jonas, UK und unter Schweizer Beteiligung) einen Vorschlag zum SAFETY ASSESSMENT OF FOOD BY EQUIVALENCE AND SIMILARITY TARGETING (SAFEST) ausgearbeitet, den sie dem Scientific Committee for Food (SCF) der EU vorlegen. Das wesentliche Element dieses Konzeptes ist die Einteilung von "Novel Food" in drei Klassen, die den Grad der Ähnlichkeit zum Referenzlebensmittel angeben (A. Hugget, pers. Information):

Klasse 1: Nahrungsmittel, die substantiell äquivalent zum Referenzlebensmittel sind. Für komplexe Nahrungsmittel (z.B Pflanzen) bedeutet das, dass sie mit der Ausgangspflanze in Bezug auf die biochemische Zusammensetzung (im Rahmen der üblichen Schwankungsbreiten) identisch sein muss. Ist dies der Fall, sind keine

Untersuchungen erforderlich. Es ist unwahrscheinlich, dass gentechnisch veränderte Pflanzen in diese Kategorie fallen.

Klasse 2: Nahrungsmittel, die ausreichend ähnlich sind wie das Referenzlebensmittel. Die Pflanze muss, mit Ausnahme von definierten Einzelaspekten, in Bezug auf die biochemische Zusammensetzung (im Rahmen der üblichen Schwankungsbreiten) identisch mit der Ausgangspflanze sein. Ist dies der Fall, so muss lediglich das Produkt des Fremdgens auf Lebensmittelsicherheit untersucht werden<sup>80</sup>.

Klasse 3: Nahrungsmittel, die weder substantiell äquivalent noch ausreichend ähnlich mit einem Referenzlebensmittel sind.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Anwendung des Konzeptes auf verschiedene pflanzliche Lebensmittel, die unter das SAFEST-Konzept fallen.

<b>Modifizierte Pflanze</b>	<b>Vergleich mit dem Referenzlebensmittel</b>	<b>SAFEST- Klasse (Grad der Ähnlichkeit)</b>	<b>EU-Kategorie (Typ der Veränderung)</b>
FLAVR SAVR-Tomate	ausreichend ähnlich wie konventionelle Tomate	2	a: Die Tomate ist ein GMO
Virusresistente Zuckerrübe	Der Zucker ist substantiell äquivalent mit traditionellem Zucker	1 (gilt nur für Zucker, nicht für das Futtermittel Rübenblatt)	b: Der Zucker wurde aus einem GMO gewonnen, ist aber selber kein GMO
Triticale	ausreichend ähnlich wie Weizen und Roggen	2	e: Kein GMO, aber "neu"
Kiwi	nicht ausreichend ähnlich	3	e: Kein GMO, aber "neu"

Quelle: A. Hugget, pers. Information. Das Beispiel "Zuckerrübe" wurde hinzugefügt (d. Verf).

Die Tabelle zeigt, dass die Regulierungen auch Pflanzen erfassen könnten, die bisher ohne jede Überwachung vermarktet werden konnten.

### **Schlussfolgerungen**

- Es zeichnet sich zur Untersuchung der Lebensmittelsicherheit von (gentechnisch veränderten) Pflanzen ein zweiteiliges Verfahren ab. Ob unerwünschte Sekundäreffekte aufgetreten sind, wird über einen Vergleich mit ausgewählten Charakteristika der Ausgangslinie festgestellt. Ist dies nicht der Fall, muss lediglich die Sicherheit des Fremdgenproduktes nachgewiesen werden.
- Die bis jetzt veröffentlichten Konzepte und auch die erlassenen Verordnungen unterschieden sich von Land zu Land. Keine Einigkeit herrscht beispielsweise über die Notwendigkeit von Fütterungsversuchen (vgl. auch Noteborn 1994).
- Gentechnisch veränderte Pflanzen, bei denen keine unerwarteten Sekundäreffekte nachgewiesen wurden, werden der Kategorie 2/a angehören; aus ihnen gewonnene Produkte eventuell der Kategorie 1/b.
- Produkte der klassischen Pflanzenzüchtung sind aus der EU Kategorie explizit ausgeschlossen, sofern die bearbeiteten Pflanzen schon vorher ein Nahrungsmittel der jeweiligen Bevölkerung waren. Sie sind damit nicht "Novel Food" im Sinne dieser Regulation.

## Erläuterungen

- <sup>1</sup> Der Begriff Resistenz wird im folgenden, sofern nicht näher definiert, immer im allgemeinsten Sinn verwendet und schliesst daher Toleranz und Teilresistenz mit ein.
- <sup>2</sup> Dieses Zitat soll veranschaulichen, unter wie vielen verschiedenen Aspekten die Debatte geführt wird. Es gibt nicht die Meinung der Verfasser dieses Textes wieder.
- <sup>3</sup> Der Begriff "Pestizid" wird hier als Überbegriff für Fungizide und Insektizide verwendet.
- <sup>4</sup> Der Begriff PR-Protein entstammt der englischen Terminologie: "Pathogenesis-related proteins" sind nach Bowles (1990) Proteine, die in Reaktion auf einen Pathogenbefall gebildet werden, und deren biologische Funktion noch ungeklärt ist. Weder Definition noch Klassifikation werden einheitlich gehandhabt (vgl. auch Van Loon et al. 1994).
- <sup>5</sup> Diese Nekrosebildung ist ein Symptom der "hypersensitiven Reaktion", die im Prinzip eine extreme Überempfindlichkeit der Pflanze gegen einen Schaderreger darstellt. Als Folge des Kontaktes mit dem Schaderreger sterben die betroffenen Pflanzenzellen ab und verhindern so die weitere Ausbreitung von solchen Erregern, die nur in lebendem Pflanzenmaterial wachsen können.
- <sup>6</sup> Es handelt sich insofern um eine Ausnahme, als hier nur ein einziges Gen übertragen werden musste, um ein völlig neues Phytoalexin zu synthetisieren. Die Toxizitätsproblematik ist hier nicht untersucht worden. Von Endotoxizität wird nicht berichtet, was am Expressionsmodus (nicht konstitutiv) liegen kann (vgl. Dixon 1994).
- <sup>7</sup> Es handelt sich zwar um ein Resistenzgen, aber der Interaktionsmodus von HM1 mit dem Pilz *C.carbonum* kann nicht nach der "Gen-für-Gen-Hypothese" erklärt werden (De Wit 1992).
- <sup>8</sup> Um ein Gen zu "klonieren", muss seine Lage auf dem entsprechenden Chromosom so genau festgestellt werden, dass der entsprechende DNA-Abschnitt mit passenden Restriktionsenzymen herausgeschnitten werden kann; daraufhin wird dieser DNA-Abschnitt mit einer bakteriellen Plasmid-DNA verbunden, dem "Vektor", der dann seinerseits in ein *E.coli*-Bakterium eingebracht wird, das in geeignetem Medium beliebig vermehrt (kloniert) werden kann. Der interessierende DNA-Abschnitt wird mitvermehrt, kann aus *E.coli* zurückgewonnen werden und steht danach für beliebige Analysen und Manipulationen zur Verfügung.
- <sup>9</sup> s. Kapitel Virusresistenz
- <sup>10</sup> Resistenzen gegen Bakterien sind nicht Gegenstand der vorliegenden Studie.
- <sup>11</sup> Allelochemikalien sind Substanzen mit (Abwehr-)Wirkung gegenüber anderen Organismen.
- <sup>12</sup> Die Entwicklung und Populationsdichte einiger anderer Insektenarten wird von Gossypol gefördert. Dieses Phänomen wird häufig beobachtet: Viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind gleichzeitig Insektizid und Lockstoff/Frassanreger, je nach betrachteter Schädlingsart.
- <sup>13</sup> McBride et al. (1995) berichten von einem Verfahren zur Erhöhung des Expressionsniveaus, das die Modifizierung der Gene überflüssig macht: Die Amplifizierung der codierenden Region von cryIA(c) in Chloroplasten lieferte bis zu 10'000 Kopien pro Zelle und führte zu einem Protoxingehalt von 3-5% des löslichen Gesamtproteins.
- <sup>14</sup> Non-host-Immunität liegt vor, wenn eine Pflanzenart von einem bestimmten Virus grundsätzlich nicht befallen wird.
- <sup>15</sup> Zur strukturellen Ähnlichkeit des N-Gens mit dem antibakteriellen Resistenzgen RPS2 aus *Arabidopsis thaliana* vgl. Bent et al. (1994), Mindrinos et al. (1994) sowie zum Vergleich aller bisher bekannten Resistenzgene Dangl (1995).
- <sup>16</sup> Die Probleme bei der Selektion auf solche Merkmale machen es allerdings sehr unwahrscheinlich, dass sie mit klassischen Methoden gezielt manipuliert werden.

- <sup>17</sup> Die Kuhbohne (*V. unguiculata*) ist die wichtigste Proteinquelle der Sahelzone. Aufgrund des dort herrschenden Brennstoffmangels können die Bohnen nicht immer ausreichend lange gekocht werden. Die Selektion auf niedrige PI und Lectingehalte ist deshalb notwendig. Andererseits führen aber die gegenüber den Wildformen verschlechterten Resistenzen zu Verlusten von bis zu 80% auf dem Feld und im Lager (vgl. Carnovale et al. 1991).
- <sup>18</sup> Myrosinase ist in der intakten Pflanze getrennt kompartimentiert, wird also z.B. nach Verletzungen der Pflanze aktiv.
- <sup>19</sup> In den tanninfreien Linien wurde keine Trypsin-Inhibitoraktivität der Testa gefunden (ob es sich hier um Pleiotropie oder Epistasie handelt, bleibt offen). Welche Rolle "Nebenwirkungen" wie der reduzierte TI-Gehalt für die Verdaulichkeit spielen, ist nicht abschliessend geklärt (Helsper et al. 1993).
- <sup>20</sup> Glycalkaloide sind ebenfalls Glycoside. Sie bestehen aus einem Zucker und einem stickstoffhaltigen Sterol oder Steroidalkohol. Die Hydrolyse der Glycosidbindung führt zur Freisetzung des Aglycons, wobei neuere Ergebnisse darauf hindeuten, dass das Glycosid als Ganzes und nicht das Aglycon für die biologische Aktivität verantwortlich ist. Hydrolyse sollte deswegen zur partiellen Detoxifizierung führen (Majak 1992).
- <sup>21</sup> *S. chaconense* enthält ausserdem einen anderen Typ von Glykalkaloiden: die acetylierten Glykalkaloide Leptine (Wink 1988).
- <sup>22</sup> Allerdings wurde bei der Untersuchung von allergischen Reaktionen auf Handelszucker festgestellt, dass er in geringem Masse Proteinverunreinigungen enthält (Potter et al. 1990).
- <sup>23</sup> Es gibt allerdings Hinweise, dass *B. thuringiensis* bei immungeschwächten Patienten, insbesondere im Zusammenwirken mit anderen Mikroorganismen, zu einem Pathogen werden könnte. Dixon (1994) zitiert einen Fall von Mischinfektion (*B. thuringiensis* und *Actinobacter*), der zu einem Hornhautgeschwür geführt hat. In diesem Fall haben möglicherweise Proteasen aus *Actinobacter* das *B. thuringiensis*-Toxin aktiviert. Ferner weist Dixon auf die Geschichte anderer "nonpathogener" Bacillus-Arten hin, die bei vorgeschwächten Individuen wider Erwarten pathogen wurden. *Bacillus cereus* zum Beispiel, verwandt mit dem Milzbrandbacillus, wurde lange Zeit als harmloser Saprophyt betrachtet, bis er als Auslöser schwerer Augeninfektionen identifiziert wurde, die teilweise zu Blindheit führen (Dixon 1994 und Referenzen darin, vgl. auch Goldberg und Tjaden 1990).
- <sup>24</sup> Ob posttranslationale Modifikationen der pflanzlichen (Eukaryoten-)zelle von denen der bakteriellen Prokaryotenzellen abweichen, ist nicht definitiv geklärt. Glycosilierung oder Phosphorylierung können das toxische Potential beeinflussen. Dies würde die Aussagekraft von Untersuchungen mit rekombinantem Protein aus *E. coli* einschränken (Kuiper und Noteborn 1994, vgl. auch Goldberg und Tjaden 1990).
- <sup>25</sup> Die Autoren geben nicht an, über wie viele Tage die Fütterungsversuche durchgeführt wurden.
- <sup>26</sup> Die Äquivalenz wird unter Annahme durchschnittlicher Körpergewichte errechnet.
- <sup>27</sup> Zu den methodischen Schwierigkeiten subakuter toxikologischer Studien vgl. Culliney et al. (1993) S. 143 f.
- <sup>28</sup> Pilze können giftige Stoffwechselprodukte bilden, die sogenannten Mycotoxine.
- <sup>29</sup> Es handelte sich insbesondere um Ethylenbisdithiocarbamate (EBDC; Schumann 1993 S. 168).
- <sup>30</sup> Die Wahl der geeigneten Problemlösungsstrategie hängt aber in der Praxis (beim Landwirt ebenso wie bei der vorgelagerten Industrie, die Saatgut und Pflanzenschutzmittel anbietet) von ökonomischen Erwägungen ab, die zu anderen Ergebnissen führen (können) als diejenigen der Toxikologie.
- <sup>31</sup> Immunoglobulin = Ig. Die Buchstaben A bis E bezeichnen die verschiedenen Typen der Immunoglobulin-Antikörper
- <sup>32</sup> Lebensmittelallergien bei Kindern, besonders gegen Milch und Ei, sind von eventuellen Pollenallergien unabhängig und können sich mit zunehmendem Alter verlieren.
- <sup>33</sup> Ein Protein, das als Allergen wirkt, wird vom Immunsystem nicht als Komplex erkannt, sondern anhand kleiner Regionen, der sogenannten antigenen Determinanten oder Epitope (Houben und Penninks 1995).
- <sup>34</sup> Allerdings wurden auch bei RAST-positiven Patienten sogenannte orale Toleranzen nachgewiesen. Ob Profilin in Pflanzen tatsächlich Signaltransduktionsfunktionen haben und ob diese mit den Resistenzreaktionen von Pflanzen gegen ihre Schaderreger zu tun haben können, ist unbekannt. Rast: Radioallergosorbent-Test).
- <sup>35</sup> Zöliakie kann auftreten nach Verzehr von Weizen, Roggen, Gerste und manchmal auch Hafer (Lemke and Taylor 1994 S.123). Die Symptome einer unbehandelten Zöliakie sind relativ gravierend: Durchfall, Gewichtsverlust, Anämie, chronische Müdigkeit und bei Kindern Wachstumsstörungen (Lemke and Taylor 1994 S.123). Hinzu kommt ein stark erhöhtes Krebsrisiko (Brandtzaeg et al. 1991 S. 44). Alle diese Symptome gehen zurück auf

folgendes Primärproblem: Die Epithelzellen des Dünndarms werden bei glutenhaltiger Diät zerstört (Lemke and Tylor 1994 S. 123).

Das Vorkommen von Zöliakie ist regional sehr unterschiedlich verteilt: Schätzungen schwanken zwischen 1:100 und 1:8000 (Lorenz 1992 S.383). In China und Afrika ist die Krankheit (nahezu) unbekannt (Lemke and Taylor 1994 S.123).

Die immunologische Basis der Zöliakie wird diskutiert in Brandzaeg et al. (1991 S.39ff.)

- <sup>36</sup> Diese Einteilung beruht nicht nur auf der zu erwartenden Problematik der Genprodukte, sondern nimmt insbesondere Rücksicht auf die verfügbaren Testmethoden. Umfassende immunologische Tests sind nur möglich, wenn sich eine ausreichende Zahl von Patienten mit einer dokumentierten Geschichte allergischer Reaktionen gegen die infragestehende Pflanze findet. Entsprechend bezieht sich die obige Einteilung nicht auf die *Hefigkeit* der ausgelösten allergischen Reaktionen, sondern auf deren *Häufigkeit*.
- <sup>37</sup> Mit fortschreitender Aufklärung der Epitopsequenzen identifizierter Allergene wird dieses Problem an Bedeutung verlieren.
- <sup>38</sup> Hierfür kommen RAST (Radioallergosorbent Test), RAST-Inhibition und ELISA-Tests in Frage.
- <sup>39</sup> Die juristischen Regelungen zur Kennzeichnung von gentechnisch veränderten Organismen sind in den meisten Ländern momentan in Bearbeitung; sie sind darüberhinaus nicht Gegenstand der vorliegenden Studie. Es soll lediglich aufgezeigt werden, wie mit den Testergebnissen umgegangen werden soll (nach den Vorstellungen von ICBF und ILSI).
- <sup>40</sup> Double blind placebo controlled food challenge (DBPCFC) bedeutet in diesem Fall, dass Patienten mit bekannter Allergie gegen die Genquelle das infragestehende Protein und eine Kontrollprobe oral aufnehmen. Aus Sicherheitsgründen können nur Patienten, die alle vorhergehenden Teststufen durchlaufen haben, an DBPCFCs teilnehmen.
- <sup>41</sup> Diese Schlussfolgerung ist nicht die einzig mögliche. Man kann auch argumentieren, dass die Vermarktung in einem solchen Falle unterbleiben sollte. Kennzeichnung ist hier die Mindestanforderung.
- <sup>42</sup> Diese Schlussfolgerung ist nicht die einzig mögliche. Man kann auch argumentieren, dass die Vermarktung in einem solchen Falle unterbleiben sollte. Kennzeichnung ist hier die Mindestanforderung.
- <sup>43</sup> Sojapresskuchen ist ein wertvolles Tierfutter, welches aber aufgrund des sojatyptischen Mangels an schwefelhaltigen essentiellen Aminosäuren (Methionin und Cystein) mit Zusatzstoffen ergänzt werden muss.
- <sup>44</sup> Dies muss kein pleiotroper Effekt des eingeführten Gens sein. Es kommt insbesondere auch somaklonale Variation als Ursache in Frage.
- <sup>45</sup> Allel: Der Zustand eines Gens an einem definierten Genort (*locus*). Bsp.: Der Genort (Locus) codiert für die Blütenfarbe. Je nach alleler Besetzung dieses Locus ist die Blüte dann weiss, rosa oder rot.
- <sup>46</sup> Elkind et al. (1995) geben zu bedenken, dass die phänotypische Variation, die zwischen unabhängigen Transformanden beobachtet wird, nicht allein auf genetische Effekte zurückgeführt werden kann. Da die Umweltvarianz bei den einschlägigen Untersuchungen oft nicht geschätzt wurde, wird die Variabilität zwischen den Transformanden fälschlicherweise, *in toto* auf genetische Effekte zurückgeführt.
- <sup>47</sup> Die Inaktivierung von Genen durch Epistasie (Wechselwirkungen zwischen zwei Genen) ist auch aus klassischen Züchtungsprogrammen mit weiten Kreuzungen bekannt. So werden zum Beispiel einige Rost-Resistenzgene aus tetraploiden Weizen im hexaploiden *T. aestivum* nicht exprimiert. Man vermutet ein Suppressor-Gen auf Chromosom 7D (vgl. De Block 1993).
- <sup>48</sup> Nur "nicht-letale" Veränderungen, also solche, die das Überleben des Transformanden nicht gefährden, sind im vorliegenden Zusammenhang von Belang.
- <sup>49</sup> Zu den verschiedenen Methoden des Gentransfers vgl. De Block (1993) und Webb and Morris (1992). Unter direkter Transformation versteht man im wesentlichen die Elektroporation und die biolistische Methode, also den Beschuss mit Microprojectilen. Zur Agrobakterium-Transformation vgl. Zambryski et al. (1983).
- <sup>50</sup> Kopplung: Zwei Gene liegen so nah beieinander, dass ihre Trennung im Zuge meiotischer Rekombinationsprozesse selten ist.

- <sup>51</sup> Epigenetische Veränderungen betreffen nicht die Struktur, sondern die Expression des genetischen Materials (Hess 1992, S.122). Epigenetische Veränderungen sind also transient (vorübergehend) (vgl. Wobus 1994 S.165).
- <sup>52</sup> Es herrscht allerdings scharfe Selektion, da nur derjenige (kleine) Teil der Pflanzen mit gelungener Transformation weitergeführt wird; so dass genetische Drift als Ursache für die Abweichung nicht ausgeschlossen werden kann.
- <sup>53</sup> Das Nordic Council (S.133) fasst unter dem Begriff Pleiotropie 1) Effekte auf DNA Ebene (*downstream effects*) und 2) Effekte auf Genproduktlevel (*interference between the product of the inserted gene and host cell metabolism*) zusammen. In der vorliegenden Arbeit werden die DNA-Level-Effekte (1) unter *insertional mutagenesis* abgehandelt.
- <sup>54</sup> Redenbaugh et al. (1992) diskutieren in der Sicherheitsstudie zur FLAVR SAVR Tomate *alle* unbeabsichtigten Folgen des Gentransfers, z.B. auch die denkbare Stilllegung eines Gens/Enzymes aus einer Stoffwechselkette durch *insertional mutagenesis* mit nachfolgender Akkumulation von dessen Substrat, als pleiotropen Effekt (S.210). Wir verwenden hier den Ausdruck Pleiotropie nur für Wirkungen des eingeführten Gens selber auf scheinbar unverwandte Merkmale.
- <sup>55</sup> Die WHO definiert Pleiotropie im Sinne der vorliegenden Arbeit, also abweichend von der Calgene-Studie.
- <sup>56</sup> Mitochondrien sind Zellorganellen, die unabhängig vom Kerngenom eigene DNA enthalten.
- <sup>57</sup> Ein echter Beweis dieser Schlussfolgerungen ist nicht möglich, denn auch bei langjährig rückgekreuzten NILs bleibt ein "Rest" des Donorgenoms erhalten. Wenn die Rekombinationsfrequenz in der Umgebung des Resistenzgens gering ist, können die scheinbar pleiotropen Effekte auch auf Kopplung zurückgehen. Falls Kopplung involviert ist, ist sie so eng, dass die Kopplungsgruppe als "single complex locus" agiert (Allard 1992).
- <sup>58</sup> Nach UPOV; unter Einbeziehung von Ertrag und Sortierung.
- <sup>59</sup> Die Umweltstabilität transgener Pflanzen hängt wesentlich von der Wahl des Promotors ab und kann insofern beeinflusst werden.
- <sup>60</sup> Hemizygot Pflanzen einer Rückkreuzungspopulation aus homozygoten F2-Pflanzen x untransformierte Elternlinie waren dagegen im Feld resistent. Diese Beobachtung ist konsistent mit einigen anderen Resultaten, die belegen, dass manche transgenen Loci für Silencing besonders anfällig sind, wenn das Transgen homozygot vorliegt.
- <sup>61</sup> Als "Wildtypen" werden in der Gentechnik die untransformierten Ausgangspflanzen bezeichnet, und zwar unabhängig vom Grad ihrer sonstigen züchterischen Bearbeitung.
- <sup>62</sup> Bowen (1993) gibt eine sehr umfassende Übersicht über verwendete oder verwendbare Marker (S.96-100).
- <sup>63</sup> Entsprechend dem allgemeinen Sprachgebrauch wird im folgenden nur noch von Kanamycinresistenz gesprochen. Kanamycin und Neomycin sind sich von Struktur und Wirkung her sehr ähnlich.
- <sup>64</sup> Bei Raps und anderen Kulturarten dienen die Herbizidresistenzen nicht nur als Markergene. Manche Autoren beschreiben sie als agronomisch sinnvolles Merkmal.
- <sup>65</sup> Sekundäreffekte der Genübertragung sind kein spezifisches Problem der Markergenübertragung, deshalb werden sie hier nicht gesondert diskutiert.
- <sup>66</sup> Kanamycin wird erfolgreich eingesetzt bei operativen Eingriffen am Darm, Infektionen mit *Mycobacterium tuberculosis* und hepatitischer Enzephalopathie (WHO 1993 S. 11 und Redenbaugh 1994).
- <sup>67</sup> Kanamycin und insbesondere Neomycin werden in der Tierhaltung wegen ihrer wachstumsstimulierenden Wirkung eingesetzt. In einigen europäischen Ländern ist der Einsatz subtherapeutischer Mengen als Wachstumsstimulans verboten (Nap et al. 1992).
- <sup>68</sup> Zur Bedeutung der Glycosylierung von Proteinen für deren Allergenität vgl. Kap. IV.
- <sup>69</sup> Die WHO (1993) gibt zu bedenken, dass geprüft werden muss, ob ein Antibiotikum unter nicht normalen physiologischen (z.B. abnormal hoher Magen-pH) Umständen eingesetzt wird (S.14).
- <sup>70</sup> Dabei ist allerdings zu beachten, dass es in Zukunft viele Nahrungsmittelpflanzen geben wird, die das *kan-r*-Gen tragen werden; die Gesamtexposition wird also deutlich höher sein als hier angenommen.
- <sup>71</sup> 1989 hatten die Beratungen der FDA über die Zulassung des *kan-r*-Genes begonnen. Redenbaugh et al. (1994) geben einen Überblick über den Ablauf der Beratungen. In der zweiten Einspruchsfrist vom 16/7 bis zum 16/8 1993 wurde keine Eingabe mehr registriert.
- <sup>72</sup> Diese Aussage bezieht sich selbstverständlich, wie die gesamte Arbeit, nicht auf ökologische Risiken. Die Literatur zu den ökologischen oder pflanzenbaulichen Problemen von Herbizidresistenzen ist sehr umfangreich.
- <sup>73</sup> Gressel (1992) diskutiert allerdings, dass bei Vorliegen transgener Herbizidresistenzen das Herbizid appliziert werden sollte, um einen Transfer der Resistenz zu untransformierten Verwandten (z.B. im Falle von Brassicaceen) dadurch zu verhindern, dass diese vor der Blüte sicher abgetötet werden. Sollte sich diese Methode, unerwünschten Gentransfers zu vermeiden, als Standard etablieren, so verlöre das obige Argument der prinzipiellen Unabhängigkeit von Herbizidresistenzmarker und Herbizidapplikation seine Gültigkeit.
- <sup>74</sup> BASTA: Hoechst AG

- <sup>75</sup> ROUNDUP ist ein eingetragenes Warenzeichen der Monsanto.
- <sup>76</sup> Dies ist im gegebenen Zusammenhang (Vergleich der 3 Alternativen) auch deshalb von Bedeutung, weil sich abzeichnet, dass manche Produkte traditioneller Pflanzenzüchtung ebenfalls unter die neuen Regelungen fallen könnten.
- <sup>77</sup> Dies gilt auch, wenn der Promotor eines pflanzeigenen Gens modifiziert wurde, um das Expressionsmuster oder -niveau des Gens zu verändern.
- <sup>78</sup> Das Original bezieht sich nicht nur auf Pflanzen, sondern auch auf Tiere und Mikroorganismen; die hier nicht zitierten Kategorien c, d und f behandeln keine GMOs, sondern andere Arten von Novel Food.
- <sup>79</sup> In der englischen Originalfassung ist von "genetically modified organisms" die Rede; aus dem Text geht aber eindeutig hervor, dass damit nicht alle genetisch modifizierten (was klassische Methoden der Züchtung einschliessen würde), sondern nur *gentechisch* veränderte Organismen gemeint sind.
- <sup>80</sup> Stammt das für die Untersuchungen verwendete Genprodukt nicht direkt von dem GMO, der als Lebensmittel vorgesehen ist, muss sichergestellt werden, dass Struktur und Funktion des untersuchten Produktes mit dem in der Pflanze zu erwartenden identisch sind (dies betrifft z. B. B.t. Toxine, die aus Gründen der Handhabung in *E. coli* produziert werden).

