



Bescheid 6786-01-0085 / 42010.0085

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch verändertem Mais
(*Zea mays* L.) T25
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde
Berlin, den 14. Mai 1998**

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
 - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
 - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
 - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
 - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
 - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
 - III.2 Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

III.1.2.1. Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen

(a) Das synthetische *pat*-Gen

Das synthetische *pat*-Gen in den gentechnisch veränderten Maispflanzen kodiert eine Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT).

L-Phosphinothricin ist ein Glutaminsäure-Analog und inhibiert die pflanzliche Glutaminsynthetase. Die Hemmung der Glutaminsynthetase hat durch die Akkumulation von Ammonium

den Zelltod zur Folge. Aus diesem Grund findet Phosphinothricin (Glufosinat-Ammonium) als Wirkstoff in dem nicht-selektiven Herbizid Basta® Verwendung. Phosphinothricin enthält die Enantiomeren D- und L-Phosphinothricin im Verhältnis 1 : 1. D-Phosphinothricin wirkt nicht als Glutaminsynthetase-Hemmstoff.

Im Unterschied zu nicht gentechnisch veränderten Pflanzen, die mit Phosphinothricin behandelt werden, wird in den gentechnisch veränderten Pflanzen das L-Phosphinothricin durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase acetyliert, wodurch N-Acetyl-L-Phosphinothricin entsteht, das keine herbizide Wirkung hat. Die gentechnisch veränderten Pflanzen sind dadurch tolerant gegenüber dem Herbizid Phosphinothricin. Die Substratspezifität der Phosphinothricin-Acetyltransferase ist hoch. Selbst das Phosphinothricin-Analog Glutamat wird kaum umgesetzt. D-Phosphinothricin wird durch die Phosphinothricin-Acetyltransferase nicht metabolisiert.

Die gentechnisch veränderten Maispflanzen sollen mit Phosphinothricin behandelt werden. Das dabei in den Pflanzen gebildete N-Acetyl-L-Phosphinothricin wird aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit während des weiteren Pflanzenwachstums in den Pflanzen verteilt. Dabei findet durch die Zunahme der Biomasse eine Konzentrationsabnahme statt. Es gibt keine Hinweise, daß N-Acetyl-Phosphinothricin in den gentechnisch veränderten Pflanzen weiter metabolisiert wird.

Aus den auf dem Feld verbleibenden Teilen der gentechnisch veränderten Pflanzen gelangt das in diesen noch befindliche N-Acetyl-Phosphinothricin bei der Verrottung in den Boden und wird dort durch Mikroorganismen wieder in L-Phosphinothricin umgesetzt. D/L-Phosphinothricin wird im Boden, ebenfalls durch Mikroorganismen, abgebaut.

Nach den vorgelegten Daten weist N-Acetyl-L-Phosphinothricin eine deutlich geringere Toxizität als Phosphinothricin auf. Phosphinothricin ist von der Biologischen Bundesanstalt nach dem Pflanzenschutzgesetz zugelassen. Im Rahmen dieser Zulassung wurde auch eine toxikologische und ökotoxikologische Bewertung des Mittels vorgenommen.

Schädliche Einwirkungen der in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthaltenen Phosphinothricin-Acetyltransferase wären bei einem Verzehr von Pflanzenteilen durch Tiere oder Menschen ebenfalls nicht zu erwarten. Bei einer oralen Aufnahme wäre davon auszugehen, daß das Enzym ebenso wie Proteine im allgemeinen im Verdauungstrakt abgebaut würde.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen werden nach Versuchsende entsorgt und sind nicht zum Verzehr oder zur Verfütterung vorgesehen. Zu Versuchszwecken oder als Saatgut geerntete Maiskörner werden in eine entsprechende Anlage gebracht und sind ebenfalls nicht zum Verzehr oder zur Verfütterung vorgesehen. Selbst bei einem unbeabsichtigten Verzehr durch Tiere oder Menschen wären keine schädlichen Einwirkungen auf deren Gesundheit zu erwarten.

(b) Die kodierende Sequenz des α -Fragments der β -Galaktosidase

In dem zur Transformation der Maispflanzen verwendeten Vektor pUC/Ac (Ausgangsvektor: pUC18) wurde das synthetische *pat*-Gen in die kodierende Sequenz des α -Fragments der β -Galaktosidase inseriert. Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Ga-

laktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Lactose, die in Galaktose und Glucose hydrolysiert wird. Als α -Fragment werden die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren der β -Galaktosidase bezeichnet. Das α -Fragment alleine ist enzymatisch nicht aktiv, eine Komplementation in geeigneten Wirten ist jedoch möglich. Durch die Insertion des *pat*-Gens wurde die für das α -Fragment der β -Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so daß sie u. a. in *E. coli*-Bakterien, die den Vektor pUC/Ac enthalten, nicht mehr für ein komplementationsfähiges α -Fragment kodieren kann. Dies ermöglichte bei der Klonierung des *pat*-Gens in *E. coli* die Selektion derjenigen Bakterien, in denen das Gen in den Vektor pUC18 integriert worden war.

Die unterbrochene Sequenz des α -Fragments der β -Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert. Veränderungen in den gentechnisch veränderten Maispflanzen aufgrund des Vorhandenseins dieser Sequenz sind nicht zu erwarten.

(c) Das β -Lactamase-Gen

Das β -Lactamase-Gen wurde als Bestandteil des Vektors pUC18 in die Maispflanzen eingeführt. Durch PCR-Versuche mit spezifischen Primer-Kombinationen wurde von der Firma AgrEvo nachgewiesen, daß das 3'-terminale Ende des β -Lactamase-Gens in das Mais-Genom integriert wurde. PCR-Untersuchungen mit Primern komplementär zum 5'-terminalen Bereich des β -Lactamase-Gens führten weder in 5'-3'- noch in 3'-5'-Richtung zu amplifizierten DNA-Fragmenten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das Plasmid pUC18 zur Integration in dieser Region gespalten wurde. Es ist daher nicht zu erwarten, daß das in den gentechnisch veränderten Maispflanzen vorhandene, unvollständige β -Lactamase-Gen ein funktionsfähiges Enzym kodieren kann.

Die Firma Hoechst hat an Nachkommen des Transformationsereignisses T₂₅ Untersuchungen zur β -Lactamase-Aktivität durchgeführt. Dabei wurde in Proteinextrakten aus Blättern der gentechnisch veränderten Pflanzen keine solche Aktivität festgestellt.

(d) Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Maispflanzen enthalten ins Genom integriert den 35S-Promotor und -Terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV), den Promotor des β -Lactamasegens, und den Promotor des Lactose-Operons aus dem Plasmid pUC18.

Die 35S-Promotor- und Terminatorsequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden kodierenden Sequenz der Phosphinothricin-Acetyltransferase in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Bildung dieses Enzymes in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1 (a).

(e) Der Replikationsursprung des Plasmids pBR322

Die vorgelegten Ergebnisse der PCR-Untersuchungen zeigen, daß der Bereich des Plasmids pUC18 in das Maisgenom integriert wurde, in dem der Replikationsursprung lokalisiert ist.

Bei der Bewertung wurde deshalb davon ausgegangen, daß der Replikationsursprung in das Pflanzengenom integriert wurde.

Der Replikationsursprung von pBR322 ermöglichte die Vermehrung des Vektors pUC/Ac in *E.coli*-Bakterien, aus denen der Vektor nach der Vermehrung isoliert und dann zur Mais-transformation verwendet wurde. Der Replikationsursprung stammt aus dem Plasmid pMB1, das zur Gruppe der ColE1-ähnlichen Plasmide gehört. Das ColE1-Replikon besitzt einen engen Wirtsbereich, der auf *E. coli* und einige verwandte Bakterienarten beschränkt ist. Der Replikationsursprung von pBR322 funktioniert nicht in den Zellen der Maispflanzen.

(f) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Insertionsorts ("Positionseffekt"). Unter Freilandbedingungen kann die Expressionsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflußt werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, daß die gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland nicht in gleichem Maß tolerant gegenüber Phosphinothricin sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Dies könnte bei Anwendung von Phosphinothricin zu einer Schädigung der gentechnisch veränderten Pflanzen führen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten. Auch im Hinblick auf die übrigen übertragenen Eigenschaften kann aus einer veränderten Expressionsstärke kein Risiko für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren abgeleitet werden.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der Vermehrung der gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus und auch im Rahmen weiterer Freisetzungsvorhaben mit den gentechnisch veränderten Maispflanzen wurden jedoch keine Beobachtungen gemacht, die auf ein solches Ereignis hindeuten.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor und wurden zuerst beim Mais nachgewiesen. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Maispflanzen in Klimakammern bzw. Gewächshäusern sowie aus Freisetzungen in Deutschland und im Ausland von Pflanzen, die die Phosphinothricin-Acetyltransferase exprimieren, keine Hinwei-

se auf eine erhöhte Allergenität durch Pollen dieser Pflanzen vor. Von der Firma Hoechst wurden Untersuchungen zum Gehalt an PAT und zur PAT-Aktivität in Pollen der gentechnisch veränderten Maispflanzen durchgeführt. Weder das Protein noch die entsprechende Enzymaktivität wurden nachgewiesen.

III.1.2.2. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Maispflanzen, im Freiland zu überdauern oder sich zu etablieren

Maispflanzen und Maissamen sind nicht winterhart. Mais ist unter den klimatischen Bedingungen Mitteleuropas nicht überdauerungsfähig. Das in die Maispflanzen bzw. -samen eingeführte Erbmateriale verleiht lediglich eine Toleranz gegenüber dem Herbizidwirkstoff Phosphinothricin. Es ist davon auszugehen, daß die Überdauerungseigenschaften nicht verändert worden sind.

In dem zur Genehmigung beantragten Versuch ist vorgesehen, den Mais zur Körnerreife gelangen zu lassen. Ein Auftreten von Durchwuchsmais ist selbst bei Körnermais, der in der Vollreife geerntet wird, in Mitteleuropa nicht beobachtet worden. Sollten dennoch - entgegen landwirtschaftlicher Erfahrung - nach Beendigung der Freisetzung auf der Versuchsfläche gentechnisch veränderte Maispflanzen auflaufen, so würden sie durch die vorgesehene Nachkontrolle erfaßt und beseitigt werden. Damit ist eine zeitliche und räumliche Begrenzung des Freisetzungsvorhabens sichergestellt. Die Antragstellerin hat eine Anbaupause und Nachkontrolle für einen Zeitraum von zunächst einem Jahr vorgesehen. Die Dauer der Nachkontrolle auf nachwachsende Maispflanzen wird bei Beachtung der Nebenbestimmung II.7. als ausreichend betrachtet.

Zur Entsorgung sollen die gentechnisch veränderten Maispflanzen sowie die nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen des Versuchs zur Körnermaisreife gehäckselt und auf der Versuchsfläche zur Verrottung in den Boden eingearbeitet werden. Auch wenn ein Teil der Maiskörner durch das Häckseln nicht zerstört werden sollte, so ist davon auszugehen, daß sich aus diesen unter Freilandbedingungen keine überdauerungsfähigen Pflanzen entwickeln können.

III.1.2.3. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Gene von den gentechnisch veränderten Maispflanzen durch Pollen auf andere Pflanzen

Eine Übertragung der eingeführten Gene von den gentechnisch veränderten Maispflanzen auf Pflanzen anderer Arten ist nicht möglich, da Mais in der mitteleuropäischen Flora keine Kreuzungspartner besitzt. Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Maispflanzen auf andere Maispflanzen eingegangen.

Maispollen wird in der Regel durch den Wind verbreitet. Eine - von der Antragstellerin vorgesehene - 8 Meter breite Mantelsaat aus nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen wird als hinreichend zur Einschränkung des Austragens von Maispollen aus dem Versuchsgelände angesehen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß auch in einer Entfernung von mehr als 8 m einzelne Maiskörner an nicht gentechnisch veränderten Maispflanzen durch Befruchtung mit Pollen gentechnisch veränderter Pflanzen gebildet werden können.

Aus den Erwägungsgründen unter III.1.2.1. folgt, daß von Maissamen bzw. daraus aufwachsenden Pflanzen, die durch Bestäubung mit Pollen der gentechnisch veränderten Pflanzen entstehen könnten, selbst bei einem eventuellen Verzehr keine gesundheitlichen Gefährdungen zu erwarten wären.

Wie unter III.1.2.2. dargelegt, wären Maissamen bzw. daraus aufwachsende Pflanzen, die durch Bestäubung mit Pollen der gentechnisch veränderten Pflanzen entstehen könnten, nicht winterhart und daher nicht in der Lage, zu überdauern.

III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Maispflanzen über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und ihrer Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, daß auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich ist.

Soweit anzunehmen ist, daß ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Samenpflanzen und Bakterien tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, daß das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmateriale, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Das synthetische *pat*-Gen kann auch in Bakterien vom CaMV-Promotor exprimiert werden und verleiht Resistenz gegenüber dem Herbizidwirkstoff Phosphinothricin. Untersuchungen zum Abbau von Phosphinothricin in Böden haben gezeigt, daß Enzyme, die eine Acetylierung von Phosphinothricin durchführen und damit dessen Inaktivierung bewirken, häufig in Bodenbakterien vorkommen. Es ist zu bezweifeln, daß die Anwendung von Phosphinothricin als Herbizid eine Veränderung der Zusammensetzung der Bodenmikroflora bewirkt, da Phosphinothricin im Boden sehr schnell inaktiviert wird und zudem ein für die meisten Bakterien nur sehr gering wirksames Antibiotikum ist. Selbst wenn der Herbizideinsatz zu einer Selektion resistenter Bakterien führen würde, wird der Ursprung und die Ausbreitung der Resistenz in den Bakterien selbst begründet sein und nicht auf einen Gentransfer von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen zurückzuführen sein. Zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Bakterien würde ein eventuell stattfindender horizontaler Gentransfer nicht beitragen.

Das in den gentechnisch veränderten Maispflanzen enthaltene Gen für die α -Untereinheit der β -Galaktosidase ist durch Insertion des *pat*-Gens unterbrochen, so daß, wie bereits unter III.1.2.1. ausgeführt wurde, kein funktionsfähiges Genprodukt gebildet werden kann. Dies wäre auch in Bakterien der Fall, die die Sequenz für die α -Untereinheit durch horizontalen Gentransfer aus den gentechnisch veränderten Pflanzen aufnehmen würden.

In den gentechnisch veränderten Maispflanzen liegt eine unvollständige Kopie des β -Lactamase-Gens aus pUC18 vor, dem ein bakterieller Promotor vorgeschaltet ist. Die von der Firma AgrEvo durchgeführten, im Antrag enthaltenen PCR-Untersuchungen zeigen, daß das 3'-terminale Ende des β -Lactamase-Gens in das Maisgenom integriert wurde. PCR-Untersuchungen mit Primern komplementär zum 5'-terminalen Bereich des β -Lactamase-Gens führten weder in 5'-3'-Richtung noch in 3'-5'-Richtung zu amplifizierten DNA-Fragmenten. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß das Plasmid pUC18 zur Integration in dieser Region gespalten wurde. Entsprechend lägen der 5'-terminale Bereich und der 3'-terminale Bereich räumlich getrennt und in nicht funktionaler Orientierung im Maisgenom integriert vor. Unter diesen Umständen wäre auch nach einem horizontalen Gentransfer nicht mit der Expression eines funktionsfähigen Genproduktes zu rechnen.

TEM-1- β -Lactamase-Gene, die eine Resistenz gegen eine Reihe von β -Lactam-Antibiotika verleihen, sind in einer Reihe von Enterobacteriaceen sowie einigen weiteren Gram-negativen Bakterienarten vorhanden. Durch effektive Transfermechanismen können Antibiotika-Resistenzgene zwischen verschiedenen Bakterien übertragen werden. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz der Resistenzmechanismen in der Umwelt nicht erkennbar erhöht.

Es ist davon auszugehen, daß der Replikationsursprung von pUC18 (pMB1-Replikon) in den gentechnisch veränderten Maispflanzen chromosomal integriert vorliegt. In den gentechnisch veränderten Pflanzen ist diese Nukleinsäuresequenz funktionslos; in bestimmten Bakterien ist hingegen eine Funktion als Replikationsursprung zu erwarten. Das pMB1-Replikon gehört zum Typ der ColE1-Plasmide, die einen auf einige Gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich haben. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterienspezies, wie z.B. *Serratia* oder *Salmonella*, replizieren. In den meisten Gram-negativen Bodenbakterien erfolgt keine Replikation. In Enterobakterien treten ColE1-Plasmide recht häufig auf. Ein Gentransfer ausgehend von Enterobakterien auf andere Bakterien ist als weitaus wahrscheinlicher anzusehen als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien. Es ist deshalb nicht zu erwarten, daß die eventuelle Präsenz des Replikationsursprungs von pUC18 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.