



Antrag 6786-01-0182

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten

Erbsen (*Pisum sativum*; Eiffel)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 25. April 2007

Hinweis zu diesem Dokument:

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) Die kodierenden Sequenzen für den Einkettenantikörper BA11, das LeB4-Signalpeptid, den Hexa-Histidin-Anker und das Retentionssignal KDEL

In die gentechnisch veränderten Erbsen wurden die kodierenden Sequenzen für das LeB4-Signalpeptid, den Einkettenantikörper BA11, einen Hexa-Histidin-Anker und das Retentionssignal KDEL transferiert. Die gentechnische Veränderung bewirkt in den gentechnisch veränderten Erbsensamen die Bildung des scFv-Antikörpers BA11.

Bei einem scFv-Antikörper handelt es sich um ein synthetisches Produkt aus den variablen Bereichen der schweren und leichten Kette eines vollständigen Antikörpers, welche durch einen synthetischen Peptidlinker verbunden sind. Die Fähigkeit, an Antigene zu binden, bleibt erhalten. ScFv-Antikörper finden diagnostische und therapeutische Anwendung.

Die Nukleotidsequenz, die für den scFv-Antikörper BA11 kodiert, stammt aus der Maus (*Mus musculus*). Unter Verwendung der Phagen-Display-Technologie wurde eine Nukleotidsequenz isoliert, die für einen scFv-Antikörper kodiert, der gegen F4-Fimbrien von *E. coli*-Zellen gerichtet ist (Einkettenantikörper BA11). F4 ist das wichtigste und am häufigsten vorkommende Fimbrienantigen schweinepathogener *E. coli*-Stämme. Diese Fimbrien vermitteln die Anheftung von enterotoxischen *E. coli* (ETEC) an die Darmwand von Schweinen, welche Voraussetzung ist für die Entstehung von Infektionen, die zu Durchfällen führen. Eine besondere Bedeutung haben ETEC bei Absatzferkeln als Auslöser der „postweaning diarrhea (PWD)“. Diese bakteriellen Durchfälle können zu Verlust bzw. verzögertem Wachstum von Tieren führen. *In vitro* wurde gezeigt, dass das Antikörperfragment BA11 die Anheftung von F4-Fimbrien-tragenden *E. coli* an Darmzotten verhindert.

Die Nukleotidsequenz, die für das LeB4-Signalpeptid kodiert, stammt aus der Ackerbohne *V. faba*, die als Viehfutter und Gemüse Verwendung findet. Das N-terminale Signalpeptid bewirkt den Transport des Fusionsproteins in das endoplasmatische Retikulum. Signalsequenzen werden im Lumen des ER durch Peptidasen abgespalten. Durch das Signalpeptid wird in Verbindung mit dem C-terminalen Retentionssignal KDEL eine Akkumulation des rekombinanten Antikörperfragments im endoplasmatischen Retikulum erreicht. Das Retentionssignal KDEL ist eine kurze Aminosäuresequenz (Lys-Asp-Glu-Leu), die neben HDEL (His-Asp-Glu-Leu) in eukaryotischen Zellen die Retention von Proteinen im endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Durch das Retentionssignal KDEL wird der Einkettenantikörper im ER zurückgehalten und damit die Sekretion verhindert, was eine größere Anreicherung bewirkt.

Ein Hexa-Histidin-Anker wurde zu Nachweis- bzw. Aufreinigungszwecken angefügt, er besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidin-Resten.

Mittels Southern Blot-Analyse und Analyse des Segregationsverhaltens wurde gezeigt, dass im Genom von Pflanzen der Linie BA11-2 eine Kopie des Inserts vorliegt und die Pflanzen homozygot sind.

In den gentechnisch veränderten Erbsen wird die Expression der eingeführten Nukleotidsequenzen vom USP(+)-Promotor aus *Vicia faba* und dem Terminator des CaMV 35S Transkripts kontrolliert. Der USP(+)-Promotor reguliert die samenspezifische Expression der von ihm kontrollierten Gene, wobei auch in Pollen Expression beobachtet werden konnte.

Die Expression des Zielproteins wurde in Samen der Linie BA11-2 mittels Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließender Silberfärbung bzw. Western Blot-Analyse nachgewiesen.

Je kg Erbsensamen der Linie BA11-2 akkumulieren bis zu 2 g des Antikörperfragments BA11. Die Expression in Blättern, Ranken, Blüten, Stängeln und Wurzeln der gentechnisch veränderten Erbsen wurde mittels ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) und Western Blot untersucht. Es wurde gezeigt, dass in Blättern, Blattranken, Stängeln und Wurzeln kein Antikörperfragment gebildet wird. In Extrakten aus Blüten wurde, laut Antragsunterlagen, bei beiden Methoden der Nachweis durch Kreuzreaktionen gestört. Die Bildung des Antikörperfragments in Blüten und Pollen kann nicht ausgeschlossen werden.

Der Verzehr von Samen oder weiteren Pflanzenteilen der gentechnisch veränderten Erbsen ist im Rahmen des Freisetzungsvorhabens nicht vorgesehen. Eine Verfütterung von geernteten Erbsensamen im Rahmen von Tierversuchen ist geplant. Es wurden bereits Tierversuche mit Einkettenantikörper-produzierenden gentechnisch veränderten Erbsensamen der Linie BA11-2 durchgeführt.

Bei versehentlichem Verzehr gentechnisch veränderter Erbsensamen durch Menschen oder Tiere sind schädliche Auswirkungen nicht zu erwarten. Das Antikörperfragment BA11 bindet spezifisch an F4-Fimbrien von schweinepathogenen *E. coli*-Zellen, eine Bindung an sonstige Epitope ist nicht zu erwarten. Selbst für den Fall, dass das Antikörperfragment BA11 unspezifisch an Proteine binden könnte, wäre hieraus keine Gefährdung abzuleiten. Immunglobuline kommen in tierischen Nahrungsmitteln ubiquitär vor, eine Gefährdung von Menschen oder Tieren durch aufgenommene Immunglobuline ist weder beschrieben noch zu erwarten. Es ist davon auszugehen, dass nur ein geringer Teil von aufgenommenem scFv-Antikörper während der Magen-Passage nicht denaturiert wird. Bei einem zufälligen Andocken an Zellen des Darmepithels von Menschen oder Tieren ist nicht von einer cytotoxischen oder modifizierenden Wirkung des Antikörpers auszugehen, da das Antikörperfragment BA11 funktional nur aus der Rezeptordomäne mit Translokationspotential besteht.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung nicht zu erwarten.

b) Weitere innerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Das zur Cotransformation der Erbsen verwendete Plasmid pPZP-USP(+)-BA11 enthält innerhalb der T-DNA-Border nur das Zielkonstrukt.

Das zur Cotransformation außerdem verwendete Plasmid pPZP-bar enthält eine Kasette zur Expression des Phosphinothricin-Acetyltransferase-Gens (*bar*-Gen) unter Kontrolle regulatorischer Sequenzen des *nos*-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*. Das *bar*-Gen wurde an anderer Stelle ins Pflanzengenom integriert als das Zielkonstrukt, durch züchterische Bearbeitung im Anschluss an die Regeneration fertiler Pflanzen wurde die Linie BA11-2 selektiert, in der das *bar*-Gen nicht vorhanden ist.

c) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Border-Regionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border-Regionen wurde jedoch berichtet. Die Plasmide pPZP-USP(+)-BA11 und pPZP-bar sind abgeleitet vom Vektor pPZP200.

Den Antragsunterlagen beiliegende Ergebnisse von Southern Blot-Untersuchungen zeigen, dass Bereiche außerhalb der T-DNA der Transformationsplasmide nicht in die gentechnisch veränderten Erbsen übertragen worden sind.

d) 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 Eigenschaften der gentechnisch veränderten Erbsen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

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 bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen wurden jedoch keine Beobachtungen gemacht, die auf ein solches Ereignis schließen lassen.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. 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 nicht grundsätzlich von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Es ist in dem beantragten Freisetzungsvorhaben nicht vorgesehen, die gentechnisch veränderten Erbsen als Lebensmittel oder Futtermittel zu verwenden. Eine Verfütterung im Rahmen von Tierversuchen ist geplant. Pollen von Erbsen wird nur in geringem Umfang durch Wind verbreitet und spielt als Auslöser von Pollenallergien keine nennenswerte Rolle.

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

P. sativum zählt zu den einjährigen, sommeranuellen Pflanzen, die sich sexuell über Samen vermehren. Eine Verbreitung der Samen im Bestand kann bei Öffnen der Hülsen vor der Ernte erfolgen. Um ein Verschleppen der Samen durch Ausfall oder durch Tiere zu verhindern, beabsichtigt die Antragstellerin, die Pflanzen entweder einzeln in Netze zu hüllen (weniger dicht bepflanzter Bereich des Freisetzungsvorhabens) bzw. die Pflanzen mit einem Netz abzudecken (dicht bepflanzter Bereich), weiter ist ein Vogelschutznetz anzubringen. Zusätzlich ist von der Antragstellerin vorgesehen, die Freisetzungsfäche mit einem engmaschigen Drahtgeflecht zu umzäunen. Eine Etablierung von Kulturpflanzen wie Erbsen außerhalb des Kultivierungsbereiches ist nicht wahrscheinlich, da keimende Erbsen konkurrenzschwach sind gegen auf der Keimfläche befindlichen Pflanzenbewuchs (Verunkrautung). Pflanzen der in Deutschland verwendeten Sommererbsensorten sind frostempfindlich und sterben bei -5 bis -9°C ab. In frostfreien Gebieten ist eine Überwinterung im Herbst ausgekeimter Samen möglich. Erbsensamen können unter bestimmten klimatischen Bedingungen (milde Winter) im Boden überdauern. Sämlinge, die aus solchen Samen aufwachsen, wären jedoch selten und wenig konkurrenzfähig und würden zudem durch die vorgesehene Nachkontrolle der Versuchsfläche erfasst. Eine vegetative Vermehrung findet nicht statt.

Es gibt keine Hinweise auf eine Ausbreitung von Kulturerbsen. Eine Etablierung außerhalb landwirtschaftlicher Nutzflächen ist nicht zu erwarten.

Die in der Versuchsplanung des vorliegenden Antrags vorgesehene Umhüllung bzw. Abdeckung der Pflanzen mit Netzen vor der Reife sowie die manuelle Ernte lassen eine unbeabsichtigte Ausbreitung der gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen nicht erwarten. Aus gegebenenfalls auf der Freisetzungsfäche verbliebenem Pflanzenmaterial können sich keine Pflanzen regenerieren. Unter Berücksichtigung der vorgesehenen Nachkontrolle ist weder mit einer Überdauerung noch mit einer Ausbreitung der gentechnisch veränderten Pflanzen zu rechnen.

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

P. sativum ist fast ausschließlich selbstbefruchtend. Die überwiegende Selbstbefruchtung wird in erster Linie dadurch bedingt, dass Erbsen kleistogam sind. Der Anteil der Fremdbefruchtung kann 1-3 % betragen und erfolgt vornehmlich durch Insekten (hauptsächlich Wildbienen). Für kommerziell verwendete Kultivare wird im Allgemeinen eine Fremdbefruchtungsrate von weniger als 1% angegeben. Der Blühvorgang der Einzelblüte dauert bei Erbsen etwa 3 Tage, für Einzelpflanzen kann mit einer Blühdauer von 2-3 Wochen gerechnet werden. Eine Pollenübertragung von gentechnisch veränderten Erbsen auf nicht gentechnisch veränderte Erbsen wird durch die vorwiegend erfolgende Selbstbefruchtung weitgehend eingeschränkt. Die Antragstellerin sieht vor, einen Abstand von mindestens 1 km zu der nächsten mit Erbsen bestellten landwirtschaftlichen Nutzfläche einzuhalten. In den Antragsunterlagen wurde weiter vorgesehen, zu Erbsenanbauten des Genbanksortiments des IPK einen Abstand von ca. 500 m einzuhalten. Darüber hinaus wurde von der Antragstellerin geplant, die gentechnisch veränderten Erbsen zeitlich versetzt (Aussaart mind. 2-3 Wochen später) zu Erbsen des Genbanksortiments auszusäen. Für den Fall, dass sich die Blühperioden der gentechnisch veränderten Erbsen und Erbsenanbauten der Genbank des IPK Gatersleben überlappen, wurde als Nebenbestimmung zur Auflage gemacht, dass während dieses Zeitraums Isolationsmaßnahmen zu ergreifen sind, die geeignet sind, Pollinatoren davon abzuhalten, die Blüten der gentechnisch veränderten Erbsenpflanzen aufzusuchen.

Vom IPK selbst ist eine Aussaat bzw. ein Anbau von Erbsen auf den Freiflächen des IPK innerhalb der Vegetationsperiode 2007 nicht vorgesehen.

Die in den Antragsunterlagen vorgesehenen Maßnahmen sind in Verbindung mit den in den Nebenbestimmungen zur Auflage gemachten Maßnahmen geeignet, eine Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten auf nicht gentechnisch veränderte Erbsen zu verhindern.

In Mitteleuropa kommen natürlicherweise keine Wildarten der Gattung *Pisum* vor, die mit *P. sativum* bastardieren können. Für eine Bastardierung mit anderen Pflanzenarten gibt es keine Hinweise.

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

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in das Genom der Empfängerorganismen integriert. Nachweise 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 sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, dass ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde.

Soweit anzunehmen ist, dass ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Pflanzen 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 heterologen Erbmateriale, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

- a) Die kodierenden Sequenzen für den Einkettenantikörper BA11, das LeB4-Signalpeptid, den Hexa-Histidin-Anker und das Retentionssignal KDEL

Die für den Einkettenantikörper BA11 kodierende Sequenz stammt aus der Maus. Die für das LeB4-Signalpeptid kodierende Sequenz stammt aus der Ackerbohne (*Vicia faba*). Die regulatorischen Sequenzen stammen aus der Ackerbohne und aus dem Blumenkohlmosaikvirus. Diese Nukleotidsequenzen kommen damit in der Umwelt häufig vor, ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus den Spenderorganismen erfolgen.

Die für das Retentionssignal KDEL kodierende Nukleotidsequenz ist synthetisch. C-terminale KDEL-Sequenzen von Proteinen sind generell in höheren Eukaryoten ein Signal zur Retention im endoplasmatischen Retikulum, sie kommen damit in der Umwelt häufig vor.

Die für den Hexa-Histidin-Anker kodierende Sequenz ist ebenfalls synthetisch, ein Hexa-Histidin-Anker besteht aus sechs aufeinander folgenden Histidin-Resten und dient der Aufreinigung oder Detektion rekombinanter Proteine.

Es ist nicht davon auszugehen, dass eine Übertragung dieser Nukleotidsequenzen Mikroorganismen einen Selektionsvorteil vermitteln würde, mögliche schädliche Auswirkungen sind daher nicht erkennbar.

- b) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Auf Grund von Untersuchungsergebnissen, die in den Antragsunterlagen dargestellt sind, ist davon auszugehen, dass die außerhalb der T-DNA-Border-Regionen liegenden Nukleinsäureabschnitte der Plasmide pPZP-USP(+)-BA11 bzw. pPZP-bar nicht in das Genom der gentechnisch veränderten Erbsen übertragen worden