

Kommentar zum „Aktualisierten und im Sinne der EG-Freisetzungsrichtlinie angepassten Gesuch für einen Kleinparzellen Freisetzungsversuch mit transgenen KP4-Weizen Varietäten“, eingereicht am 26. Juni 2003 vom Institut für Pflanzenwissenschaften, ETH Zürich

Angelika Hilbeck, Bernadette Oehen, Daniel Ammann, 2. September 2003

1. Vorbemerkung

In der Stellungnahme der EFBS vom 5. September 2001 heisst es seitens der Minderheit:

„(...)

- Die molekulare Charakterisierung des kp4-Genproduktes ist nicht abgeschlossen (der der antifungalen Wirkung des Proteins zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist noch unbekannt) und sollte im geschlossenen System erfolgen, bevor sich ein Feldversuch rechtfertigen lässt;

(...).“

In der Stellungnahme der EFBS vom 28. Februar 2002 zur Beschwerde der ETH wurde weiterhin seitens der Minderheit festgehalten:

„Sie [die Minderheit] machen insbesondere geltend, dass die Wirkungsweise des KP4Proteins bei der Vermeidung des Stinkbrandbefalls noch nicht belegt sei und (...).“

Die Minderheit betonte damals denn auch:

„Sie führen aus, dass innerhalb der EFBS im Zusammenhang mit dem Weizengesuch verschiedene Risiken diskutiert worden seien und das BUWAL den Empfehlungen der Minderheit gefolgt sei.“

Im neu vorliegenden Gesuch vom 26. Juni 2003 liegen keine neuen Angaben zur molekularen Charakterisierung der drei Transgene bla, bar und kp4 (Anzahl, Ort der Insertion), sowie zum molekularen Mechanismus von KP4 vor.

2. Kommentar zum aktualisierten Gesuch vom 26. Juni 2003

A) Wirkung des KP4-Proteins auf Stinkbrand

Die gewonnenen Daten aus den beiden Vegetationshallenversuchen sind mager:

- Die Versuchsserie 1 im Jahre 2000 schlug aufgrund überhöhter Temperaturen in den Töpfen fehl.
- Die Versuchsreihe 2 im Jahre 2001 lieferte widersprüchliche Ergebnisse insbesondere hinsichtlich der Daten über Transgenexpression und Befall etc.:
 - ⇒ Die transformierten KP4-Weizenpflanzen waren nicht weniger, sondern stärker befallen mit Stinkbrand – der gewünschte Effekt trat nicht ein.
 - ⇒ Es gab keine Korrelation zwischen Transgenexpressions- und Befallsrate. Die Resultate waren ausgesprochen variabel (Abb. 2, S 14, Versuchsbericht Vegetationshallenversuch 2001).
 - ⇒ Die Konzentration des KP4-Proteins in den Pflanzen kann nach wie vor nicht gemessen werden (dies wäre jedoch die Voraussetzung dafür, zu erkennen, ob die variable Transgenexpression mit der Transgenproduktsynthese korreliert ist; i.e. KP4-Proteinkonzentration in der Pflanze).

Schlussfolgerungen

- Die aufgetretenen Schwierigkeiten sind typisch für die frühe Phase in der Forschung und Entwicklung (F&E) von transgenen Pflanzen.
- Die Regulation der Transgenexpression und Transgenproduktsynthese in den transformierten Pflanzen ist unzureichend und nicht unter zuverlässiger Kontrolle. Die Ursachen hierfür sind unbekannt und ihre Erforschung für die Grundlagenforschung lohnenswert. Wie die Gesuchsteller einräumen, sind viele Möglichkeiten denkbar, einschliesslich molekular-genetischer Gründe, z.B. verwendeter Promotor und/oder Wechselwirkungen mit pflanzeigenen Regulationsfaktoren. Auch die Wechselwirkung der eingeführten Transgene (einschliesslich Promotor) mit Umweltfaktoren wie UV-Strahlung und/oder Temperaturschwankungen ist eine weitere denkbare mögliche Erklärung.
- Es wurden jedoch keine denkbaren Gründe benannt, die ausschliessen würden, dass sich genau die gleichen Ergebnisse in einem ähnlich konzipierten Freisetzungsversuch wiederholen würden (ein Ziel: die Hallenergebnisse zu überprüfen). Falls dies der Fall wäre, würde dies zu keiner weiteren Klärung der Ursachen beitragen. Der Freisetzungsversuch müsste ganz anders konzipiert sein, um die oben genannten Hypothesen möglicher Ursachen zu überprüfen, die dann einen Erkenntnisgewinn bringen würden
- Andererseits liessen sich die möglichen Ursachen der aufgetretenen Fragen und Unklarheiten des Vegetationshallenversuchs systematisch und effizienter in weiteren Hallenversuchen abklären, was ziemlich sicher zu einem Erkenntnisgewinn in der Grundlagenforschung (Regulationskontrolle von Transgenexpression, u.v.m.) führen würde.

- Damit stellt sich die Frage ob der Versuch nicht zu einem zu frühen F&E Zeitpunkt durchgeführt wird, um einen optimierten Nutzen und Erkenntnisgewinn zu gewährleisten.

B) Fehlende Elemente der Risikoanalyse

Essentielle Elemente einer Risikoanalyse von transgenen Pflanzen, die neuartige Transgenprodukte synthetisieren, sind:

- die zuverlässige in-planta Detektion des Transgenproduktes (hier: sicherer Nachweis des KP4-Proteins in der transgenen Pflanze)
- die in-planta Quantifizierung des/r neuartigen Transgenprodukte/s (hier: Konzentration des antifungalen KP4-Proteins in der transgenen Pflanze),
- die Charakterisierung der transgenen Pflanze (hier: in-planta, stadien- und gewebespezifische quantitative Beschreibung der KP4-Konzentrationen),
- die Kenntnis des Wirkungsmechanismus des neuartigen Transgenproduktes auf den Zielorganismus (hier: der Stinkbrand).

Ohne diese Bausteine können wissenschaftlich fundierte Gefährdungspotentiale unzureichend bis gar nicht beschrieben werden und jede Risikoanalyse bleibt spekulativ und unpräzise. Diese Elemente sind für den KP4 Weizen nach wie vor nicht genügend oder gar nicht gegeben. So sind spezifische (monoklonale) Antikörper zum Nachweis von KP4 nicht vorhanden. Polyklonale Antikörper können das KP4-Protein aus dem Pilzüberstand gut nachweisen, aber in der transgenen KP4-Pflanze nicht. Im Bericht wird erklärt, dass die Antikörper zuwenig sensitiv seien (Mitteilung ans BUWAL vom 18. November 2002, S. 7). Diese Argumente sind auf Grund der Unterlagen nicht überprüfbar. Es ist auch möglich, dass im Weizen ein Transgenprodukt hergestellt wird, das nicht mit dem gereinigten KP4 aus *Ustilago maydis* identisch ist, aber noch eine gewisse antifungale Wirkung ausübt.

C) Die Toxizität des Transgenproduktes

Es wurden einige Untersuchungen zur Toxizität des KP4-Proteins durchgeführt. Hierzu wurden gereinigte KP4-Proteine aus *Ustilago maydis* verwendet. Inzwischen liegen ausreichende Erfahrungen mit sogenannten Bt-Pflanzen vor, die ähnlich den KP4-Pflanzen die DNA eines Mikroorganismus enthalten und hier ein insektizides Protein synthetisieren anstatt einem antifungalen Protein. Das Bt-Protein, welches in den transgenen Bt-Pflanzen synthetisiert wird, ist jedoch nicht identisch mit dem Bt-Protein, wie es im Ursprungsorganismus (*Bacillus thuringiensis*) oder transgenen Mikroben (*E. coli*) produziert wird (130 kDa, trypsiniert 65 kDa).

So wird im Mon810 Bt-Mais beispielsweise ein 91kDa Cry1Ab-Protein synthetisiert, im Event176 Mais dagegen ein 65 kDa Cry1Ab-Protein mit zusätzlichen Teilstücken der Größen 36, 40 and 60 kDa (siehe Tabelle 1). Als Ursache wird eine in-planta Proteolyse mittels pflanzeigener Proteasen vermutet. Sie alle können durchaus vielfältige Einzel- und Kombinationswirkungen auf Ziel- und Nichtzielorganismen ausüben.

Von daher sind Toxikologie- und Ökotoxikologieuntersuchungen mit gereinigten, ex-planta Transgenprodukten, wie sie für den KP4 Weizen gemacht wurden, nur ein erster Schritt und ein Teilaspekt in der Abklärung von Ziel- und Nichtzieleffekten von transgenen Pflanzen.

Event/Company T-gene/ Promotor	Size of Bt protein in plant	Tissue-specific expression ($\mu\text{g/g}$ fresh weight unless otherwise stated)
Bt-maize 176/Syngenta Cry1Ab PEPC	65kDa plus 3 immunoreactive proteins 36, 40 and 60 kDa in leaves but not pollen Suggested: break-down products from intrinsic proteolysis	Leaves (seedling): 0.16-1.16 Leaves (anthesis): 0.53-3.03 Leaves (maturity): 0.44-0.47 Leaves (senescens): 0.07-0.23 Pollen: 1.14-2.35 Roots: 0.008 Pith: < 0.008 Kernels: <0.005 Leaves (anthesis): 2.13-3.27 Pollen: ca. 2.4 (mean)
Bt11-maize/Syngenta Cry1Ab CaMV35S	Probably 65 kDa (EPA)	Leaves (young) : 15-29 (dry weight) Kernels: 3.7-4.76 (dry weight) Pollen: no expression Leaves: 1.55-10.53 (own data)
Mon810 maize/Monsanto Cry1Ab Enhanced CaMV35S	91 kDa	Leaves : 9.35 (mean) range : 7.93-10.34 Kernels: 0.31 (mean) range: 0.19-0.39 Pollen: 0.09
TC1507- maize/Mycogen/Pioneer Cry1Fa2 Ubiquitin promotor	65 kDa 65 and 68 kDa (‘...two bands detected in leaf, pollen, whole plant and grain tissue ... as a result of the activity of g processing by a plant protease with trypsin-like specificity.’)	Leaves: 110.9 ng/mg total protein Pollen: 0.32 ng/mg total protein Kernels: 89.8 ng/mg total protein Leaves: 56.6-148.9 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ total extractable protein Pollen: 113.4168-2 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ total extractable protein Stalk: 355.9-737.4 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ total extractable protein Kernels: 71.2-114.8 $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ total extractable protein

(Extracted from Hilbeck & Andow 2003, Data requirements for ecological risk assessment of transgenic plants. In: The Dissimination of GMOs in Agro-Ecosystems (eds T. Lelley, M. Tepfer, E. Balázs))

D) Ziele des Versuches

Aufgrund der vorangegangenen Überlegungen stellt sich die Frage über die Zukunft des KP4-Weizens nach Beendigung des kostspieligen Freisetzungsversuchs und dem zu erwartenden Erkenntnisgewinn. Aus den Unterlagen geht darüber nichts hervor.

Die Weiterentwicklung des KP4-Weizens würde nur Sinn machen, wenn sie in ein weiteres Forschungs- und Entwicklungsprogramm eingebettet wäre, welches oben genannte wichtige Wissenslücken schliessen würde:

- Verfügbarkeit von in-planta Detektionsmethoden.
- Quantifizierung der/s neuartigen Transgenprodukte/s.
- eine solide Charakterisierung des transgenen KP4-Weizens und
- die Erforschung des Wirkungsmechanismus auf den Stinkbrand oder etwaige andere Organismen.

Weitere Gesuche um Freisetzungsbewilligungen in einem einseitig fortgeschrittenen F&E Stadium würden sonst wiederum wegen denselben wichtigen Wissenslücken Rückschläge und Verzögerungen erleiden.

Falls es zu keiner Weiterentwicklung des KP4 Weizens kommt, ist unklar, wozu der Freisetzungsversuch dient, da er auch nicht dazu konzipiert ist, die aufgeworfenen Fragen im Hallenversuch zu überprüfen. Lediglich die Überprüfung der Hallenergebnisse scheint uns verfrüht zu sein in Anbetracht der unberechenbaren und variablen KP4-Transgenexpression im semi-Freilandversuch und scheint kaum den enormen Aufwand des Freisetzungsversuchs zu rechtfertigen.