

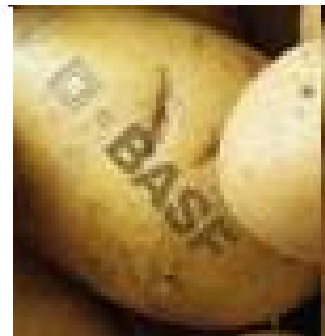
Gentechnik in Lebens- und Futtermitteln

Hermann Broll

Übersicht

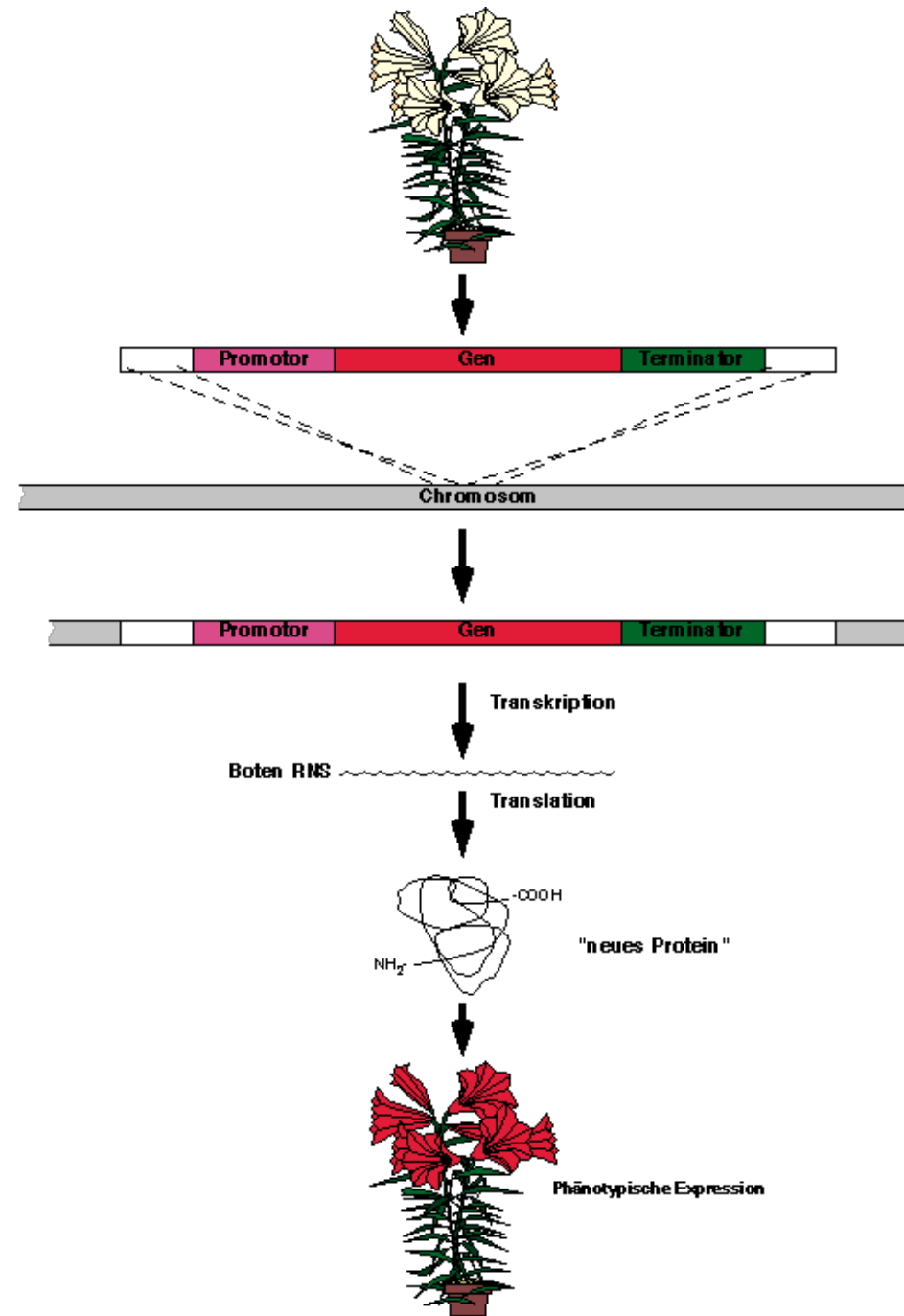
- **Anbau von genetisch veränderten Organismen (GVO)**
- **Rechtliche Voraussetzung für das Inverkehrbringen von GVO**
in der EU
- **Risikobewertung von GVO**
- **Nachweis von genetisch veränderten Bestandteilen in Lebens-
und Futtermitteln**

Lebens- und Futtermittel aus genetisch veränderten (gv) Pflanzen

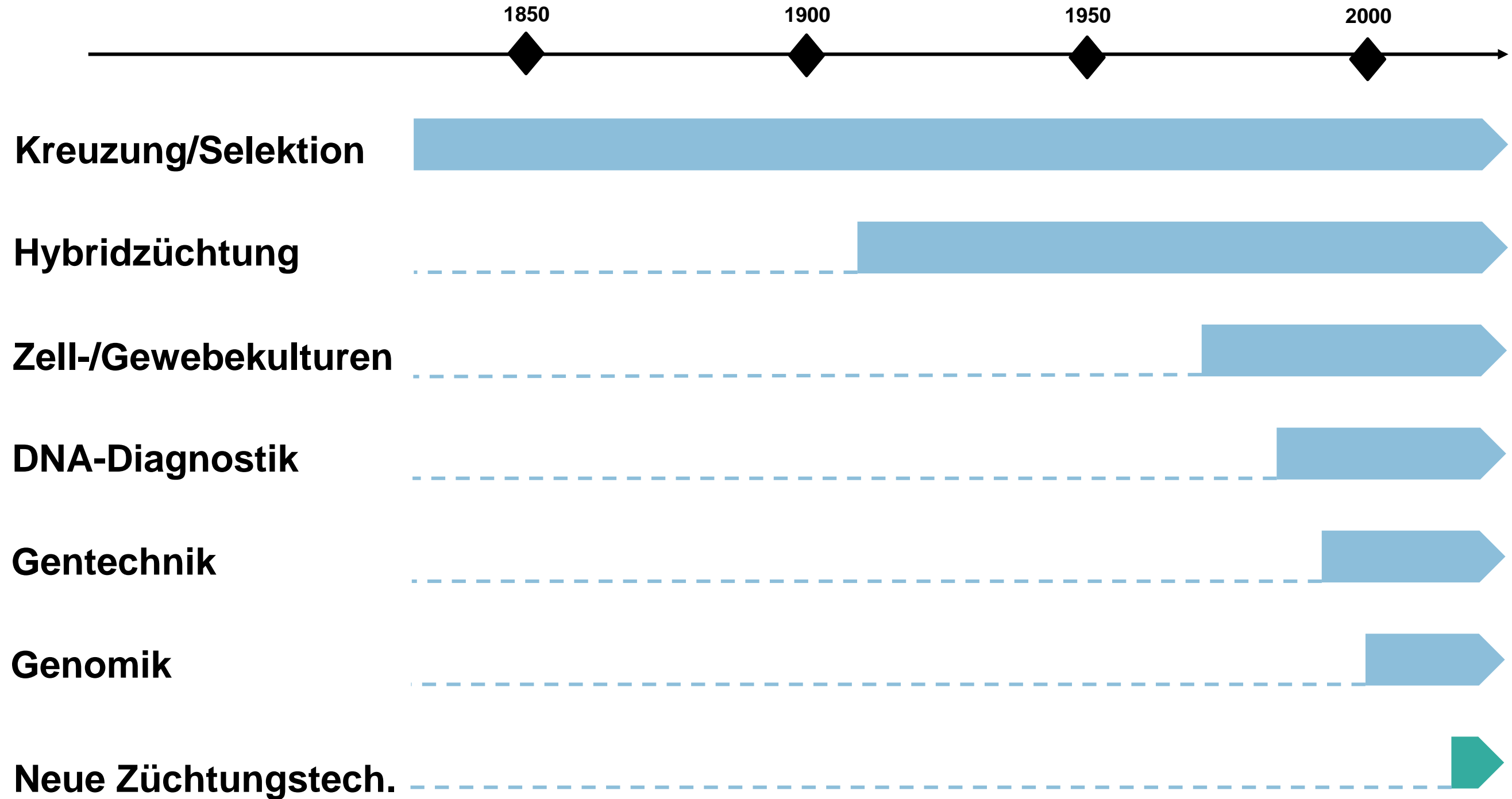


Gentechnik

- ✓ Über Arten-Grenzen hinweg möglich
- ✓ gezielt einzelne Gene einbringen



Historie der Pflanzenzüchtung



Methoden der genetischen Veränderung

Bisherige Techniken

- Transgenese - Einbringen artfremder Gene
- RNA-Interferenz (RNAi)
 - Einbringen von Genfragmenten; deren Expression bewirkt die Inhibierung der Expression spezifischer endogener Gene

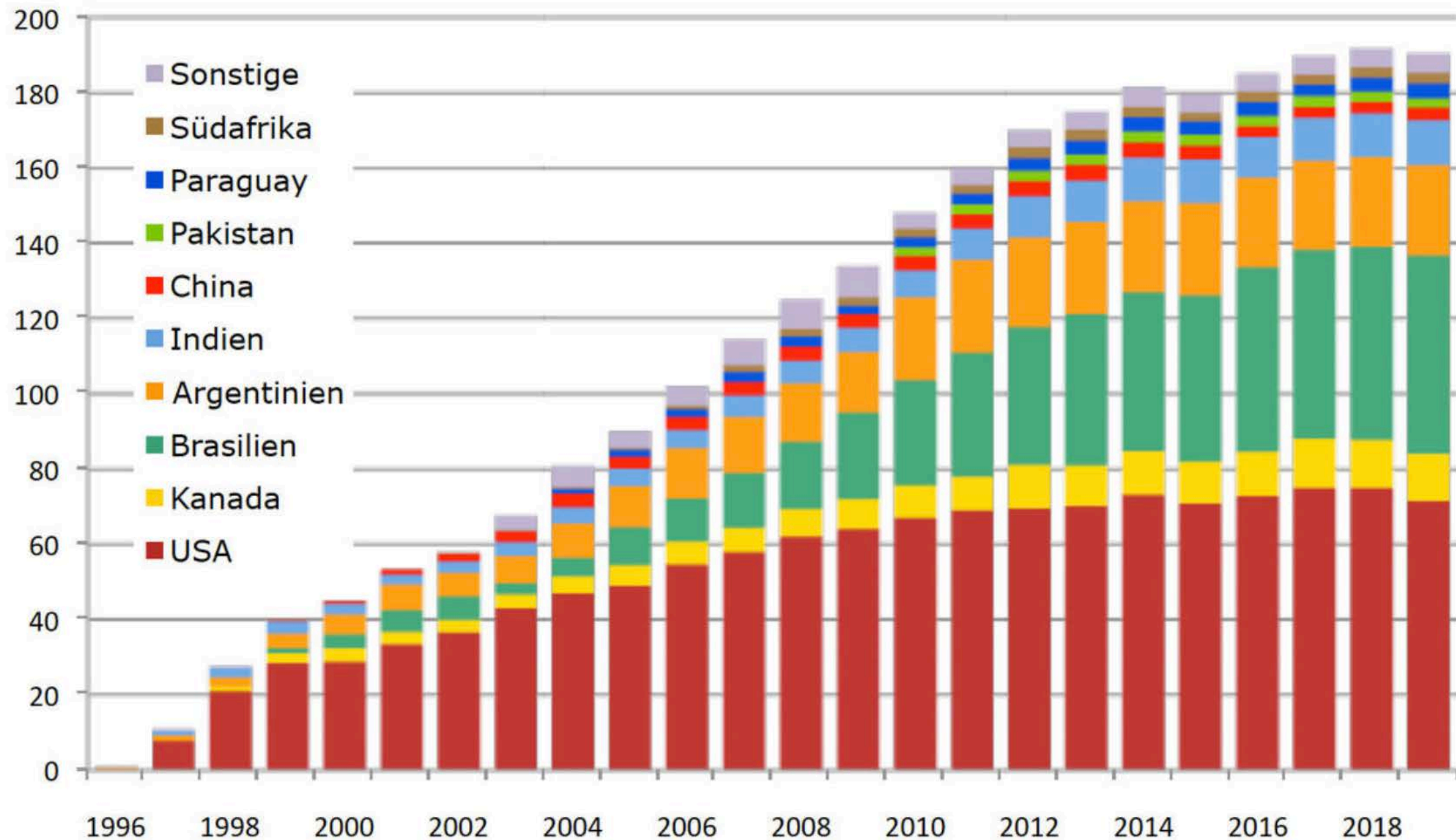
Neue Techniken

- **Genome Editing** Techniken
 - zielgenaue Veränderung von Genen durch:
 - Zinkfinger Nukleasen (ZFN 1, 2, 3)
 - Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs)
 - Oligonukleotid-gesteuerte Mutagenese (OGM)
 - **CRISPR/Cas9** → *EuGH, 25.07.2018: die Organismen fallen unter das EU Gentechnik-Recht (RL 2001/18/EG)*

Züchtungsziele – Mais, Sojabohnen, Raps, ...

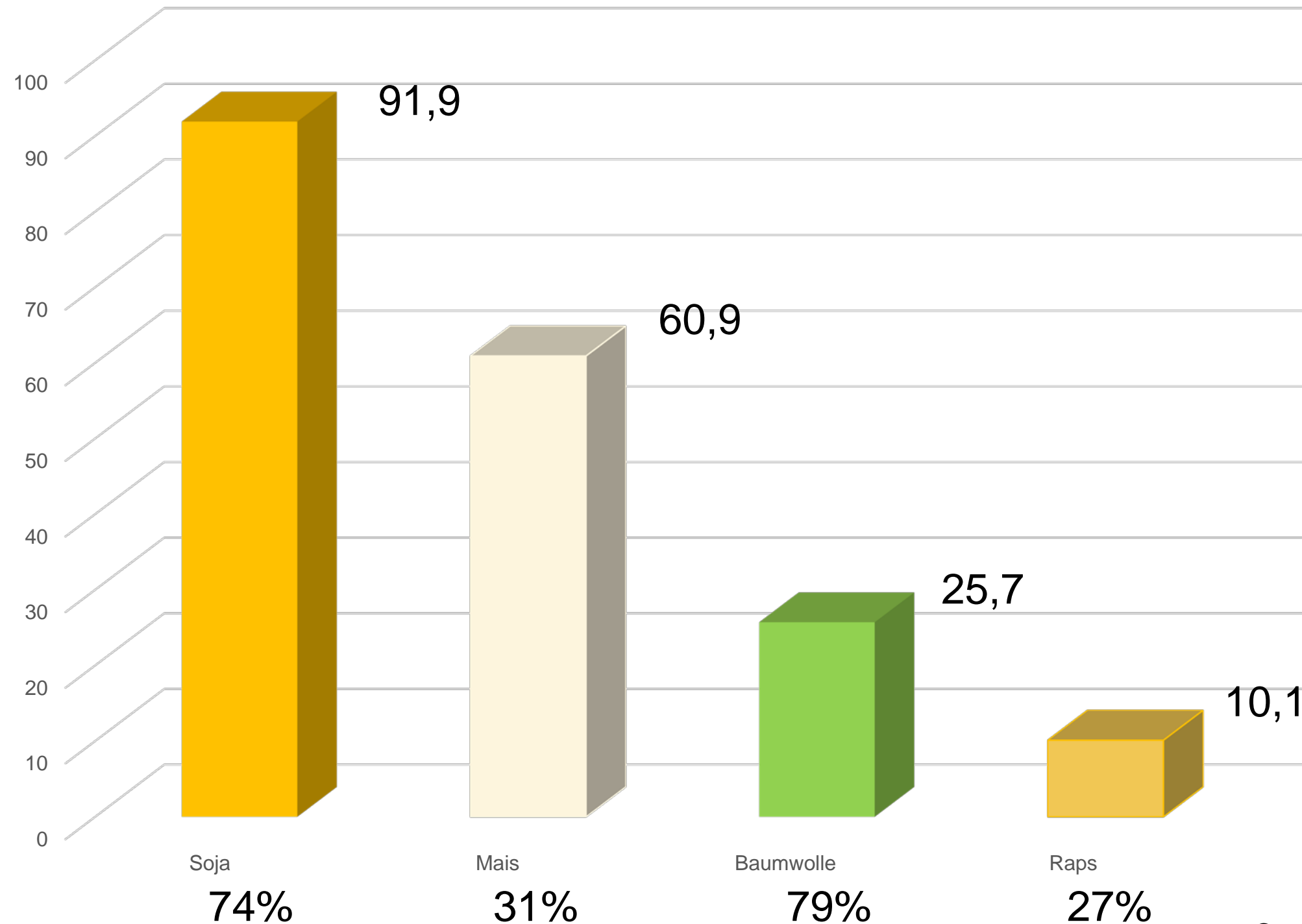
- **Insektenresistenz**; vor allem durch die Übertragung der Gene für verschiedene Bt-Toxine; (Resistenzen vor allem gegen den Maiszünsler und als neue Entwicklung gegen den Maiswurzelbohrer)
- **Herbizidresistenz**; zunehmend auch in Kombinationen mit Insektenresistenz
- Veränderung der **Fettsäurezusammensetzung** hinzu **mehrfach ungesättigten Fettsäuren**
- Männliche Sterilität zur Erleichterung der Züchtung von **Hochertragsorten** (Hybridsorten); meist zusammen mit Herbizidresistenz

GVP Anbau weltweit 1996 – 2019 in Mio Hektar



www.transgen.de (Quelle: ISAAA)

Kulturpflanzen in Mio Hektar in 2019 und der GVP-Anteil (%)



Quelle: ISAAA-Report 55-2019

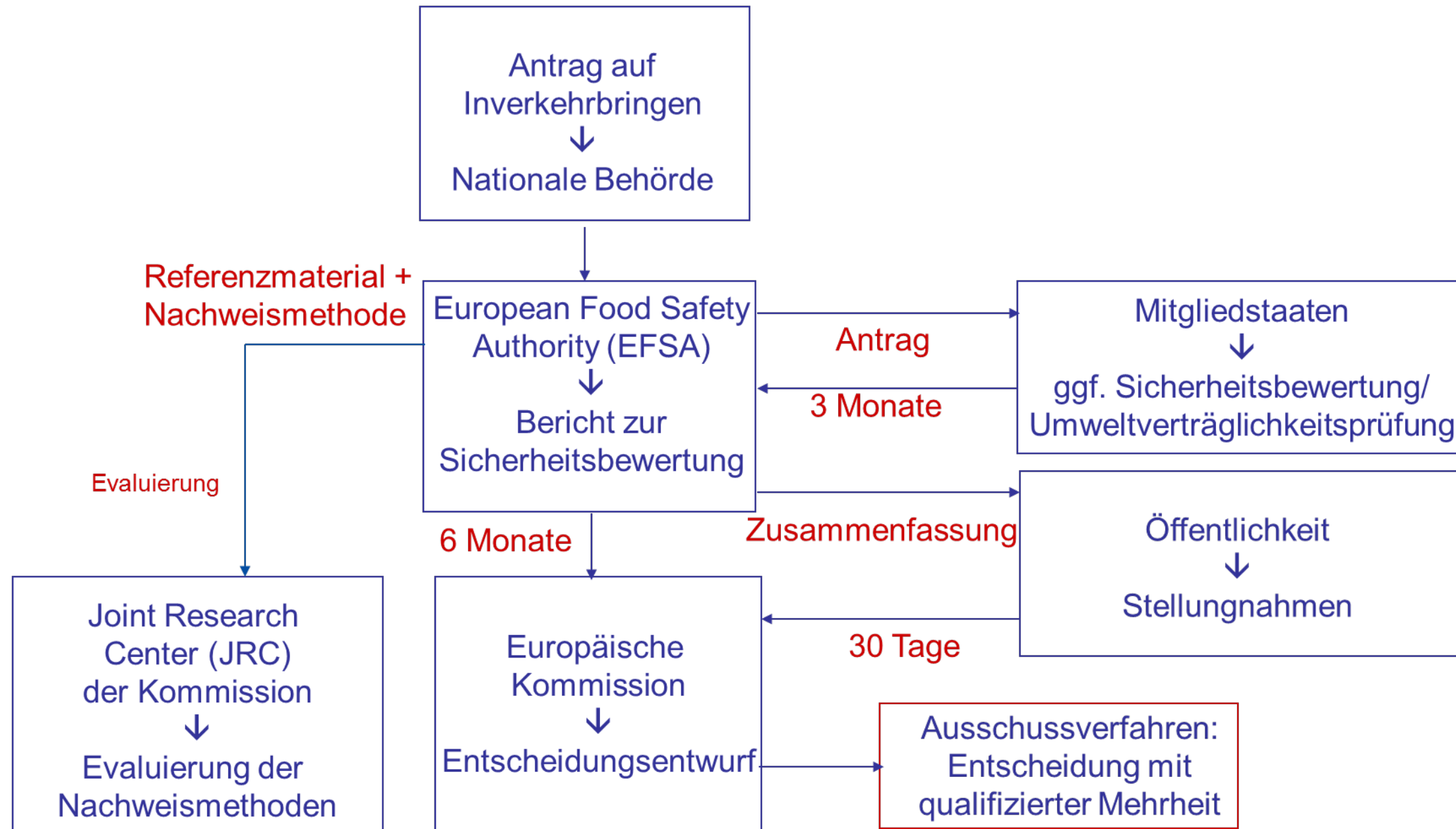


- **Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 über genetisch veränderte Lebensmittel und Futtermittel**

Lebensmittel / Futtermittel dürfen

- keine nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier oder die Umwelt haben
 - die Verbraucher / Anwender nicht irreführen
 - sich von den Lebens- / Futtermitteln, die sie ersetzen sollen, nicht so stark unterscheiden, dass ihr normaler Verzehr Ernährungsmängel für den Verbraucher oder die Tiere mit sich brächte
- **Durchführungsverordnung (EU) Nr. 503/2013 über Anträge auf Zulassung genetisch veränderter Lebens- und Futtermittel**
 - konkrete und detaillierte Anforderungen

Zulassungsverfahren und Sicherheitsbewertung genetisch veränderter Lebens- und Futtermittel*



* Art. 5, 6, 7 VO (EG) Nr. 1829/2003

Risikobewertung von GVO

➤ **Einzelfallbetrachtung**

- **“single transformation event”**

z.B. Mais MON810 - Insektenschutz

Mais NK603 - Herbizid-tolerant

- **“stacked transformation event”**

durch konventionelle Kreuzung von “single events”

z.B. Mais MON810 x NK603 – Insektenschutz + Herbizid-tolerant

z.B. Mais 3272 x Bt11 x MIR604 x 1507 x 5307 x GA21

- Insektenschutz + Herbizid-tolerant + hitzestabile α -Amylase

„**sub-combinations**“ mit abgedeckt

z.B. Mais 3272 x MIR604 x 5307“

Risikobewertung - Vergleichende Bewertung

Konzept der substantziellen Äquivalenz (OECD, 1993)

- **1. Vergleich der gv Pflanze** und der daraus gewonnenen Lebens- und Futtermittel mit einem geeigneten nicht-modifizierten Vergleichspartner („*conventional counterpart*“ oder „*comparator*“)
 - traditionelle Nutzpflanze mit einer **history of safe use**
 - isogene Ausgangslinie bzw. nah-isogene Linie

 - **2. Bewertung aller identifizierten Unterschiede**
i.e. beabsichtigte und unbeabsichtigte Effekte hinsichtlich möglicher
 - Risiken für die Gesundheit, i.e. Toxizität und Allergenität
 - Auswirkungen auf die Ernährung
- [wenn **kein geeigneter Vergleichspartner** identifiziert
→ ist keine vergleichende Bewertung möglich
→ Bewertung wie bei *Novel Foods*]

Beabsichtigte Effekte

Herbizid-Toleranz

- Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (PAT) aus *Streptomyces*
→ **Glufosinat**-Toleranz
- 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase aus *Agrobacterium* CP4 (CP4 EPSPS) oder Mais (mEPSPS)
Glyphosat-Acetyltransferase (GAT) aus *Bacillus licheniformis*
→ **Glyphosat**-Toleranz
- Acetolactat-Synthase (ALS bzw. HRA) aus der Sojabohne (*Glycine max.*)
→ Toleranz gegenüber **ALS-Inhibitoren**
- Acetohydroxysäure-Synthase, große Untereinheit (AHASL) aus *Arabidopsis thaliana*
→ Toleranz gegenüber **Imidazolinon**-Herbiziden
- Dicamba-Monooxygenase (DMO) aus *Stenotrophomonas maltophilia*
→ **Dicamba**-Toleranz
- Aryloxyalkanoat-Dioxygenase (AAD) aus *Sphingobium herbicidovorans* (AAD-1) oder *Delftia acidovorans* (AAD-12)
→ Toleranz gegenüber **2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (2,4-D)**

Beabsichtigte Effekte

Schutz vor Schadinsekten

- Toxine aus *Bacillus thuringiensis*
z.B. die Proteine Cry1Ab, Cry1F, Cry3Bb1, Cry34Ab1, Cry35Ab1, Vip3Aa20

Veränderter Nährstoffgehalt

- RNA-Interferenz → „silencing“ des Gens für Omega-6-Desaturase (*fad2-1*)
→ höherer Ölsäuregehalt in Sojabohnen

Männliche Sterilität zur Erleichterung der Züchtung von Hohertragsorten (Hybridsorten)

Selektionsmarker

- Phosphinothricin-N-Acetyltransferase (PAT) aus *Streptomyces*
- Phosphomannose-Isomerase (PMI) aus *Escherichia coli*
- β -Glucuronidase (GUS) aus *E. coli*
- Proteine, die Antibiotika-Resistenz vermitteln (heute nicht mehr verwendet)
 - *nptII* (*aph(3')*-IIa) → Kanamycin/Neomycin Resistenz
 - *aadA* (*ant(3'')*-Ia) → Streptomycin/Spectinomycin Resistenz



Unbeabsichtigte Effekte

- herbeigeführt durch **Veränderungen auf der Gen-Ebene** und **Beeinflussung des normalen Stoffwechsels**, z.B.
 - Unterbrechung kodierender Gensequenzen
 - Bildung neuer offener Leseraster (ORFs) und neuer Proteine
 - Änderung der Gen-Expression
- in einigen Fällen vorhersehbar / erklärbar
- kommen auch in konventionell gezüchteten Pflanzen vor:
Mutationszüchtung

- **Identifizierung** durch
 - **molekulare Charakterisierung** der genetischen Veränderung(en)
 - **vergleichende Analysen** des Verhaltens der gv Pflanze beim Anbau, i.e. **phänotypische und agronomische Eigenschaften**, sowie der **Zusammensetzung** in Relation zum nicht-modifizierten Vergleichspartner
 - [*Profiling*-Methoden, z.B. *Proteomics*, *Metabolomics*, sind für die Anwendung in der Risikobewertung noch nicht validiert]

Prüfung der Lebensmittelsicherheit transgener Pflanzen

Das Prinzip der wesentlichen Gleichwertigkeit*

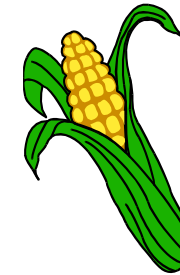
- ist Ausgangspunkt für die Sicherheitsbewertung,
- erfordert den Vergleich mit der Ausgangspflanze oder einem vergleichbaren konventionellen und erfahrungsgemäß sicheren Lebensmittel,
- beruht auf der Feststellung von Unterschieden und deren Untersuchung im Hinblick auf mögliche Risiken für die Gesundheit.

* OECD (1993) Safety Evaluation of Foods Derived from Modern Biotechnology. Concepts and Principles

Molekulare Charakterisierung

➤ **Spender/Empfänger des genetischen Materials**

- früherer Verzehr
- Anlass zu Bedenken?
z.B. Toxine, Allergene



➤ **DNA für die Transformation**

- Sequenz und Funktion aller genetischen Elemente, die inseriert werden sollen (kodierend und nicht kodierend)

➤ **Methode der Transformation**



➤ **Informationen zur gv Pflanze**

- Größe und Kopienzahl aller Inserts; Organisation und Sequenz jedes Inserts; bei Deletionen: Größe und Funktion deletierter Regionen
- Sequenz-Analyse der flankierenden genomischen DNA
bioinformatische Analysen → Unterbrechung endogener Gene?
- Identifizierung neuer offener Leseraster (ORFs)
bioinformatische Analysen → Ähnlichkeit mit Toxinen oder Allergenen?
- Expression der eingebrachten Gene
i.d.R. Synthese der kodierten Proteine; RNAs
- Stabilität der genetischen Modifikation

Vergleichende Analyse

Test of Difference:

Unterschiede zwischen dem nicht-GMO comparator und dem GMO identifizieren (hazards identification)

Test of Equivalence:

Äquivalenz des GMO in Relation zu nicht-GM Referenz Linien (*'natural variation'*)

⇒ **Signifikante Unterschiede initiieren weitere Analysen**



Vergleichende Analysen

➤ **Anbau** an min. 8 repräsentativen Standorten

- gv Pflanze
- nicht-modifizierter Vergleichspartner
- weitere konventionelle Linien (Referenzlinien)
- bei Herbizid-Toleranz: gv Pflanze +/- Herbizid



➤ **Analyse der phänotypischen und agronomischen Eigenschaften**

➤ **Analyse der Zusammensetzung**

Parameter *case-by-case*: OECD Consensus Documents (*Environmental Health and Safety Publications, Series on the Safety of Novel Foods and Feeds*)

- **Nährstoffe**, i.e. Kohlenhydrate (Zucker, Stärke, Fasermaterial), Fett, Fettsäuren, Protein, Aminosäuren, Vitamine, Mineralstoffe
- sekundäre Pflanzenstoffe, insbesondere **anti-nutritive Stoffe** und **Toxine**, z.B. Lektine, Trypsin-Inhibitoren, Phytinsäure, Glykoalkaloide, Isoflavone
- **Allergene**

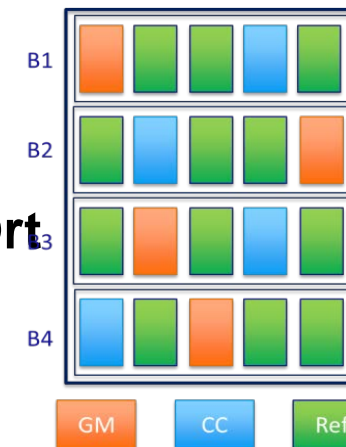
Experimentelles Design der Feldstudien

**8 verschiedene Orte, 1 GM Pflanze, 1 nicht-GM
comparator,
6 Referenzlinien (3 per Ort)**

randomized oder randomized Block Design



An jedem Ort



**4 Wiederholungen (B1-B4)
5 plots pro Wiederholung**

**Jeder plot enthält: GMO (GM),
comparator (CC) oder
Referenzlinie (Ref)**

Daten der Feldstudien

Endpoint	CHT	IHT	GxE
Early stand count (#/m ²) (before thinning)	Not different Category I Type 1	Not different Category I Type 1	Not done

Zwei Sets von Endpunkten

Agronomische und Phenotypische Endpkt.

10-20 Endpunkte

Seed (lab): seed purity, seed germination and health...

Seedling (field): initial stand count, emerged plants...

Reproductive phase (field): plant height, yield, seed weight...

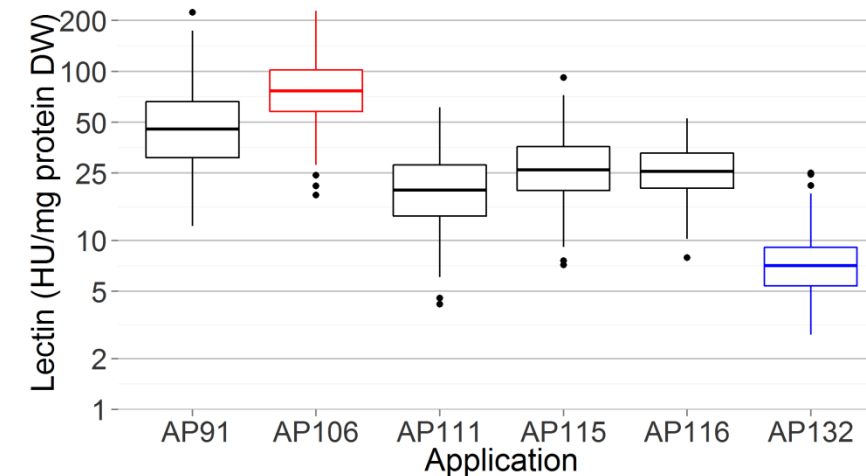
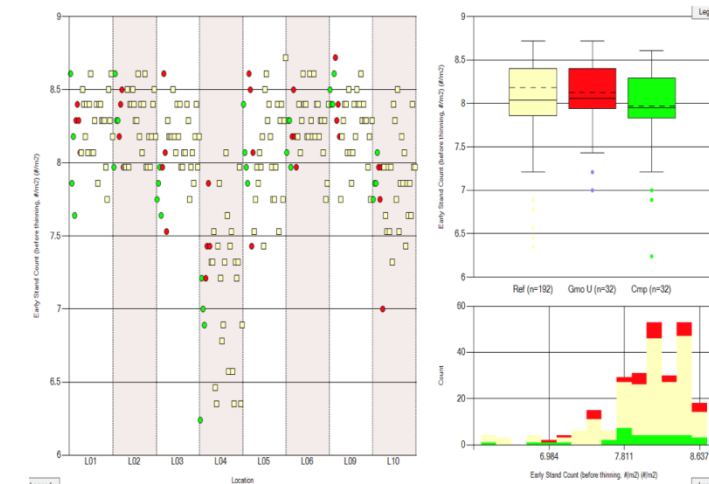
Spezifisch für die Umweltverträglichkeitsprüfung

Zusammensetzung

60-90 Endpunkte (OECD Liste) von Erntegut und Grünfutter

- Proximates
- Amino acids
- Fatty acids
- Vitamins
- Anti-nutritional compounds
-

Für Lebens- und Futtermittelsicherheit



Neue Proteine - Toxizität

- **Herkunft** des kodierenden Gens und **früherer Verzehr** des Proteins
- biochemische und funktionelle **Charakterisierung**
- **Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz mit der von bekannten toxischen Proteinen**

in silico bioinformatische Analysen

- **Stabilität** bei der Verarbeitung
Einfluss von Temperatur und pH-Wert

in vitro

- *case by case* – wenn Zweifel an der Sicherheit:
Studie zur subakuten (28 Tage) oralen Toxizität
an Labornagern zur *Hazard Identification*
OECD TG 407

höhere Tierzahl/Gruppe empfohlen:
10 (statt 5) pro Geschlecht und Gruppe

in vivo



Neue Proteine - Allergenität

- **Herkunft** des kodierenden Gens
- **Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz mit der von bekannten Allergenen ?**
 - bioinformatische Analysen
 - Kriterium für mögliche Kreuzreaktivität: 35 % Identität über eine lineare Abfolge von mindestens 80 Aminosäuren
- **IgE Bindungstests** (ELISA, EAST, RAST, Immunblot) mit von Seren von Personen mit dokumentierter Allergie
 - wenn Sequenz-Ähnlichkeit besteht
 - wenn das Gen/Protein aus einer allergenen Quelle stammt
 - wenn andere Hinweise auf mögliche Allergenität, z.B. das Protein einer Allergen-Familie angehört
- **weitere Tests:**
 - Resistenz gegenüber Verdauungsenzymen (z.B. Pepsin-haltige simulierte Magenflüssigkeit)
 - [Targeted Serum-Screening]
 - [Tiermodelle]
- **Schlussfolgerung – weight-of-evidence**

Bewertung des ganzen Lebensmittels - Allergenität

ist die nicht-modifizierte Ausgangspflanze bzw. das daraus gewonnene Lebensmittel als allergieauslösend bekannt, z.B. Sojabohnen



- **Analyse des endogenen Allergenmusters**
Bestimmung der spezifischen IgE-Bindung unter Verwendung von Seren von Allergikern
 - ELISA
 - Immunblot nach 2D-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ernährungsphysiologische Bewertung

- **Zusammensetzung** des Lebens-/Futtermittels
 - Gehalte an Makro- und Mikronährstoffen
- **Bioverfügbarkeit** der Nährstoffe
 - anti-nutritive Substanzen
- **Einfluss auf die Ernährung ?**
 - Ersatz eines traditionellen Lebens-/Futtermittels ?
 - voraussichtlicher Verzehr
 - evtl. *Post Launch Monitoring* nach der Zulassung

Testung des Lebens-/Futtermittels an Tieren

EFSA: im Einzelfall, nur wenn

- Zusammensetzung der Pflanze stark verändert
- Hinweise auf unbeabsichtigte Effekte
- kein geeigneter nicht-modifizierter Vergleichspartner für eine vergleichende Sicherheitsbewertung existiert
- für „stacked events“ bei Hinweisen auf Wechselwirkungen zwischen den Ausgangslinien

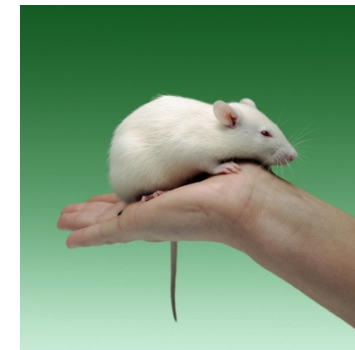
➤ **subchronische (90 Tage) Toxizitätsstudie an Labornagern**

OECD TG 408 für Chemikalien-Testung

Vermeidung von Nährstoff-Imbalanz !

Guidance on repeated-dose 90-day oral toxicity study in rodents with whole food/feed (EFSA, 2011)

Explanatory statement (EFSA, 2014)



➤ ggf. weiterführende Studien mit klar formulierter Fragestellung

Testung des Lebens-/Futtermittels an Tieren

Fütterungsstudien mit Nutztieren

- können zusätzliche Informationen zu unbeabsichtigten Effekten in dem Lebens-/Futtermittel liefern
z.B. Studie an schnell wachsenden Masthühnern
- **im Einzelfall** und mit klarer Zielsetzung
z.B. Untersuchung der Bioverfügbarkeit spezifischer Nährstoffe in gv Futtermitteln



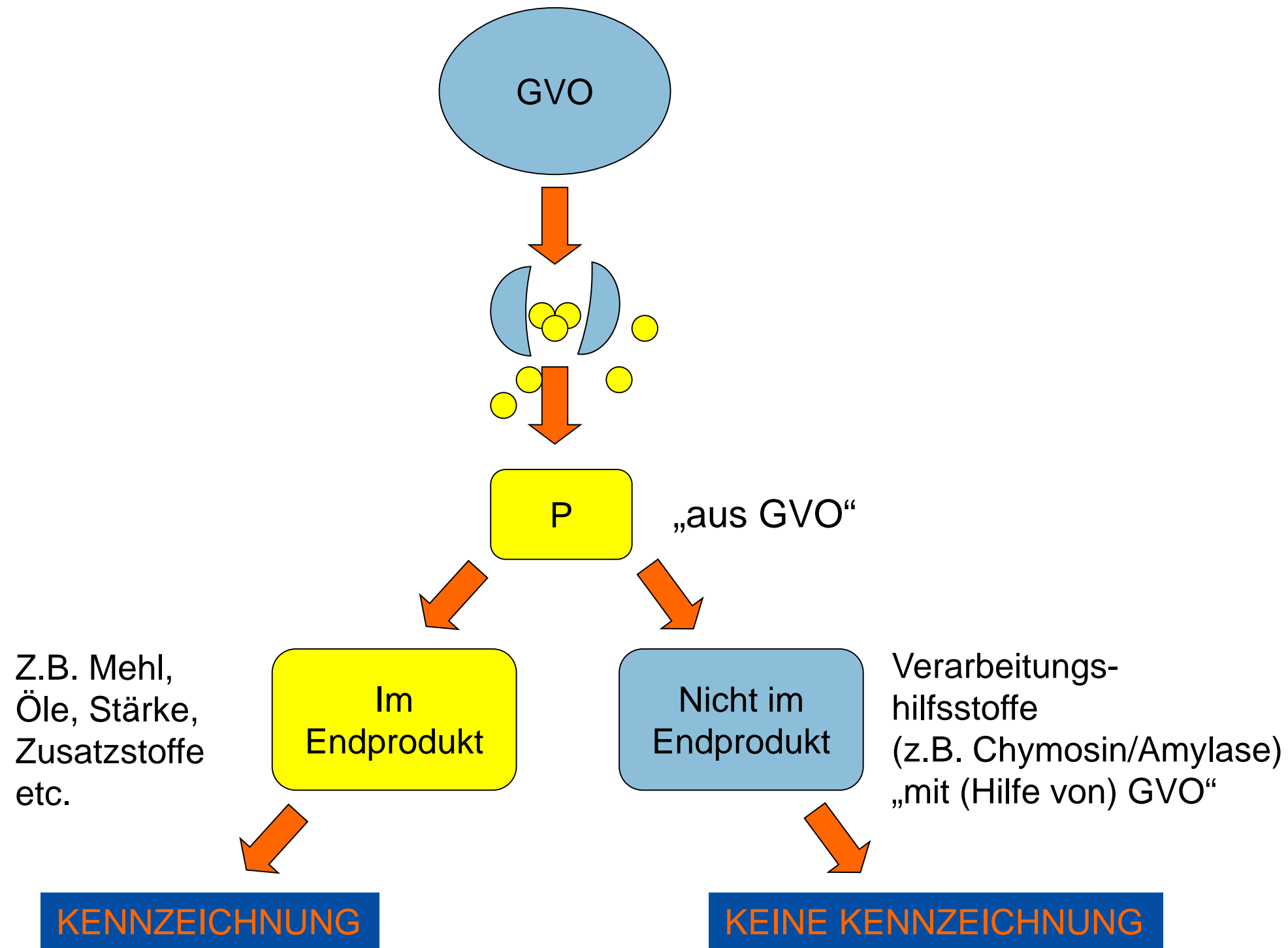
Zusammenfassung

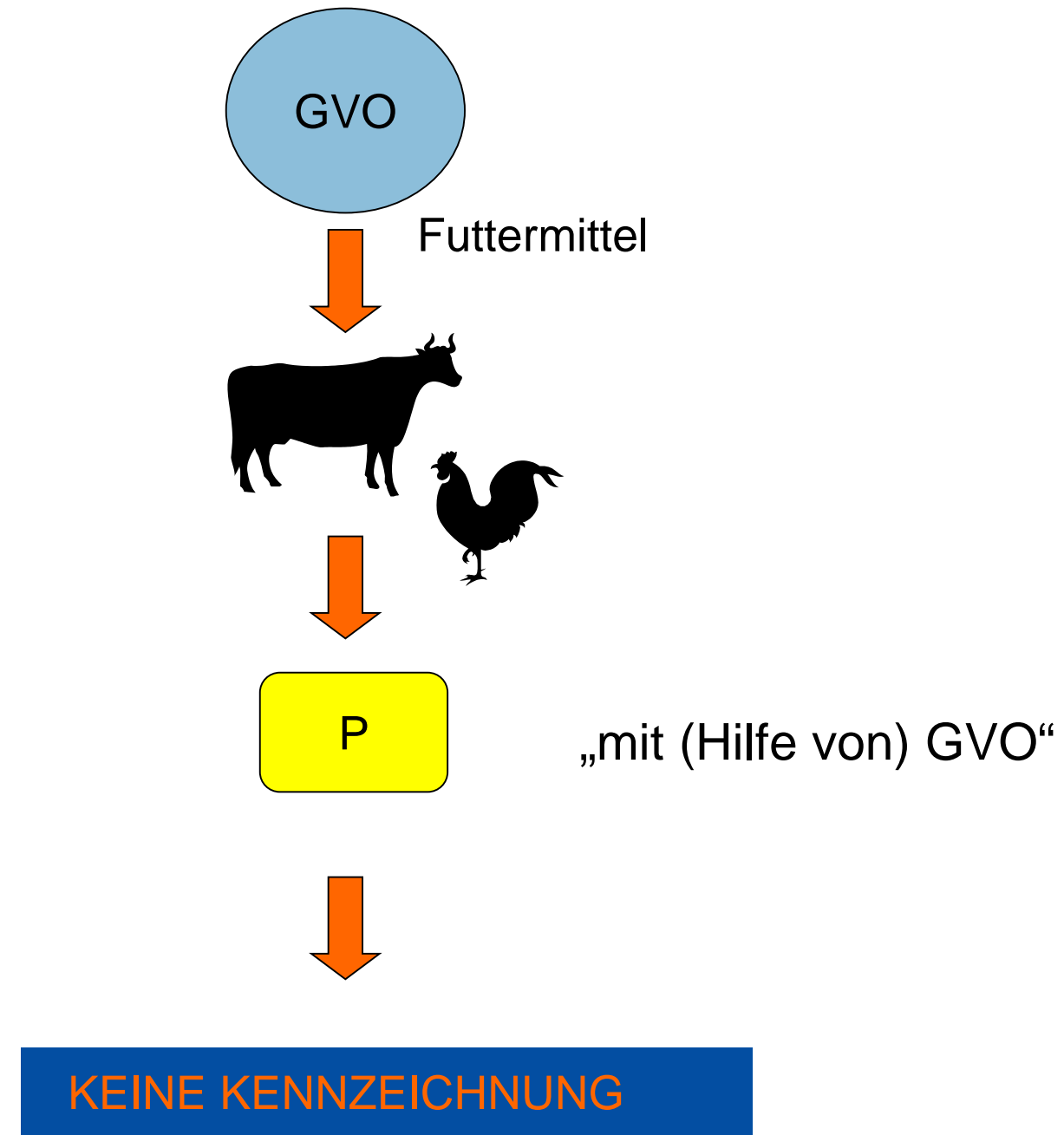
- In der EU müssen Lebens- und Futtermittel aus gv Pflanzen vor der Zulassung einer Sicherheitsbewertung unterzogen werden;
- Die vergleichende Sicherheitsbewertung erfolgt in einem zweistufigen Verfahren basierend auf dem Konzept der substanzialen Äquivalenz;
- Alle identifizierten Unterschiede (beabsichtigte und unbeabsichtigte Effekte), d.h. neue Proteine, andere neue Inhaltsstoffe und Änderungen der Gehalte natürlicher Inhaltsstoffe, sind zu bewerten;
- Für diese Bewertung sind molekulare, chemisch-analytische, toxikologische und ernährungsphysiologische Informationen, die durch *in vitro*, *in silico* und *in vivo* Studien gewonnen werden, erforderlich.

Schlussfolgerung im Einzelfall:

Die aus der gv Pflanze (Linie /Sorte X) gewonnenen Lebens- und Futtermittel sind **ebenso sicher** wie die entsprechenden Erzeugnisse aus traditionell gezüchteten Pflanzen.

Nachweis von GVOs





Danke für Ihre Aufmerksamkeit

Bundesinstitut für Risikobewertung

Max-Dohrn-Straße 8-10 • 10589 Berlin

Telefon 030 - 184 12 - 0 • Fax 030 - 184 12 – 99 0 99

bfr@bfr.bund.de • www.bfr.bund.de