



Stellungnahme der ZKBS zum Antrag EFSA/GMO/UK/2005/19 der Firma Syngenta auf Genehmigung des Inverkehrbringens von gentechnisch verändertem Mais „GA21“ als gentechnisch verändertes Lebensmittel und Futtermittel nach der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003

1 Gegenstand des Antrags und Zweck des Inverkehrbringens

Der Antrag EFSA/GMO/UK/2005/19 (BVL-Az. 6787-01-0019) wurde im Jahr 2005 von Syngenta Seeds S.A.S. im Auftrag der Syngenta Crop Protection AG bei der zuständigen Behörde Großbritanniens eingereicht und von dieser am 08. August 2005 an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) weitergeleitet.

Gegenstand des Antrages ist das Inverkehrbringen von gentechnisch verändertem Mais (*Zea mays* L.) der Linie GA21, die eine Toleranz gegenüber glyphosathaltigen Herbiziden aufweist.

Wie im Folgenden aufgeführt umfasst der Antrag alle Verwendungszwecke für Lebens- und Futtermittel:

Gentechnisch veränderte Pflanzen (GVP) als Lebens- und Futtermittel

Lebens- und Futtermittel, die aus den GVP bestehen oder diese enthalten

Lebens- und Futtermittel, die aus den GVP hergestellt werden oder deren Bestandteile enthalten

Import und Verarbeitung entsprechend Part C der Richtlinie 2001/18/EG

Ein Anbau in der EU wurde hingegen nicht beantragt.

Darüber hinaus hat die Firma Syngenta am 29. Juni 2007 einen Antrag (EFSA/GMO/RX/GA21) auf Erneuerung der Zulassung für die Verwendung von Mais GA21 als Lebensmittelzusatzstoff und Futtermittel nach der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 bei der EFSA eingereicht. Da alle Daten, die für die Risikobewertung des Antrags EFSA/GMO/RX/GA21 vonnöten sind, bereits in den Unterlagen zu Antrag EFSA/GMO/UK/2005/19 enthalten sind, bezieht sich die vorliegende Stellungnahme der ZKBS, die alle vorgesehenen Verwendungen des gentechnisch veränderten Mais GA21 einschließt, auf beide Anträge, die von der Firma Syngenta gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1829/2003 gestellt wurden.

Für den gentechnisch veränderten Mais GA21 sind bereits von der Firma Monsanto zwei Anträge auf das Inverkehrbringen gemäß der Richtlinie 90/220/EG (C/ES/98/01 für Anbau [BVL-Az. 6788-02-31] und C/GB/97/M3/2 für Import [BVL-Az. 6788-02-32]) gestellt worden, zu denen die ZKBS am 07. September 1999 (C/ES/98/01) bzw. am 07. Februar 2000 (C/GB/97/M3/2) jeweils eine befürwortende Stellungnahme abgegeben hat. Beide Anträge wurden allerdings inzwischen von der Firma Monsanto zurückgezogen.

Für einen weiteren Antrag der Firma Monsanto auf Inverkehrbringen von aus der gentechnisch veränderten Maislinie GA21 erzeugten Lebensmitteln und Lebensmittelzutaten als neuartige Lebensmittel oder neuartige Lebensmittelzutaten gemäß der Verordnung (EG)



258/97 (BVL-Az. 6789-02-02-4) hat die ZKBS bereits am 04. April 2000 eine befürwortende Stellungnahme verabschiedet. Für diesen Antrag liegt inzwischen eine positive Entscheidung der Europäischen Kommission vor (Zulassungsbeschluss 2006/69/EG vom 13. Januar 2006), nach der aus GA21-Mais hergestellte Lebensmittel und Lebensmittelzutaten bis zum 12. Januar 2016 genehmigt sind.

2 Beschreibung des gentechnisch veränderten Organismus

In eine Zellkultur einer Maisinzuchtlinie wurde mit Hilfe des Partikelbeschuss-Transformationssystem ein isoliertes *NotI*-Restriktionsfragment des Plasmides pDPG434 eingeführt. Das für die Transformation verwendete *NotI*-Fragment besitzt eine Größe von 3,49 kb und beinhaltet die folgende Expressionskassette:

Eine *in vitro* modifizierte Variante (*mepsps*) des endogenen *epsps*-Gens aus Mais kodierend für eine Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat-Synthase (EPSPS). Die Modifikation des Gens bewirkt den Austausch von zwei der 445 Aminosäuren der EPSPS (Position 102: T @ I und Position 106: P @ S) und resultiert in einer um den Faktor 60.000 reduzierten Sensitivität des Enzyms gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat. Das *mepsps*-Gen steht unter der Kontrolle des Promotors, des ersten nicht-kodierenden Exons und Introns des Aktin-Gens aus Reis (*Oryza sativa*) (McElroy *et al.*, 1990) sowie des Terminationssignals des Nopalinsynthase-Gens (*nos*) aus *Agrobacterium tumefaciens* (Bevan, 1984). Das *mepsps*-Gen wurde zudem 5'-terminal mit einer optimierten Chloroplasten-Transitpeptid-Sequenz versehen, die von den Chloroplasten-Transitpeptid-Sequenzen der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase aus Mais (*Zea mays*) und Sonnenblume (*Helianthus annuus*) abgeleitet wurde (Lebrun *et al.*, 1996). Die Fusion mit dem optimierten Transitpeptid hat ein zusätzliches N-terminales Methionin bei der modifizierten EPSPS (mEPSPS) zur Folge.

Als pUC19-Derivat enthält das Rückgrat von Plasmid pDPG434 den ColE1-Replikationsursprung zur Replikation in *E. coli* (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), *lac*-Sequenzen (partielle kodierende Sequenzen unter der Kontrolle des Promotors *P_{lac}*) (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) und das bakterielle Ampicillin-Resistenzgen *bla* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors (Sutcliffe, 1978). Vor der Transformation wurde das Plasmid pDPG434 mittels der Restriktionsendonuklease *NotI* gespalten, um das Vektor-Rückgrat vom Zielfragment (*mepsps*-Expressionskassette) zu trennen. Aus den in Antrag EFSA/GMO/UK/2005/19 beschriebenen Southern Blot Analysen und den Angaben der Antragstellerin ist zu schließen, dass nur das *NotI*-Fragment, das die Expressionskassette mit dem modifizierten *epsps*-Gen enthält, nicht aber Sequenzen des Vektor-Rückgrates stabil in das Genom der Transformante GA21 integriert wurde.

Das *NotI*-Fragment wurde an einem Locus mehrfach (sechs zusammenhängende komplette oder verkürzte Versionen: Fragmente 1-6) in das Genom der Maislinie GA21 integriert. Der integrierte DNA-Abschnitt besteht nach Untersuchungen der Antragstellerin, beginnend am 5'-Terminus, aus folgenden Teilen:

- Fragment 1:

Dieses Fragment beinhaltet eine aufgrund unvollständiger Übertragung verkürzte *mepsps*-Kassette, die aus dem verkürzten Reis-Aktin-Promotor, der an seinem 5'-Ende eine Deletion von 696 bp aufweist, dem ersten Exon und Intron des Aktin-Gens, der optimierten Transitpeptid-Sequenz, der *mepsps*-Kodierregion und dem *nos*-Terminator besteht.



Die Antragstellerin geht davon aus, dass die *mepsps*-Sequenz dieser verkürzten Kasette in den Maispflanzen exprimiert wird, da bereits früher gezeigt wurde, dass ein verkürzter Aktin-Promotor mit dem Aktin-Intron funktionsfähig ist (McElroy *et al.*, 1990 und 1991). Die Expression ausgehend von dem verkürzten Promotor würde zum gleichen Produkt führen wie die Expression ausgehend von dem vollständigen *NotI*-Fragment (siehe II).

- Fragment 2, 3 und 4:

Die Fragmente 2, 3 und 4 stellen drei vollständige Kopien des 3,49 kb-*NotI*-Restriktionsfragmentes mit der *mepsps*-Expressionskasette dar.

Eine mRNA der erwarteten Länge (ca. 1,8 kb) und ein Protein mit dem erwarteten Molekulargewicht (ca. 47,4 kDa) wurden in Proben aus Blattextrakten von GA21-Mais mittels Northern bzw. Western Blot Analyse nachgewiesen.

- Fragment 5:

Dieses Fragment besteht aus einer aufgrund unvollständiger Übertragung verkürzten *mepsps*-Kasette, die den vollständigen Reis-Aktin-Promotor, das erste Exon und Intron des Aktin-Gens, die optimierte Transitpeptid-Sequenz und 288 bp des *mepsps*-Gens, die mit einem Stopp-Codon enden, umfasst.

Northern und Western Blot Analysen weisen darauf hin, dass das verkürzte *mepsps*-Gen, das auf Fragment 5 lokalisiert ist, nicht exprimiert wird, da weder ein hypothetisches Transkript von ~ 0,7 kb noch ein immunreaktives EPSPS-Fragment im Bereich von 10 kDa oder kleiner detektiert werden konnte.

- Fragment 6:

Hierbei handelt es sich um ein verkürztes *NotI*-Fragment, das lediglich aus dem Reis-Aktin-Promotor und einem verkürzten ersten Aktin-Exon besteht. Das 3'-Ende des integrierten DNA-Abschnitts nebst der sich anschließenden genomischen Mais-DNA wurde von der Antragstellerin kloniert. Eine Sequenzanalyse ergab zwei vollständig aus Mais-DNA bestehende offene Leserahmen (ORF = "open reading frame"), die sich an den auf Fragment 6 befindlichen Aktin-Promotor anschließen und für putative Proteine einer Länge von 98 bzw. 108 Aminosäuren kodieren könnten. In Northern Blots mit Poly(A+) RNA, die mit einem an den Aktin-Promotor angrenzenden Mais-DNA-Fragment hybridisiert wurden, zeigten sich bei GA21-Mais im Vergleich zu nicht gentechnisch verändertem Mais keine spezifischen Hybridisierungssignale. Die Antragstellerin schließt daraus, dass der Aktin-Promotor in Abwesenheit des Introns inaktiv ist oder dass gebildete Transkripte schnell wieder abgebaut werden. Mittels Sequenzanalyse wurde zudem im *nos*-Terminator der Fragmente 1 und 2 ein einzelner Basenpaaraustausch detektiert (Nukleotid C anstelle eines G wie in Fragment 3 und 4). Des Weiteren fand sich eine einzelne Basenpaardeletion im Aktin-Promotor des Fragmentes 6. Die beobachteten Mutationen sind allerdings bedeutungslos, da sie keinen Einfluss auf die Aminosäuresequenz des neu exprimierten Proteins haben.

Die flankierenden Regionen des Inserts (~ 4,2 kb der 5'- und ~ 1 kb der 3'-flankierenden Sequenz) wurden ermittelt und untersucht. Die Sequenz der Region, die das Insert 5'-terminal flankiert, erwies sich als homolog zu Sequenzen der Chloroplasten-DNA aus Mais. Die Integration von Organellen-DNA ins pflanzliche Kerngenom, die entweder bereits vor der Transformation bestand oder durch diese erworben wurde, ist ein bekanntes Phänomen. Eine BLAST-Analyse der 3'-flankierenden Sequenz zeigte Homologien zu repetitiven



Maisgenomsequenzen und ergab keine Hinweise darauf, dass die eingebrachte DNA in ein funktionelles Maisgen inseriert ist.

Um mögliche ORFs, die infolge der Integration des Inserts in Mais GA21 entstanden sein könnten, zu untersuchen, wurde eine Bioinformatik-basierte Analyse durchgeführt. Ein Aminosäuresequenzvergleich der möglichen Expressionsprodukte von vier im Bereich der flankierenden Regionen identifizierten ORFs (zwei ORFs der 5'-Region und zwei ORFs der 3'-Region [siehe auch IV]) ergab weder Sequenzhomologien zu bekannten Toxinen noch zu bekannten Allergenen. Dasselbe gilt für einen putativen ORF von 378 bp, der innerhalb der genomischen Mais-DNA, die das Insert 3'-terminal flankiert, beginnt und im Insert endet. Auch ein innerhalb des Inserts identifizierter ORF am Übergang zwischen Fragment 5 und 6 zeigte keine Homologien zu bekannten Toxinen und Allergenen.

Um die Expression des eingeführten Inserts zu untersuchen, wurden die durchschnittlichen mEPSPS-Konzentrationen mittels ELISA über vier Wachstumsphasen (Wirtel, Anthese, Körnerreife und Seneszenz) in Blättern, Wurzeln und Gesamtpflanzen von Mais GA21 bestimmt. Die gemessenen Konzentration lagen zwischen ca. $< 0,2 \mu\text{g/g}$ FG (Frischgewicht) und $15 \mu\text{g/g}$ FG (zwischen $< 0,3$ und $70 \mu\text{g/g}$ TG [Trockengewicht]). Die durchschnittlichen mEPSPS-Gehalte, die in den Maiskörnern in der Phase der Körnerreife und der Seneszenz gemessen wurden, reichten von ca. 4 bis $7 \mu\text{g/g}$ FG (5 bis $10 \mu\text{g/g}$ TG). Das endogene Mais-EPSPS-Protein wird in einer signifikant niedrigeren Konzentration als das gentechnisch veränderte mEPSPS-Protein in Mais GA21 exprimiert. Diesbezüglich wurde mittels ELISA bestimmt, dass das mEPSPS etwa 96 % des Gesamt-EPSPS-Proteins in Blättern von GA21-Mais ausmacht.

Die Expression des eingebrachten *mepsps*-Gens verleiht den gentechnisch veränderten Pflanzen eine Toleranz gegenüber dem herbiziden Wirkstoff Glyphosat. Die Vererbung der Herbizidtoleranz folgt einem monogenen Erbgang.

3 Erfahrungen aus vorausgegangenen Freilanduntersuchungen

Der Antrag bezieht sich auf zahlreiche Feldversuche, die über mehrere Vegetationsperioden und an verschiedenen Standorten durchgeführt wurden.

In den USA wurden Feldversuche an fünf Standorten im Jahr 1996, an weiteren sieben Standorten im Jahr 1997 sowie an sechs Standorten in den Jahren 2004 und 2005 durchgeführt. Darüber hinaus wurden 1997 Freilanduntersuchungen an vier Standorten in Italien und Spanien durchgeführt. Diese Versuche, in denen die gentechnisch veränderten Pflanzen hinsichtlich ihres Phänotyps mit geeigneten nicht gentechnisch veränderten Kontrollpflanzen verglichen wurden, dienten vor allem als Basis für die vergleichende Inhaltsstoffanalyse (siehe 5.2.). Es ergaben sich keine Hinweise auf stoffwechselbedingte, phänotypische Veränderungen der Pflanzen, was durch die bereits erwähnte Analyse zahlreicher Inhaltsstoffe der gentechnisch veränderten Pflanzen bestätigt wurde. Eine unbeabsichtigte Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels durch die gentechnische Veränderung im Sinne eines so genannten Positionseffektes oder durch pleiotrope Effekte konnte anhand der untersuchten Parameter in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht nachgewiesen werden.

In weiteren Feldversuchen, die an verschiedenen Standorten in den USA (1999 und 2004) und in Brasilien (2003) durchgeführt wurden, wurden zudem Daten hinsichtlich der agronomischen Parameter und der Anfälligkeit von GA21-Mais für pflanzliche Pathogeninfektionen (z. B. Pilzinfektionen) gesammelt. Des Weiteren wurde die Wirksamkeit und die Selektivität der Herbizidbehandlungen untersucht. Es gab keine Hinweise auf



Veränderungen der morphologischen und phänotypischen Merkmale sowie der Ausbreitung und Auswirkung auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt. Es ergaben sich keine Unterschiede bezüglich verschiedener agronomischer Merkmale (z. B. Pflanzenentwicklung, Blütezeitpunkt, Morphologie, Ertrag, Überdauerung, Anfälligkeit gegenüber Pflanzenkrankheiten) zwischen den gentechnisch veränderten und den Kontrollpflanzen. Dementsprechend liegen keine Hinweise für eine Veränderung hinsichtlich der Überlebens-, Vermehrungs- und Ausbreitungsfähigkeit vor.

Weitere Freisetzungsversuche der Firma Syngenta liefen bzw. laufen seit 2006 in Brasilien, Spanien, Tschechien, Frankreich und Rumänien.

4 Erteilte Genehmigungen zum Inverkehrbringen außerhalb der EU

In den USA, Kanada, Argentinien und Japan wird GA21-Mais bereits kommerziell angebaut und hat von den zuständigen Behörden die uneingeschränkte Zulassung für die Anwendung in Lebens- und Futtermitteln erhalten.

5 Bewertung der Verwendung als Lebens- und Futtermittel

Eine Risikoabschätzung in Bezug auf eine Verwendung von GA21-Mais als Lebens- und Futtermittel erfordert diesbezügliche Bewertungen hinsichtlich des neu gebildeten Proteins (mEPSPS), einer möglichen Veränderung der Inhaltsstoffe bzw. des Phänotyps, der gentechnisch veränderten Pflanze in ihrer Gesamtheit sowie eines möglichen horizontalen Gentransfers auf Mikroorganismen des Magen-Darm-Traktes.

5.1 Bewertung des neu gebildeten Proteins (mEPSPS)

Die Expression des in den gentechnisch veränderten Maispflanzen enthaltenen Gens für eine Glyphosat-tolerante EPSPS aus Mais findet konstitutiv unter der Kontrolle des Reis-Aktin-Promotors (McElroy *et al.*, 1990) und der *nos*-Terminatorsequenz aus *Agrobacterium tumefaciens* statt. Die Anwesenheit des ersten nicht-kodierenden Exons und Introns des Aktin-Gens aus Reis in der Transkriptionseinheit zielt auf eine Steigerung der Genexpression, die vermutlich auf den Vorgang der RNA-Prozessierung zurückzuführen ist (Luehrsen & Walbot, 1991). Die Vorschaltung des optimierten Transitpeptids bewirkt den post-translationalen Import des mEPSPS-Proteins in die Chloroplasten. Das Transitpeptid wird in der Regel beim Import abgespalten (Prozessierung).

Die Modifikation des *epsps*-Gens bewirkt den Austausch von zwei der 445 Aminosäuren der EPSPS (Position 102: T → I und Position 106: P → S). Das modifizierte Enzym weist eine Aminosäuresequenzhomologie von > 99,3 % zu der endogenen EPSPS aus Mais auf. Die Aminosäuresequenzhomologien zu EPSPS aus einigen anderen Kulturpflanzenarten (Sojabohnen, Tomaten, Raps) liegen bei 82 bis 83 %.

Das endogene EPSPS-Protein, wie auch das infolge der gentechnischen Veränderung in den Maispflanzen exprimierte mEPSPS-Protein, katalysiert im Chloroplasten die Reaktion des Shikimat-3-Phosphat mit Phosphoenolpyruvat zum 5-Enolpyruvylshikimat-3-Phosphat, einer Zwischenstufe für die Biosynthese aromatischer Aminosäuren und anderer aromatischer Substanzen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels. Das im gentechnisch veränderten Mais zusätzlich exprimierte mEPSPS-Protein katalysiert die gleiche Reaktion wie entsprechende Enzyme, die natürlicherweise in Mais und anderen Kulturpflanzen vorkommen. Da das EPSPS-Protein an der Biosynthese der aromatischen Aminosäuren



beteiligt ist, wurden deren relative Konzentrationen von der Antragstellerin untersucht. Dabei wurden in Maiskörnern keine signifikanten Veränderungen gemessen. Im Gegensatz zum endogenen EPSPS-Protein wird das modifizierte EPSPS-Protein durch Glyphosat nicht gehemmt.

Da den Chloroplasten-Transitpeptid-Sequenzen der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase aus Mais und Sonnenblume wie auch anderen derzeit bekannten Signalpeptiden, ob prozessiert oder unprozessiert, kein gesundheitsschädliches Potential zuerkannt wird, ist davon auszugehen, dass dies auch für den Komplex aus optimiertem Transitpeptid und Enzym (hier mEPSPS) zutrifft. Es gibt keine Anhaltspunkte, die eine schädliche Wirkung des neu gebildeten EPSPS-Proteins erwarten lassen.

5.1.1 Bewertung der Toxizität und Allergenität

Die Bewertung der toxischen und allergenen Eigenschaften des neuartigen Lebens- bzw. Futtermittels erfolgt maßgeblich auf der Grundlage von Untersuchungen mit dem neu gebildeten Protein (mEPSPS). Eine derartige Bewertung ist möglich, weil sich in den Untersuchungen zur Zusammensetzung von Mais GA21 keine biologisch relevanten Unterschiede zu konventionellen Maislinien hinsichtlich der Inhaltsstoffe (siehe 5.2.) sowie agronomischer und morphologischer Parameter (siehe 3.) ergeben haben.

Für die Bewertung des Proteins lag ein umfangreiches Spektrum an Untersuchungen vor (*weight of evidence approach*):

Aminosäuresequenz-Homologievergleiche mit bekannten Toxinen und Allergenen

akute Toxizitätsstudien in Nagern

in vitro Verdaubarkeitsstudien

Untersuchungen zur Thermostabilität

Ein Datenbank-basierter *in silico* Vergleich der Aminosäuresequenz der mEPSPS ergab keine Homologien zu bekannten Toxinen und Allergenen. Ähnlichkeiten wurden lediglich zu weiteren bekannten EPSPS-Enzymen und Enolpyruvyl-Transferasen ermittelt. Somit ergibt sich kein Hinweis auf ein toxisches oder allergenes Potential, das sich aus der Primärsequenz des Proteins ableitet. Auch ein Vergleich aller Möglichkeiten von acht aufeinander folgenden Aminosäuren der mEPSPS ergab keine Hinweise auf Ähnlichkeiten zu Epitopen bekannter Allergene.

Aufgrund der geringen Konzentration an neu synthetisiertem Protein in Mais GA21 erfolgte die Prüfung der akuten Toxizität - wie auch die Studien zur Verdaubarkeit und zur Thermostabilität - mit bakteriell hergestelltem Protein. In diesem Zusammenhang wurde die physiko-chemische, immunologische und funktionelle Äquivalenz der pflanzlich produzierten mEPSPS mit dem bakteriell synthetisierten Protein nachgewiesen. Die in Albinomäusen (Stamm Alpk:AP_iCD-1) geprüfte akute Toxizität ergab bei einer einmaligen oralen Verabreichung des mEPSPS-Proteins bei einer Dosierung von 2000 mg/kg Körpergewicht (KG) keine substanzbedingten Effekte auf die Mortalität, das Körpergewicht, den Futterverbrauch, bei klinischen Beobachtungen, der Pathologie, bei den Organgewichten und der Hämatologie sowie der klinischen Blutchemie. Daraus ergibt sich ein NOEL (*“no observed effect level“*) = 2000 mg/kg KG und eine LD₅₀ > 2000 mg/kg KG. Auch eine weitere akute Toxizitätsstudie mit CD-1 Albinomäusen, die der ZKBS bereits mit dem Antrag Az. 6789-02-02-4 nach der Verordnung (EG) 258/97 vorlag, zeigte bei einer einmaligen oralen Dosis von 3,7, 11,8 bzw. 45,6 mg/kg KG keine substanzbedingten Effekte. Vergleicht man



die aufgrund der niedrigen Expressionsgehalte (siehe 2.) geringe Exposition bei der menschlichen und tierischen Ernährung mit der hier maximal applizierten Dosis, ergab sich nach Ansicht der ZKBS bereits bei dieser Studie ein ausreichend großer Sicherheitsfaktor.

Die Stabilität des in GA21-Mais und des in *E. coli* erzeugten mEPSPS-Proteins gegenüber proteolytischen Enzymen wurde in simulierten Säuger-Gastrointestinalflüssigkeiten (Magensaft und Darmflüssigkeit) untersucht. Ergebnisse von SDS PAGE und Western Blot Analyse bewiesen, dass nach einer 1-minütigen Inkubationszeit in simulierter Magenflüssigkeit kein intaktes mEPSPS-Protein (ca. 47,4 kDa) detektiert werden konnte. Im Western Blot trat nach 1 min bei der aus pflanzlichem Material isolierten Probe ein immunreaktives Fragment von ca. 6 kDa auf. Diese niedrigmolekulare Bande stellt ein Abbauprodukt dar und war nach einer Inkubationszeit von 5 min nicht mehr nachweisbar. Weitere *in vitro* Untersuchungen zur Stabilität gegenüber simulierten gastrointestinalen Verdauungssäften, die der ZKBS bereits mit dem Antrag nach Verordnung (EG) 258/97 vorlagen (Az. 6789-02-02-4), zeigten, dass das mEPSPS-Protein im SGF-Test (*“simulated gastric fluid“*) bereits nach 15 sec und im SIF-Test (*“simulated intestinal fluid“*) nach 1 min nicht mehr nachweisbar war. Weiterhin ergaben sich keine Hinweise für das Auftreten von stabilen Peptidfragmenten von > 2 kDa. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich schlussfolgern, dass das mEPSPS-Protein schnell im gastrointestinalen System abgebaut wird. Die Ergebnisse dieser *in vitro* Untersuchungen geben keinen Anlass, eine toxische oder allergene Wirkung des Proteins zu erwarten.

Die Thermostabilität des mEPSPS-Proteins wurde durch Inkubation bei 25, 37, 65 und 95 °C über einen Zeitraum von 30 min untersucht, wobei bis zu einer Temperatur von 37 °C keine Effekte auf die Stabilität des Proteins beobachtet werden konnten. Hingegen war ab einer Temperatur von 65 °C keine Enzymaktivität mehr nachweisbar.

5.2 Bewertung einer möglichen Veränderung von Inhaltsstoffen

Mit Material aus Feldversuchen, die in den Jahren 2004 und 2005 an sechs Standorten in den USA durchgeführt wurden, wurden Inhaltsstoffanalysen mit gentechnisch verändertem Mais GA21 (mit und ohne Glyphosatbehandlung) im Vergleich zu einer nicht gentechnisch veränderten Maislinie mit vergleichbarem genetischen Hintergrund durchgeführt. Die untersuchten Parameter waren: Proximate (Protein, Fett, Asche, Feuchtegehalt, Gesamtkohlenhydrate [kalkuliert], Stärke), ADF (*“acid detergent fibre“*), NDF (*“neutral detergent fibre“*), 18 Aminosäuren (einschließlich der aromatischen Aminosäuren), Fettsäuren (Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure, Linolensäure), Vitamine und Provitamine (β -Karotin, B₁, B₂, B₃, B₆, E, Folsäure), Mineralstoffe (Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, K, Na, Zn, Se), Anti-Nutritiva (Phytinsäure, Raffinose, Trypsininhibitor) und Sekundärmetabolite (Ferulasäure, p-Cumarsäure, Inositol, Furfural) in den Körnern sowie Proximate, ADF, NDF, Ca und P in den Blättern.

Bei den Untersuchungen zeigten sich bei einigen Parametern statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle (β -Karotin, Calcium, Phosphor, einzelne Fettsäuren). Die genannten Parameter variieren aber auch bei konventionellen Sorten. Da die gemessenen signifikanten Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten und den Kontrollpflanzen im Rahmen dieser Bandbreite liegen, wird diesen keine biologische Relevanz beigemessen.

Auf Grundlage der Ergebnisse der vergleichenden Inhaltsstoffanalyse kann davon ausgegangen werden, dass die Zusammensetzung von Körnern und Grünfutter der Maislinie GA21 - mit Ausnahme der Anwesenheit des mEPSPS-Proteins - gleichwertig zu der



konventioneller Maislinien, die keine gentechnische Veränderung aufweisen, ist. Dies gilt sowohl für glyphosatbehandelten GA21-Mais, als auch für solchen, der nur mit konventionellen Herbiziden gespritzt wurde.

Auch für eine unbeabsichtigte Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels durch die gentechnische Veränderung im Sinne eines so genannten Positionseffektes oder durch pleiotrope Effekte ergaben sich anhand der Ergebnisse der durchgeführten Inhaltsstoffanalysen keine Hinweise.

Weitere Inhaltsstoffanalysen, die auf Material aus Feldversuchen, die 1996 und 1997 in den USA und Europa (Spanien und Italien) durchgeführt wurden, basieren, und die mit dem Antrag nach Verordnung (EG) 258/97 der ZKBS bereits vorlagen (Az. 6789-02-02-4), belegen ebenfalls die substantielle Äquivalenz von Mais GA21 mit nicht gentechnisch verändertem Mais.

5.3 Bewertung der gentechnisch veränderten Pflanze als Ganzes

Wie unter 5.1. dargelegt, ist keine schädliche Wirkung des mEPSPS-Proteins sowie des Transitpeptids zu erwarten. Da die enzymatische Aktivität des mEPSPS-Proteins klar begrenzt ist und zudem der des endogenen Enzyms entspricht, ist davon auszugehen, dass es neben der Bildung der mEPSPS und des Transitpeptids in den GA21-Maispflanzen zu keiner weiteren Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels kommen wird. Diese Annahme wird auch durch die Ergebnisse der vergleichenden Inhaltsstoffanalyse gestützt, die die substantielle Äquivalenz von Mais GA21 zu konventionellen Maislinien belegt (siehe 5.2.). Auch die Bewertung der agronomischen Parameter sowie die phänotypische Charakterisierung lassen keine Einflüsse der gentechnischen Veränderung auf die pflanzliche Entwicklung und den Metabolismus der gentechnisch veränderten Pflanze erkennen (siehe 3.).

Um die ernährungsphysiologische Unbedenklichkeit von GA21-Mais zu bestätigen, wurde zudem eine subchronische 90-Tage Rattenfütterungsstudie mit GA21-Mais durchgeführt. Gruppen von je zwölf männlichen und zwölf weiblichen Wistar-Ratten (Stamm Alpk:AP_fSD) erhielten Test-Diäten mit einem Anteil von 10 % oder 41,5 % (w/w) GA21-Maiskörnern im Vergleich zu Kontrollgruppen, denen Diäten mit einem Maiskorn-Anteil von 10 % oder 41,5 % (w/w) einer nicht gentechnisch veränderten Maissorte mit vergleichbarem genetischen Hintergrund verabreicht wurden. Innerhalb der Studie wurde die Wirkung zweier GA21-Varianten (mit und ohne Glyphosatbehandlung) untersucht. Ziel der Studie war die Erfassung substanzbedingter Effekte auf die Mortalität, das Körpergewicht, die Organgewichte, den Futterverbrauch, die Hämatologie, die klinische Blutchemie und die motorische Aktivität. Zudem wurden verschiedene Organe und Gewebe untersucht sowie eine Ophthalmoskopie durchgeführt. Es wurden mehrere statistisch signifikante Unterschiede bezüglich einiger Körper- und Organgewichte sowie verschiedener Parameter hinsichtlich der Hämatologie und klinischen Chemie beobachtet. Allerdings waren diese Befunde im allgemeinen nicht dosisabhängig, auf ein Geschlecht begrenzt und/oder ergaben kein einheitliches Muster, wenn die Herbizidbehandlung berücksichtigt wurde. Darüber hinaus gingen die Befunde nicht mit histopathologischen Veränderungen in den entsprechenden Organen bzw. Geweben einher und sind daher nicht als biologisch relevant einzustufen. Insgesamt geben die Ergebnisse der 90-Tage Rattenfütterung keinen Grund zu der Annahme, dass nachteilige Effekte auf die tierische oder menschliche Gesundheit bei Verwendung des GA21-Mais zu Futter- oder Lebensmittelzwecken zu erwarten sind.



Um die ernährungsphysiologische Gleichwertigkeit von GA21-Mais mit konventionellem Mais zu überprüfen, wurde des Weiteren eine 49-Tage Fütterungsstudie an Masthühnern durchgeführt. In dieser Studie wurden zwei Test-Diäten mit GA21-Maiskörnern (mit und ohne Glyphosatbehandlung), nicht gentechnisch veränderter Kontroll-Mais mit vergleichbarem genetischen Hintergrund und konventioneller Referenzmais verglichen. Pro Test-Diät wurden 300 Masthühner (150 männliche und 150 weibliche) aufgestellt, die zwischen dem Schlupf und dem Lebenstag 49 altersabhängig drei verschiedene Futtermischungen mit 51 % bis 64 % (w/w) der betreffenden Maissorten erhielten. Die Auswertung des Fütterungsversuchs ergab keine Hinweise darauf, dass sich durch die gentechnische Veränderung die ernährungsphysiologischen Eigenschaften des GA21-Mais verändert haben. Es wurden keine biologisch relevanten Unterschiede hinsichtlich der Mortalität, der Futtermittelaufnahme und der Futterverwertung zwischen Hühnern, die Futter mit einem Anteil an gentechnisch veränderten Maiskörnern erhielten, und Hühnern, die Futter mit einem Anteil der nicht gentechnisch veränderten Vergleichslinie oder mit einer weiteren konventionellen Linie erhielten, festgestellt.

Dem Antrag war zusätzlich eine *peer-reviewed* Studie (Sidhu *et al.*, 2000) beigefügt, in der Futterwert und Sicherheit von GA21-Mais an Masthühnern untersucht wurde. Auch diese Publikation lieferte keine Hinweise auf unerwünschte Effekte für die Tiergesundheit oder die Produktqualität.

5.4 Bewertung eines horizontalen Gentransfers im Verdauungstrakt

Ein horizontaler Gentransfer auf Mikroorganismen im Verdauungstrakt kann nicht ausgeschlossen werden. Sollte ein solcher Gentransfer möglich sein, würde es sich um einen natürlichen Mechanismus handeln. Auswirkungen eines Gentransfers wären nur bei Vorliegen eines Selektionsdrucks zugunsten des übertragenen Gens zu erwarten. Im vorliegenden Fall ist eine Ausbreitung des Gens für die modifizierte, Glyphosat-tolerante EPSPS aus dem gentechnisch veränderten Mais in Mikroorganismen des Magen-Darm-Traktes wegen des in Abwesenheit von Glyphosat fehlenden Selektionsvorteils nicht zu erwarten. Diese Annahme wird gestützt durch Untersuchungen, bei denen DNA des Phagen M13 oral an Mäuse verabreicht wurde und Phagen-DNA nur bis maximal 7 h nach der Verfütterung in den Faecesproben nachgewiesen werden konnte, was keine Hinweise auf eine Besiedlung der Darmflora mit Fremd-DNA enthaltenden Bakterien liefert. Fremd-DNA konnte im Blutssystem in sehr geringen Mengen (< 0,1 %) über einen kurzen Zeitraum (maximal 24 h) identifiziert werden (Schubbert *et al.*, 1994). Weitere Gene, z. B. Antibiotika-Resistenzgene, sind in der gentechnisch veränderten GA21-Maislinie nicht vorhanden (vgl. 2.).

5.5 Auswirkungen durch die Anwendung glyphosathaltiger Herbizide

Eine Festlegung von Rückstandshöchstmengen nach der Anwendung glyphosathaltiger Herbizide an den gentechnisch veränderten Maispflanzen ist nicht Gegenstand der Bewertung des vorliegenden Antrages, sondern erfolgt im Rahmen des Zulassungsverfahrens von Pflanzenschutzmitteln.

6 Risikoabschätzung in Bezug auf die Umwelt

Der Anbau von gentechnisch verändertem Mais GA21 ist nicht Gegenstand des Antrages, so dass davon auszugehen ist, dass gentechnisch veränderte Maispflanzen, die auf die



Ausgangslinie GA21 zurückgehen, nur unbeabsichtigt und daher in geringem Umfang ins Freiland gelangen werden.

Mais ist eine Domestikationsform, die nur bei Kultivierung durch den Menschen überlebensfähig ist. Maispflanzen sind darüber hinaus nicht winterhart und können sich daher unter den klimatischen Bedingungen Mitteleuropas in natürlichen Floren nicht etablieren.

Eine Kreuzung mit einheimischen Wildpflanzen ist nicht möglich, da Mais keine Kreuzungspartner in der mitteleuropäischen Flora besitzt.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die oben genannten Eigenschaften von Mais durch die im Antrag beschriebene gentechnische Veränderung beeinflusst werden. Die Antragstellerin hat bei Freisetzungsversuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen Untersuchungen zu verschiedenen Inhaltsstoffen, zur vegetativen Entwicklung, zur Blütenbildung und zum Verhalten der Pflanzen gegenüber Krankheiten sowie zum Ertrag durchgeführt. Bei diesen Versuchen hat sich bestätigt, dass sich die gentechnisch veränderten Pflanzen bezüglich der genannten Eigenschaften nicht signifikant von nicht gentechnisch veränderten Maislinien unterscheiden. Die Möglichkeit einer Überdauerung, Ausbreitung, Verwilderung und Pollenübertragung von unbeabsichtigt ausgebrachten gentechnisch veränderten Pflanzen ist nicht anders zu bewerten als die von traditionell gezüchtetem Mais.

7 Empfehlung der ZKBS

Die ZKBS begrüßt, dass bei der Transformation nur die Expressionskassette mit einem Gen, welches für die angestrebte Veränderung (Glyphosat-Toleranz) erforderlich ist, übertragen wurde. Gleiches gilt entsprechend für alle Maislinien, die von der Ausgangstransformante GA21 abstammen.

Unter Abwägung der in der Risikobewertung aufgeführten Gesichtspunkte kommt die ZKBS zu dem Ergebnis, dass nach dem heutigen Erkenntnisstand bei einem Inverkehrbringen von gentechnisch verändertem Mais GA21 als gentechnisch verändertes Lebensmittel und Futtermittel im Rahmen des beantragten Geltungsbereichs (siehe 1.) keine nachteiligen Auswirkungen auf die Gesundheit von Mensch und Tier oder die Umwelt zu erwarten sind.

Zitierte Literatur:

Bevan, M. (1984) Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nucleic acids Res.*, 12:8711-8721.

Lebrun, M., Leroux, B. and Sailland, A. (1996) Chimeric gene for the transformation of plants. U.S. patent number 5,510,471.

Luehrsen, K.R. and Walbot, V. (1991) Intron enhancement of gene expression and splicing efficiency of introns in maize cells. *Mol. Gen. Genet.*, 225:81-93.

McElroy, D., Zhang, W., Cao, J. and Wu, R. (1990) Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 2:163-171.

McElroy, D., Blowers, D., Jenes, B. and Wu, R. (1991) Construction of expression vectors based on the rice actin 1 (*Act1*) 5' region for use in monocot transformation. *Mol. Gen. Genet.*, 231:150-160.



Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Schubbert, R., Lettmann, C. and Doerfler, W. (1994) Ingested foreign (phage M13) DNA survives transiently in the gastrointestinal tract and enters the bloodstream of mice. *Mol. Gen. Genet.*, 242:495-504.

Sidhu, R.S., Hammond, B.G., Fuchs, R.L., Mutz, J.-N., Holden, L.R., George, B. and Olson T. (2000) Glyphosate-Tolerant Corn: The Composition and Feeding Value of Grain from Glyphosate-Tolerant Corn in Equivalent to That of Conventional Corn (*Zea mays* L.). *J. Agric. Food Chem.*, 48:2305-2312.

Sutcliffe G. (1978) Nucleotide sequences of the ampicillin resistance gene of *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 75:3737-3741.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33:103-119.