



**„Gene-Farming“:
Stand der Wissenschaft,
mögliche Risiken und
Management-Strategien**

Gutachten zu

„Spezifische Risiken des Gene-Farming in Pflanzen“

VON

Dr. André de Kathen

im Auftrag des Umweltbundesamtes

Diese TEXTE-Veröffentlichung kann bezogen werden bei
Vorauszahlung von DM 15,-- (7,67 Euro)
durch Post- bzw. Banküberweisung,
Verrechnungsscheck oder Zahlkarte auf das

Konto Nummer 4327 65 - 104 bei der
Postbank Berlin (BLZ 10010010)
Fa. Werbung und Vertrieb,
Ahornstraße 1-2,
10787 Berlin

Parallel zur Überweisung richten Sie bitte
eine schriftliche Bestellung mit Nennung
der **Texte-Nummer** sowie des **Namens**
und der **Anschrift des Bestellers** an die
Firma Werbung und Vertrieb.

Der Herausgeber übernimmt keine Gewähr
für die Richtigkeit, die Genauigkeit und
Vollständigkeit der Angaben sowie für
die Beachtung privater Rechte Dritter.
Die in der Studie geäußerten Ansichten
und Meinungen müssen nicht mit denen des
Herausgebers übereinstimmen.

Herausgeber: Umweltbundesamt
Postfach 33 00 22
14191 Berlin
Tel.: 030/8903-0
Telex: 183 756
Telefax: 030/8903 2285
Internet: <http://www.umweltbundesamt.de>

Redaktion: Fachgebiet IV 2.5
Dr. Claudia Golz

Berlin, Februar 2001

Acknowledgement:

Information and data on potential risks resulting from the production, application and/or release of bio-pharmaceuticals in transgenic plants are rare. Therefore, most of the scenarios described do not profit or are built on substantial experience, but hopefully reflect the current debate. Although, the author takes full responsibility for any mistakes or shortcomings, many conclusions developed during discussions and by considering unpublished results and comments. A number of people have participated in this process and the author would like to express his gratitude to Jim Brandle, Mitra Panahi, Larry Holbrook, Anthony Ridgway, Bruce Carter, Charles Arntzen, Jim White, Larry Erickson, Janice Reichert, Simon Barber, Thomas Ternes, Doug King, Fredy Altpeter, Carole Cramer, Joachim Schiemann, Subhash Gupta, Christian Daughton, Bob Frederick and Uli Commandeur. Time is a valuable good - thanks for sharing it.

Danksagung:

Information und Daten zu möglichen Risiken, die mit der Freisetzung oder dem Anbau transgener, Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen verbunden sein könnten, sind sehr rar. Deshalb basieren die vorgestellten Szenarien auch nicht auf umfangreichen Erfahrungen. Sie mögen aber, hoffentlich, den gegenwärtigen Stand der Diskussion wiedergeben. Obwohl der Autor natürlich jede Verantwortung für Fehler und Unzulänglichkeiten übernimmt, so entwickelten sich manche Schlußfolgerungen und Einsichten erst in der Diskussion und durch einige nicht veröffentlichte Beiträge. Eine ganze Reihe von Personen hat daran einigen Anteil. Deshalb möchte ich mich herzlich bei folgenden Menschen bedanken: Jim Brandle, Mitra Panahi, Larry Holbrook, Anthony Ridgway, Bruce Carter, Charles Arntzen, Jim White, Larry Erickson, Janice Reichert, Simon Barber, Thomas Ternes, Doug King, Fredy Altpeter, Carole Cramer, Joachim Schiemann, Subhash Gupta, Christian Daughton, Bob Frederick and Uli Commandeur. Zeit ist ein wertvolles Gut - vielen Dank dafür.

Inhaltsverzeichnis:

Kapitel 1: Einführung	1
1. Überblick	1
2. Aufgabenstellung	2
3. Methodik	4
4. Gene-farming: Orientierung und Begriffsbestimmung	5
4.1. „gene-farming“	5
4.2. „Pharmaceuticals“ vs. „Nutraceuticals“ oder „Drugs“ vs. „Food“	7
5. Pflanzliche Bioreaktoren: Das Spektrum gentechnischer Veränderungen.....	8
5.1. Kohlenhydrate	8
5.2. Öle und Fettsäuren.....	9
5.3. Synthetische Polymere	9
5.4. Vitamine	10
5.5. Xenogene Proteine	10
5.6. Sekundär-Metabolite	11
5.7. Management	12
6. Zuständigkeiten	12
7. Einordnung in die Risikodebatte: Kategorisierung von GMO/GVP/LMO.....	14
Kapitel 2: Stand der wissenschaftlichen Entwicklung	17
1. Orientierung.....	17
2. Vakzine/Impfstoffe.....	18
3. Rekombinante Antikörper	26
4. Produktionsverfahren	29
5. Produktion von Milch- und Blutproteinen	30
Kapitel 3: Folgenabschätzung, Risiko-/Sicherheitsbewertung.....	32
1. Orientierung.....	32
2. Veränderte Protein-Struktur	35
2.1. Translations- und Transkriptionsfehler bei heterologer Expression	35
2.2. Proteinfaltung und Chaperone.....	37
2.3. Glykosylierung	38
3. Modifizierte oder kryptische Funktion.....	38
3.1. Lactoferrin	39
3.2. Hämoglobin	40
3.3. Das 2',5'-Oligoadenylat-System	41
3.4. Interferone und Interleukine.....	42
4. Indirekte Wirkungen.....	44
5. Rekombination: Vakzine und virale Vektoren.....	45
5.1. Virale Sequenzen im pflanzlichen Genom.....	46
5.2. Rekombination und Rekonstitution.....	48
5.3. Schlußfolgerung	49
5.4. Antikörper	50
6. „Familiarity“: Eintrag nicht-biotischer Pharmazeutika?	51
7. Zusammenfassung und Entwicklung eines Fragenkatalogs.....	53

Kapitel 4: Maßnahmen zum Risiko-Management	57
1. Orientierung	57
2. Physikalisch/Organisatorisch	58
2.1. Organisation	58
2.2. Auswahl der Pflanzen	58
2.3. Geographisch, Minimaldistanzen	59
2.4. (geschlossene) aquatische Systeme	59
3. Biologisch	60
3.1. Minimierung von Ausbreitung und „gene-flow“	60
3.2. gezielte Expression	61
3.3. Biologisches Containment bei transienter Expression durch Pflanzenviren	61
4. Prozeß-vermittelt	62
5. Nachweis und Monitoring	63
 Kapitel 5: Forschungsbedarf	 66
1. Entwicklung von Analyse- und Bewertungskonzepten	66
2. Identifizierung möglicher Forschungsprojekte	68
3. Empfehlung	69
 Kapitel 6: Zusammenfassung	 70
6.1. Einführung und Aufgabenstellung	70
6.2. Stand der Wissenschaft	71
6.3. Mögliche spezifische Risiken	74
6.4. Risiko-Management	76
6.5. Schlußfolgerung und Forschungsbedarf	77
 Kapitel 7: Executive Summary	 79
7.1. Introduction and Objective	79
7.2. State-of-the-Art	80
7.3. Possible specific risks	82
7.4. Risk management	85
7.5. Conclusion and recommendation	86
 ANNEX 1: Literatur	 88
 ANNEX 2: Interview-Partner und Kontaktadressen	 100

Abkürzungen

AIMV	Alfalfa Mosaic Virus
AIR	Auto-Immunreaktion
AMG	Arzneimittelgesetz, D
APHIS	Animal and Plant Health Protection Service, USDA, USA
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, D
BfArM	Bundesamt für Arzneimittel und Medizinprodukte, D
BNYVV	Beet Necrotic Yellow Vein Virus
BSV	Banana Streak Virus
BVDV	Bovine Viral Diarrhea Virus
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitl. Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, D
bzw.	beziehungsweise
CBD	Convention on Biological Diversity
CBI	Confidential Business Information
CDC	Centre for Disease Control, USA
CEA	Cancero-Embryogenic Antigen
cDNA	complementary DNA
COPV	Canine Oral Papilloma Virus
CP	Coat Protein (Hüllprotein)
CPMP	Committee for Proprietary Medicinal Products, EU
CPMV	Cowpea Mosaic Virus
CSDD	Tufts Center for the Study of Drug Development, USA
CT-B	Cholera Toxin B
CVMP	Committee for Veterinary Medicinal Products, EU
EC	European Commission (Europäische Kommission), EU
e.g.	for example
EMA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, EU
EPA	Environmental Protection Agency, USA
FDA	Federal Drug Administration, USA
FDCA	Federal Food, Drug and Cosmetic Act, USA
FG	Frischgewicht
FIFRA	Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act, USA
FMDV	Foot and Mouth Disease Virus
FPPA	Federal Plant Pest Act, USA
ggf.	gegebenenfalls
GLP	Gesamtgehalt löslicher Proteine
ha	Hektar
HDV	Haemorrhagic Disease Virus
HIV	Human Immundeficiency Virus
IFS	Isoflavon-Synthase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
INF	Interferon
kDa	kilo-Dalton
LMO	Living Modified Organism
MAK	Monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation

MES	Mink Enteritis Virus
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIS	Mucosal Immunsystem
mRNA	Messenger RNA
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ORF	Open Reading Frame
PB	Partikel-Beschuß
PBP	Protein-basierendes Polymer
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEI	Paul Ehrlich Institut, D
PHA	Poly-hydroxy-Alkanoate
PHB	Poly-hydroxy-Butyrat
PQA	Plant Quarantine Act, USA
PRRSV	Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus
PSy	Phytoen-Synthase
PVCV	Petunia Vein-Clearing Virus
rBST	Recombinant Bovine Somatotropin
RKI	Robert Koch-Institut, D
RT	Raumtemperatur
scFv	Single Chain Fragment, variable
SOP	Standard Operation Procedures
TBSV	Tomato Bushy Stunt Virus
TGEV	Transmissible Gastroenteritis Virus
TGMV	Tomato Golden Mosaic Virus
TMV	Tobacco Mosaic Virus
tRNA	Transfer RNA
TSCA	Toxic Substances Control Act, USA
UBA	Umweltbundesamt, D
USDA	United States Department of Agriculture, USA
VLP	Virus-Like Particle
VP	Viral Protein
VSTA	Virus, Serum and Toxin Act, USA

Kapitel 1: Einführung

1. Überblick

Nur zehn Jahre nach der Herstellung der ersten transgenen Pflanze (Horsch et al. 1985) begann bereits Mitte der 90er Jahre deren Kommerzialisierung - vor allem in den USA, Kanada und Argentinien. 1999 wurden weltweit transgene Pflanzen auf etwa 40 Millionen ha geerntet. Vor allem in den USA wurden dabei in nur wenigen Jahren Marktanteile von bis zu 50% erzielt (James 1999).

Trotz der rasanten Entwicklung bei der Produktion, Freisetzung und Kommerzialisierung transgener Pflanzen in den letzten 15 Jahren sind großflächige Freisetzungen auf wenige Nutzpflanzenarten, Eigenschaften und Länder beschränkt. Etwa 99% der Anbaufläche entfallen auf Mais, Sojabohne, Baumwolle sowie Raps und Kartoffeln. Mehr als 95% der Anbaufläche verteilen sich auf Argentinien, Kanada und die USA, wobei seit 1997 transgene Nutzpflanzen mit Herbizid- und/oder Insektenresistenz etwa 95% der gesamten Anbaufläche ausmachen.

Dabei hat die Debatte um mögliche Nutzen und Risiken der oben genannten Nutzpflanzen den Blick auf das Potential der Gentechnik in anderen Bereichen verdeckt. Es gibt Transformationsverfahren für mindestens 60 verschiedene Pflanzenarten. Darunter finden sich alle wichtigen Getreide und Leguminosen sowie Knollenfrüchte, wie Cassava und Süßkartoffeln mit hoher Biomasse-Produktion. Mehr als 50 verschiedene Genkonstrukte in diversen Pflanzenarten sind in der Test- bzw. Zulassungsphase, darunter Kühle- und Salztoleranz, geringere Konzentration antinutritiver Substanzen, geringer Ligningehalt oder Nematodenresistenz. Bis auf einige Ausnahmen wurde bei diesen transgenen Pflanzen der „ersten Generation“ im wesentlichen die landwirtschaftliche Leistung (Ertrag, Ertragsstabilität) oder das Verarbeitungsverfahren („downstream-processing“) verbessert.

Die Nutzung von Pflanzen (und phytopathogenen Viren) als Bioreaktoren für die Produktion industrieller Enzyme (Czihal et al. 1999; Hood et al. 1999), pharmazeutischer Proteine und Peptide (Cramer et al. 1999), optimierter Protein-, Kohlenhydrat- und Fettsäuremuster sowie neuartiger Polymere (siehe Willmitzer, 1999, und dort zitierte Literatur) hat sich rasant entwickelt. Neue Technologien (Stichworte: Proteomics, Genomics, Bioinformatics, in silico-cloning) haben diesen Prozeß beschleunigt. Darüber hinaus sind Fortschritte bei den Transformationsmethoden gemacht worden. Induzierbare oder gewebespezifische Promotoren, Minimalvektoren und Transformationsverfahren ohne selektierbare Markergene sind geeignet, die Akzeptanz des Verbrauchers zu steigern und eine Folgenabschätzung zu erleichtern. Darüber hinaus sind Marktvolumen, Gewinnspanne und Geschwindigkeit des „return of investment“ im Bereich der industriellen Produktion von Enzymen, modifizierter Nahrungsmittel („functional food“) und Medikamente wesentlich höher als im Saatgutsektor (Umsatz weltweit, kommerziell: ~30 Milliarden US\$). Die Firma Meristem-Therapeutics, basierend auf einer Studie von Ernst & Young, beziffert das Volumen des Biotechnologie-Marktes an der Schwelle des neuen Jahrtausends auf etwa 50 Milliarden US\$ pro Jahr. Der Anteil medizinischer Produkte wird auf etwa 70% geschätzt, wobei rekombinante Proteine (deren Produktion in Pflanzen Gegenstand des vorliegenden Gutachtens ist) über 18 Milliarden US\$ aus-

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

machen. Die Hälfte der japanischen Bevölkerung investiert etwa 1,5 Milliarden US\$ pro Jahr in „functional food“ (Abelson und Hines 1999) und der weltweite Umsatz für Interferon allein beläuft sich nach Beilharz (2000) auf etwa 4 Milliarden US\$.

Mit der neuen, „zweiten und dritten“ Generation transgener Nutzpflanzen (Stichwort: precise biotechnology), vor allem im Nahrungsmittelbereich und pharmazeutischen Bereich, ist eine neue Qualität -auch in der Folgenabschätzung- verbunden. Eine gentechnisch vermittelte Herbizidresistenz stellt eine überschaubare Wirkkette dar. Die transgenen Pflanzen werden großflächig angebaut, das Anbauverfahren variiert nur wenig. Darüber hinaus werden die transgenen Pflanzen oder ihre Produkte in größeren Mengen, ohne Aufsicht, von sehr unterschiedlichen Konsumenten aufgenommen, auf die eine Wirkung nicht beabsichtigt ist. Hingegen lösen Vakzine oder Peptidhormone ganze Reaktionskaskaden aus, Nebenwirkungen inbegriffen. Allerdings ist hier eine Wirkung beabsichtigt und die vorgesehene Aufnahme erfolgt unter kontrollierten Bedingungen an eine dafür indizierte Gruppe. Ist damit auch eine neue Qualität im Hinblick auf die Frage nach potentiellen spezifischen Risiken verbunden, die aus der großflächigen Freisetzung Pharmazeutika produzierender Pflanzen resultieren könnten? Ist eine großflächige Freisetzung überhaupt zu erwarten?

Wie sind die neuen Werkzeuge und Methoden zu bewerten, die ein besseres Management potentieller Risiken ermöglichen sollen? So läßt sich die Expression der eingebrachten Gene auf bestimmte Organe oder bestimmte Entwicklungsstufen der Pflanze beschränken oder die Expression wird erst durch definierte äußere Reize ausgelöst. Zudem läßt sich die Ausbreitung der transgenen Pflanze durch ein biologisches „Containment“ mindestens minimieren. Sind diese Methoden auch auf Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen anwendbar und reichen sie aus?

2. Aufgabenstellung

Seit 1991 werden Bio-Pharmazeutika und Diagnostika produzierende Pflanzen auch im Freiland angebaut. Experimentelle Daten zu möglichen spezifischen Umweltrisiken liegen bislang nicht vor. Es ist daher die Aufgabe des Gutachtens:

- a) den Stand der Wissenschaft zu dokumentieren,
- b) die daraus resultierenden spezifischen Risiken zu identifizieren und zu bewerten,
- c) mögliche Maßnahmen zur Minimierung dieser Risiken abzuleiten,
- d) mögliche Lücken in der Sicherheitsforschung zu identifizieren.

Kapitel 2 des Gutachtens beschreibt den *Stand der aktuellen wissenschaftlichen Entwicklung (Pflanzenarten/Entwicklungsstand/Arbeitsgruppen/Wirkung)* und vermittelt einen umfassenden Überblick über die bearbeiteten Pflanzenarten, die eingebrachten Gene sowie die Wirkung der Produkte.

Kapitel 3 soll die Frage beantworten, *welche spezifischen Risiken aus einer zukünftigen, auch großflächigen, Freisetzung dieser Pflanzen für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt zu identifizieren sind?* Hier lassen sich bereits konzeptionell drei Risikogruppen unterscheiden: **a) Produktrisiko:** bei den Bio-Pharmazeutika produzierenden, transgenen Pflanzen ist eine Wirkung des Produktes auf Menschen und/oder Tiere beabsichtigt. Lassen sich unmittelbare

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

Risiken ableiten, die schon vor der Zulassung, bei einer möglichen, auch experimentellen, Freisetzung zu berücksichtigen sind.

b) Risiken, bedingt durch Wechselwirkungen mit der abiotischen Umwelt (z.B. Licht, Hitze, Wasser, Produktionspraxis), **mit Mikroorganismen** (z.B. Endophyten, Symbionten, Pathogene) **und durch komplexe Expressions- und Regulationsmechanismen** (z.B. molekulare Modifikationen, inter- und intrazelluläre Verteilung, Kompartimentierung): sind daraus spezifische mittelbare und unmittelbare Risiken abzuleiten (z.B. Kontaminationen und/oder Rekombination durch/mit Pflanzenviren, Modifikationen und Expressionsschwankungen? Eine Bewertung des Produktes ist zwar eine Aufgabe der Zulassungsbehörde, es stellt sich aber die Frage, ob diese Modifikationen für die Abschätzung eines Umweltrisikos relevant sind.

c) Risiken für die Umwelt: hier ist zu klären und wird zu bewerten sein, inwieweit die belebte Umwelt (z.B. Organismen, die als Phytophagen, Saprophyten oder in anderer probiotischer, symbiotischer oder antibiotischer Beziehung zur Pflanze existieren) durch die Produktion von Bio-Pharmazeutika, deren Vorläufer oder modifizierte Varianten beeinflusst wird. Da keine experimentellen Daten existieren, sollen erste Schritte zur Beantwortung der folgenden Fragen unternommen werden:

- lassen sich Risikogruppen identifizieren und kategorisieren (z.B. nach Wirkung/Funktion oder Struktur),
- ist eine Analyse spezifischer direkter Folgen bei Freisetzung nötig und möglich,
- lassen sich sicherheitsrelevante Einflüsse *durch* die belebte/unbelebte Umwelt beschreiben und analysieren,
- sind daraus resultierende spezifische Risiken *für* Mensch, Tier und Umwelt ableitbar,
- lassen sich mögliche Szenarien außerhalb der direkten Ursache/Wirkung Beziehung zumindest beschreiben oder gar bewerten?

Ausgehend von den identifizierten Szenarien soll in Kapitel 4 dann die Frage beantwortet werden: *Welche Maßnahmen sind zu entwickeln und abzuleiten, um eine sichere Handhabung zu gewährleisten?* Dies läßt sich selbstverständlich nur von Fall zu Fall definieren, zudem steht die Nutzung des „gene-farming“ noch am Anfang. Daher werden, abgesehen von einigen Fallbeispielen, mögliche Management-Strategien beschrieben und ihre Bedeutung im Zusammenhang mit „gene-farming“ wird diskutiert.

- Ein *physikalisches* Containment: es handelt sich dann nicht um eine Freisetzung im engeren Sinne, allerdings sind Fragen in bezug auf Transport, Prozessierung und Abfall-/Abwasser-Management zu klären (Stichworte: kontaminierende Mikroorganismen, notwendige Symbionten). Mögliche Strategien und Beispiele für eine Risikominimierung durch physikalische Containment sowie Maßnahmen bei Transport, Prozessierung und Abwasser-/Abfall-Management sollen deshalb auch im Rahmen des Gutachtens angesprochen und bewertet werden.
- Ein *biologisches* Containment: beschrieben und bewertet werden Methoden und Technologien, die eine sichere Handhabung durch reduzierte biologische Fitneß, Minimierung der möglichen unbeabsichtigten Ausbreitung oder auch durch Fixierung des Produktes in bestimmten Pflanzenteilen (Knollen, Samen etc.) oder Zellkompartimenten (Chloroplasten) oder zu bestimmten Zeiten ermöglichen sollen.
- Ein *prozeß-vermitteltes* Containment: darunter werden Strategien verstanden, bei denen das Primärprodukt erst nach Ernte und Behandlung zu einem pharmazeutisch wirksamen Produkt wird. In diesem Fall ist zu klären, inwieweit die ggf. modifizierten Vorläufer ein Risiko für die Umwelt darstellen.

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

- Maßnahmen und Methoden, die eine Überwachung bzw. ein *Monitoring* erlauben: d.h. Möglichkeit der Verfolgung und Identifizierung der Gene, der Genprodukte und Produkte inklusive möglicher Vorläufer und Modifikationen sowie eine spezifischen Kennzeichnung.

Im fünften Kapitel soll dann, aufbauend auf den gewonnenen Erkenntnissen die Frage beantwortet werden: *Welche Forschungslücken, in bezug auf die Sicherheitsforschung, gibt es und welche Vorschläge können für eine weitere Forschung gemacht werden?*

3. Methodik

Interessanterweise existieren bisher nur wenige Publikationen, die das mögliche spezifische Risiko transgener, Pharmazeutika produzierender Pflanzen thematisieren. Darunter sind keine, die über Ergebnisse von Freisetzungen solcher Pflanzen berichten oder gar experimentelle Daten vorlegen. Dies ist erstaunlich, da bereits seit 1991 entsprechende Genehmigungen (permits) in den USA erteilt worden sind und bis 1998 etwa 100 Freisetzungen¹ weltweit gezählt werden konnten.

Es liegen nur wenige spezifische Abschätzungen über Umweltwirkungen (environmental assessments) aus den USA vor. Das läßt den Schluß zu, dass dort nur wenige Freisetzungen mit „echten“ Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen stattgefunden haben. Allerdings sind die transgenen Pflanzen nur unzureichend beschrieben und charakterisiert, da die überwiegende Mehrheit der Informationen als „vertraulich“ (CBI, confidential business information) gekennzeichnet ist. So ist für keine der von 1991 bis 1998 in der OECD-Datenbank aufgelisteten etwa 100 Freisetzungen bekannt, um welche Konstrukte es sich im Detail handelte. Entsprechend stützt sich die hier vorgestellte Risikoanalyse auf einige wenige exemplarische Fälle und entwickelt darüber hinaus virtuelle Beispiele.

Das vorliegende Gutachten stützt sich daher auf:

- eine umfangreiche Literaturrecherche in entsprechenden Datenbanken (PubMed, MedLine, BioMedNet, BioSys, Agricola). Die mehr als 170 ausgewählten Publikationen vermitteln einen umfassenden Überblick über den veröffentlichten Stand der Wissenschaft und lassen auch die Entwicklung möglicher Risiko-Szenarien zu,
- Informationen von etwa 20 Wissenschaftlern weltweit, in öffentlichen und privaten Forschungsinstituten, multinationalen Konzernen und regulierenden Behörden,
- die Ergebnisse des International Molecular Farming Kongresses (IMFC), der im September 1999 in London, Kanada, stattgefunden hat sowie den zweiten OECD-Molecular Farming Workshop im September 2000 in Frankreich.

¹ Die Aussagekraft nicht nur der OECD-Datenbank bzw. der vorgeschlagenen Kategorien ist fehlerhaft, unvollständig und unzureichend. Eine einheitliche, transparente und vollständige Dokumentation ist, auch im Hinblick auf die Forderungen des Cartagena-Protokolls, dringend zu erarbeiten - vorausgesetzt, die Produkte werden kommerzialisiert.

4. Gene-farming: Orientierung und Begriffsbestimmung

4.1. „gene-farming“

Die Begriffe „Gene-Farming“, „Molecular Farming“, „Bio-Pharming“ oder „Molecular Pharming“ sind nicht definiert, beschreiben aber -per Konvention- die Produktion xenogener Substanzen in heterologen, transgenen Produktionssystemen. Dabei wird mit „farming“ in der Regel ein pflanzliches Produktionssystem beschrieben, mit „pharming“ die Produktion pharmazeutischer Produkte. Es finden sich in der Literatur aber auch andere Begriffsgebräuche. Zu den „xenogenen“ Substanzen gehören Antigene und Vakzine, Antikörper und gekoppelte Antikörper, Peptide und andere, industriell oder medizinisch nutzbare Proteine. Nicht xenogen, aber ebenfalls unter „farming“ oder „pharming“ verstanden, wird die Produktion niedermolekularer Substanzen, z.B. Sekundärmetabolite, mit medizinischer Wirkung (Biotransformation). Als Beispiel seien hier herzwirksame Glykoside oder auch hormonähnliche Substanzen (z.B. Phytoöstrogene) genannt. Der Begriff „Bio-Pharmazeutika“ wird oft im Zusammenhang mit komplexen Proteinen und Peptiden verwendet und soll deshalb auch im folgenden genutzt werden.

Obwohl es sich um eine vergleichsweise neue Technik handelt, gehen viele Autoren davon aus, dass transgene Pflanzen für die Produktion rekombinanter Antikörper und Vakzine für die Diagnostik (z.B. Antikörper und Antikörper-Fragmente), Immuntherapie (z.B. tumorspezifische oder anti-ideotypische Antikörper) und Immunisierung (z.B. rekombinante Vakzine zur humoralen Immunisierung; Induktion oraler Toleranz bei Autoimmunkrankheiten) von großer Bedeutung sind (Mahon et al. 1998; Hood und Jilka 1999; Fischer et al. 1999a/c; Franken et al. 1997; Herbers und Sonnewald 1999).

Neben Antikörpern und Vakzinen stehen insbesondere die Produktion einfacher Peptide und komplexer Proteine (Interferon, Interleukin, Somatotropin, Insulin, Hirudin, Milchproteine, Blutersatzstoffe etc.) im Zentrum der Forschung (Tian und Yang 1998; Arakawa et al. 1999c; Theissen 1999). Nicht zu vergessen sind mögliche Anwendungen in der Forschung (Stichwort: Proteomics und Genomics), da die preiswerte und massenhafte Produktion von komplexen Proteinen bei deren Funktionsaufklärung von entscheidender Bedeutung ist. Goddijn und Pen (1995), Fischer et al. (1999b) und Tian und Yang (1998) beschreiben vergleichend einige Vor- und Nachteile bakterieller, tierischer und pflanzlicher Produktionssysteme. Die wesentlichen Eigenschaften der verschiedenen Produktions-systeme sind in der folgenden Tabelle vergleichend zusammengefaßt.

Insgesamt zeichnen sich pflanzliche Systeme durch folgende Vorteile aus:

- Effizienz: es ist einfacher, schneller und kostengünstiger transgene Pflanzen zu produzieren als transgene Tiere; der Unterhalt bakterieller, tierischer oder auch pflanzlicher Zellkulturen ist ebenfalls sehr kostenintensiv,
- Sicherheit: es sind keine Pflanzenpathogene bekannt, die Säuger/Vertebraten infizieren,
- Geschwindigkeit: die Biomasseproduktion ist hoch und die meisten Nutzpflanzen erreichen in wenigen Monaten ihre Reife,
- Lagerung: in pflanzlichen Dauerformen (z.B. Knollen und Samen) lassen sich auch Proteine über längere Zeit lagern und ohne Kühlkette transportieren,
- ethische Bedenken sind bei der Verwendung von Pflanzen gering.

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

Als Nachteile beschreiben mehrere Autoren die z.T. deutlichen Unterschiede in der Übersetzung von Basentriplets in Aminosäuren (codon-usage) zwischen Pflanzen und Tieren. Bestimmte Glykosylierungsmuster sind in Pflanzen nicht bekannt oder unterscheiden sich von tierischen Systemen. Die Steuerung der Expression (targeted expression) ist vergleichsweise schwierig. Darüber hinaus sind Pflanzen an eine Wechselwirkung mit der Umwelt -der sie sich ja nicht entziehen können- angepaßt. Dies kann zu unerwünschten Veränderungen des Produktes führen und die Standardisierung von Produktionsmenge und Qualität erschweren. Schließlich führt die bisher noch geringe Effizienz -Fortschritte werden allerdings gemacht- pflanzlicher Systeme zu recht hohen „downstream-processing“ Kosten. Die geringe Produktionsmenge verlangt einen hohen Aufwand bei der Aufreinigung.

Tabelle 1: Vergleich der Eigenschaften verschiedener Produktionssysteme für rekombinante Proteine (nach Fischer et al. 1999; modifiziert und ergänzt)

	Faktor	transgene Pflanzen	Pflanzen-viren	Hefe, Pichia	Bakterien	humane Zellkultur	tierische Zellkultur	Insekten/BV	GVT
KOSTEN	K: Produktion	gering	gering	mittel	gering	hoch	hoch	mittel	hoch
	Entw.: Stand	fortges.	fortges.	Routine	Routine	Routine	Routine	gering ¹	gering
	Entw.: Zeit	hoch	gering	mittel	gering	hoch	hoch	mittel	hoch
	K: scale-up	gering	gering	hoch ²	hoch ²	hoch ²	hoch ²	hoch ²	hoch
	Prod.geograph.	weltweit	weltweit	weltweit	weltweit	weltweit	weltweit	weltweit	weltweit
	Vermehrung	leicht	möglich	leicht	leicht	schwer	schwer	schwer	möglich
	Ertrag	hoch	+ hoch	hoch	mittel	- hoch	- hoch	- hoch	hoch
QUALITÄT	Multimere	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja?	ja
	Gengröße limit.	nein	nein	?	?	ja	ja	?	ja
	Tertiärstruktur	ja?	ja?	mittel	gering	hoch	hoch	ja?	hoch
	Glykosylierung ³	korrekt?	korrekt?	fehlerh.	keine	korrekt	korrekt	korrekt?	korrekt
	Homogenität	hoch	mittel	mittel	gering	mittel	gering	hoch?	gering
ANWENDUNG	Verabreichung	möglich	möglich	nein	nein	nein	nein	nein	möglich
	Lagerung	RT	-20°C	-20°C	-20°C	-196°C	-196°C	-196°C	RT
	Verteilung	leicht	leicht	möglich	möglich	schwer	schwer	möglich	möglich
	Eth. Bedenken	existent	gering	gering	gering	existent	existent	?	hoch
	Kontamination	nein?	nein?	gering?	hoch	hoch	hoch	gering?	hoch
Sicherheit	hoch	hoch	hoch?	gering	mittel	mittel	?	hoch	

K = Kostenfaktor; RT = Raumtemperatur; GVT: gentechnisch veränderte Tiere

¹Produktion stabil transformierter Zelllinien/transgener Insekten in der Entwicklung

²hohe Kosten durch Entwicklung und Betrieb von großen Fermentern

³Pflanzen zeigen andere Glykosylierungsmuster als z.B. Säuger, diese sind u.U. modifizierbar

Die Bewertungen, die dieser Tabelle zu Grunde liegen, können natürlich nur eine Momentaufnahme sein - wie sie auch vor zehn Jahren sicherlich anders ausgesehen hätte.

4.2. „Pharmaceuticals“ vs. „Nutraceuticals“ oder „Drugs“ vs. „Food“

Die Klärung dieser Frage mag zunächst akademisch erscheinen. Längst (oder nie?) dienen Nahrungsmittel nicht allein der Sicherung des Überlebens. Epidemiologische Analysen belegen die Bedeutung einzelner Komponenten der Nahrungsmittel bei der Entstehung von Herzerkrankungen, Krebs und anderen „Zivilisationskrankheiten“ in einer zunehmend geriatrischen Gesellschaft. Gleichzeitig nimmt die Bedeutung einer präventiven Medizin und das Bedürfnis nach aufgewerteten Nahrungsmitteln zu (Stichworte: Nutraceuticals oder Functional Food). Hier schwindet dann auch die Grenze zwischen „Pharmaceuticals“ und „Nutraceuticals“. Es ist schwierig zu beurteilen, ob die konstitutive Expression von Resveratrol (antioxidative und chemopräventive Wirkung bei Krebs) in pflanzlichen oder prozessierten Nahrungsmitteln bereits eine (präventive) Therapie im medizinischen Sinne ist (Jang et al. 1997).

Formal ist diese Frage über die Zulassungsverfahren geregelt. Für eine wissenschaftlich fundierte Risikobewertung transgener Pflanzen ist es aber zunächst ohne Bedeutung, von welcher regulierenden Behörde das Produkt schließlich zugelassen wird. In keinem Fall ist eine umfangreiche Umweltverträglichkeitsprüfung integraler Bestandteil der Zulassung².

Definiert man Medikamente als Substanzen für die Diagnose, Heilung, Behandlung, Linderung oder Vorbeugung von Krankheiten und ihrer Symptome, so stellen Hasler (1997) und Mukerji (1997) bereits zurecht fest, dass die Grenze zwischen Medikamenten und Nahrungsmitteln schwindet, neue Risiko/Nutzen Rechnungen erstellt und Ernährung und Gesundheit weiter integriert werden müssen. Im Hinblick auf eine Risikoanalyse problematisch ist die Tatsache, dass die Bedeutung pflanzlicher Inhaltsstoffe oft nur aus epidemiologischen Analysen ersichtlich ist, ohne dass die Wirkkette kausal überzeugend darzustellen ist. Viele Substanzen zeigen erst nach dauerhafter Einnahme über ein ganzes Lebensalter hinweg eine Wirkung, die oft nur gering über einer statistisch abgesicherten Signifikanzschwelle liegt.

Das Gutachten konzentriert sich auf die Bewertung transgener Pflanzen, die billig und in großen Mengen bio-pharmazeutische und/oder medizinische Produkte herstellen können. Dazu gehören Arzneimittel (z.B. Interferone, Interleukine, Wachstumshormone), Impfstoffe, Vakzine und Adjuvantien (z.B. Hepatitis Virus und HIV Oberflächenproteine, Cholera-Toxin), Medizinprodukte (z.B. Kollagen) und medizinische Diagnostika (z.B. Antikörper). Außerhalb der Betrachtung stehen Pflanzen mit veränderten Fettsäure-, Protein- oder Kohlenhydratzusammensetzungen. Ebenfalls nicht Gegenstand des Gutachtens sind Pflanzen, die durch gentechnische Methoden in ihrem Vitamingehalt, ihrem Gehalt an Antioxidantien oder anderen, im Rahmen einer präventiven Medizin, vielleicht wünschenswerten Inhaltsstoffen verändert sind. Damit ist jedoch nicht impliziert, dass eine Freisetzung dieser, sogenannte „Nutraceuticals“ produzierenden Pflanzen, kein Risiko für die Umwelt darstellen kann.

² Unklar ist, ob und wie die Umsetzung der Direktive 81/852/EEC [Umweltabschätzung veterinärmedizinischer Produkte] sowie die CVMP „note for guidance“ [EMA, 1997] hier relevant werden können.

5. Pflanzliche Bioreaktoren: Das Spektrum gentechnischer Veränderungen

Bevor im Detail auf Pharmazeutika produzierende Pflanzen eingegangen wird, soll im folgenden Abschnitt ein Eindruck von den angrenzenden Bereichen des „gene-farming“ vermittelt werden. In der Literatur werden „gene-farming“ und „output traits“ oft synonym gebraucht, während agronomische Eigenschaften, wie Pathogen- und Herbizidresistenz, oft als „input traits“ bezeichnet werden (Kishore und Shewmaker 1999). Schritt für Schritt nähert man sich damit wieder einer holistischen Betrachtung der Pflanzenproduktion (Pflanzen haben schon immer nicht nur als Nahrungsmittel, sondern auch als Werkzeug, Kleidung, Brennstoff, Medizin und Baustoff Verwendung gefunden), wie sie in der intensiv betriebenen Landwirtschaft teilweise verloren gegangen ist - vor allem auch durch den Verlust an Variabilität zum Nutzen höherer Erträge und effizienterem Anbau. Dies kann auch im Rahmen einer Risikoabschätzung und für ein Risikomanagement von Bedeutung sein.

Sowohl für „input-“ als auch für „output-traits“ gilt, dass die Entwicklungskosten, restriktive bzw. selektive/diskriminierende Regularien und das vorhandene know-how eine Beschränkung auf zunächst nur wenige Arten erforderlich machen, deren Eigenschaften aber in vielen Bereichen verändert werden können. Dazu im folgenden einige Beispiele:

5.1. Kohlenhydrate

Nach Willmitzer (1999) müssen zur Zeit etwa 80% der 20-30 Millionen Tonnen industriell gewonnener Stärke chemisch oder physikalisch behandelt werden. Gezielte Modifikationen im Kohlenhydratstoffwechsel könnten diesen Anteil drastisch verringern. So haben Amylosefreie Kartoffeln -durch Transformation und Mutation- bereits Marktreife erlangt. Die Mutanten werden in Europa auf mehreren tausend Hektar angebaut. Interessanterweise konnte der Amylopektingehalt nicht auf die gleiche Weise gentechnisch durch eine „antisense“-Strategie reduziert werden, allerdings wurden bereits Modifikationen der Kettenlänge von Amylopektin realisiert (Heyer et al. 1999). Die Isolation eines Gens für die Phosphorylierung von Amylopektin und dessen erfolgreiche Expression in Mais (dem größten Stärkelieferanten) könnte z.B. die industrielle Phosphorylierung von Maisstärke überflüssig machen. Die Produktion von Fruktanen (β -2,1/ β -2,6-verbundene Fructose Polymere, z.B. Inulin, Levan) in Zuckerrüben gelang erstmals Sévenier et al. (1998). Die anti-onkogene Wirkung von Fruktanen ist mehrfach dokumentiert (Rowland et al. 1998; Roberfroid und Delzenne 1998, zitiert nach Heyer et al. 1998). Zuckerrüben stellen wegen der hohen Konzentration von Saccharose ein preiswertes Produktionssystem dar und ermöglichen den Einsatz von Fruktanen und Fruktoligosacchariden Süßstoff, Zucker- oder Fettersatz in der Lebensmittelindustrie.

Auf der anderen Seite sind viele Aspekte der Kohlenhydratsynthese und ihrer funktionalen und energetischen Kopplung an andere Stoffwechselprozesse (Protein- und Fettsäuresynthese) noch ungeklärt. Ungeklärt ist ebenfalls, ob und wenn ja, wie sehr der großflächige Anbau von Kartoffeln und Zuckerrüben mit veränderten Kohlenhydraten das Verbreitungsmuster von Pathogenen und bodenbewohnenden Mikroorganismen beeinflussen könnte.

5.2. Öle und Fettsäuren

Bereits 1995 wurde die erste Pflanze (Raps) mit gentechnisch verändertem Fettsäuremuster in den USA kommerzialisiert. Nach Murphy (1996, 1999) finden etwa 80% der jährlich 75 Millionen Tonnen pflanzlicher Öle in der Nahrungsmittelproduktion und -industrie Verwendung. Nur etwa 15 Millionen Tonnen werden für die Produktion von Oleochemikalien genutzt (Petrochemikalien aus fossilen Ölen sind preiswerter). Als wesentliche Ziele gentechnischer Modifikationen nennt Murphy (1999):

- das Verhältnis gesättigter zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren,
- langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (Vorläufer der Prostaglandine).

Problematisch ist die Modifikation der Fettsäuremuster dann, wenn die Bedeutung der Veränderung für die Membranfunktion (z.B. Kühltoleranz, Permeabilität) oder die Synthese von Botenstoffen (z.B. Signaltransduktion bei Pathogenbefall) unbekannt ist. Darüber hinaus können unerwartete Rückkopplungsmechanismen unerwünschte Folgen haben. So weisen Weber et al. (1997) auf die Folgen der Aufnahme von Petroselinensäure hin, die im Tierexperiment zu Leberanomalitäten und einer Inhibition der Arachidonsäure-Synthese (C₂₀, 4-fach ungesättigte Fettsäure) geführt haben. Obwohl eine ganze Reihe von Enzymen des Fettsäure-Metabolismus identifiziert und charakterisiert sind, scheinen noch weitere Regulationsmechanismen (z.B. intrazelluläre Verteilung) zu existieren, die das Spektrum möglicher Manipulationen freier und membrangebundener Fettsäuren einschränken. So beschreibt Murphy (1999) die Induktion der β -Oxidation und des Glyoxylat-Zyklus durch Produktion exotischer Fettsäuren in Raps, die dann während der Samenbildung spezifisch abgebaut werden.

Nach Kolodziejczyk und Shahidi (1999) lassen sich eine ganze Reihe von Spezial-Ölen durch Manipulation des Fettsäure-Stoffwechsels in Raps produzieren. Der „Designer-Raps“ liefert Fette und Fettsäuren für therapeutische Zwecke, Kosmetika, Polymere, Farben und Detergentien.

5.3. Synthetische Polymere

Auf die Möglichkeiten der Manipulation des Kohlenhydratstoffwechsels bzw. den Möglichkeiten zur Produktion kohlenhydratbasierender Polymere ist oben verwiesen worden (Heyer et al. 1999). Aber auch völlig synthetische Polymere lassen sich in Pflanzen produzieren. So gelang die Produktion von aliphatischen Polyestern (PHA, Polyhydroxyalkanoate), wie Polyhydroxy-Buttersäure (PHB), durch Transfer bakterieller Gene (Acetoacetyl-CoA Reduktase und Polyhydroxyalkanoat-Synthase) in Pflanzen. Durch die Expression der entsprechenden Gene in Chloroplasten konnten Ausbeuten von bis zu 10 mg/g FG erzielt werden (Poirier 1999). Neben PHB, dem ersten synthetischen Polymer, vermarktet Monsanto unter dem Namen Biopol® ein Ko-Polymer (Poly-[hydroxybutyrat-hydroxyvalerat]). Die Synthese gelang jüngst auch in *Arabidopsis thaliana* und Raps. Neben diesen extrahierbaren Polymeren konnte auch gezeigt werden, dass die PHA-Produktion in Faserpflanzen, wie Baumwolle, die Wärmekapazität der Fasern ändern kann.

Protein-basierende Polymere sind ein weiteres Feld. Seidenähnliche Fäden der Spinnennetze, Elastin, Kollagen, Keratin - all diese zeigen ein großes Spektrum einzigartiger Eigenschaften. Guda et al. (2000) beschreiben die Produktion eines biologisch abbaubaren pro-

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

tein-basierenden Polymers (PBP) mit hoher Homologie zu menschlichem Elastin. Problematisch ist hier allerdings, dass die Menge des in den Pflanzen produzierten „Elastins“ stark von der Menge verfügbarer Aminosäuren abhängt und die sich wiederholenden Sequenzblöcke oft zu einem Translationsabbruch führen (Poirir 1999).

5.4. Vitamine

Die Aufklärung der Synthese-Wege für die Produktion von Vitaminen resultierte in einer ganzen Reihe von Versuchen, den Vitamin-Gehalt zu erhöhen (Hirschberg 1999). So entstehen Carotinoide als Produkte des Isoprenoid-Stoffwechsels. Ein erster Schritt zur Carotinoid-Synthese ist die Dimerisierung von Geranyl-Geranyl-Diphosphat durch die Phytoen-Synthase (PSy). Erste Versuche an Tomaten führten allerdings zu Zwergwuchs oder dem Abschalten der Carotinoid-Biosynthese (aus dem Isoprenoid-Stoffwechsel leitet sich ebenfalls die Synthese von Gibberellinen ab, wichtigen Phytohormonen). Schließlich konnte die Arbeitsgruppe um Ingo Potrykus 1997 erstmals den Gehalt an Phytoen in Reis erhöhen³. Phytoen ist ein lineares C40-Isoprenoid. Diese haben anti-oxidative Eigenschaften, leiten aber auch durch endständige Ringbildung zu den Carotenen über (z.B. β -Carotin) und damit zu Retinol (Vitamin A).

Epidemiologische Untersuchungen belegen einen Zusammenhang zwischen der Menge aufgenommenem Vitamin E und dem Risiko an Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu leiden. Der Synthesweg dieses fettlöslichen Vitamins mit antioxidativer Wirkung ist weitgehend aufgeklärt. Eine bis zu 80-fache Steigerung des wirksamen α -Tocopherol-Gehaltes in transgenen *Arabidopsis*-Samen gelang Shintani und DellaPenna 1998 (zitiert nach Hirschberg 1999) durch Über-Expression der γ -Tocopherol-Methyl-Transferase.

5.5. Xenogene Proteine

Die Produktion von Fremdproteinen für medizinische und industrielle Zwecke in Pflanzen umfaßt ein breites Spektrum (Hood und Jilka 1999). Allerdings haben bisher nur wenige Produkte Marktreife erlangt. Dazu gehören z.B. Avidin für diagnostische Zwecke (das erste kommerzielle xenogene Protein aus Pflanzen) und die β -Glukuronidase (vor allem für die experimentelle Biologie). Allerdings führen eine Reihe von Firmen wie ProdiGene, Meristem-Therapeutics, Monsanto, Agracetus, Pioneer, CropTech Corporation und BIOCEM bereits Versuche im Freiland durch.

Neben den oben genannten Proteinen werden in Pflanzen dabei hauptsächlich hydrolytische Proteine (Lipase, Glukanase, Xylanase; Herbers et al. 1996), aber auch Kollagen, α -Antitrypsin, Laktoferrin, Serum-Albumin und andere produziert. In Tabelle 5 sind etwa ein Dutzend verschiedener menschlicher Blut- und Milchproteine und therapeutisch wirksamer Peptide aufgeführt.

³ Dieser Reis ist jetzt unter der Bezeichnung „Golden Rice“ bekannt und steht, nach Klärung diverser patentrechtlicher Probleme, nun vor seiner Vermarktung.

5.6. Sekundär-Metabolite

Vitamine, Mineralstoffe und eine ganze Reihe von pflanzlichen Metaboliten sind essentielle Bestandteile der Nahrung. Die Pflanzenzüchtung hat zwar Hohertragsorten produziert, der Gehalt an Spurenelementen war aber selten oder nie ein Zuchtziel, obwohl eine hohe Variabilität im Gen-Pool der untersuchten Pflanzen eine erfolgreiche Züchtung ermöglichen sollte. Aber auch gentechnische Methoden zur Identifikation und Manipulation entsprechender Biosynthesewege sind geeignet, die ernährungsphysiologische Wertigkeit zu erhöhen (DellaPenna 1999, „Nutritional Genomics“). Da die positive Wirkung von vielen Sekundärmetaboliten aus epidemiologischen Untersuchungen abgeleitet wurde, ist häufig die Wirkkette und oft auch die Struktur der Substanz selbst noch unbekannt. Alkaloide, Karotinoide, Glykoside, Glukosinolate und Phytoöstrogene bilden da keine Ausnahme. DellaPenna (1999) beziffert die Anzahl der Substanzen in den einzelnen Klassen auf mehr als 100 Glukosinolate, 200 Phytoöstrogene, mehr als 700 Karotinoide und über 4000 phenolische Substanzen.

Gentechnische Veränderungen führen vielleicht nicht zu grundsätzlich neuen Substanzen und das Verteilungsmuster schwankt auch bei nicht-transgenen Pflanzen von Spezies zu Spezies, von Sorte zu Sorte und auch umweltbedingt. Über entsprechende mittel- oder langfristige Auswirkungen gibt es allerdings nur wenige Daten (über ein „metabolite-profiling“ wird noch zu sprechen sein). Welche Dimensionen eine Risikodiskussion in diesem Bereich erreicht, mag an der Debatte über mögliche ökotoxikologische Wirkungen von Arzneimitteln deutlich werden (vergl. Römbke et al. 1996). Vor allem synthetische Östrogene -auch Xenööstrogene genannt- wie sie in der Östrogen-Substitutions Therapie, als Wachstumshormon in der Tierproduktion oder als Kontrazeptivum Verwendung finden, werden mit der Geschlechtsbestimmung bei Fischen oder gar mit dem Aussterben aquatischer Organismen in Zusammenhang gebracht. Das Auftauchen dieser als „endokrine disruptors“ bezeichneten Substanzen ist dabei nicht notwendigerweise auf synthetische Substanzen beschränkt. Vor allem Cytochrom-P450 abhängige Enzyme, z.B. die Isoflavon-Synthase (IFS), können nach Einschätzung von Humphreys und Chapple (2000) größere Bedeutung erlangen. Isoflavonoide sind vor allem bei Leguminosen zentrale Instrumente der Pathogen-Abwehr (z.B. Phytoalexine, wie die Pterocarpane Pisatin und Medicarpin). Dabei transformiert IFS z.B. Naringenin in Genistein, das wegen seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Estradiol auch als Phytoöstrogen bezeichnet wird. Nun unterstützen epidemiologische Daten eine Korrelation zwischen hohem Konsum an Phytoöstrogenen (z.B. in Soja-Produkten) und einer geringeren Anfälligkeit für Osteoporose, Herzerkrankungen sowie Brust- und Prostatakrebs. Andererseits wirken sich Phytoöstrogene negativ auf die Fertilität von Säugern aus.

Problematisch sind insgesamt alle Veränderungen komplexer Stoffwechselwege (Dixon und Arntzen 1997), deren feedback- und andere Regulationsmechanismen nur unzureichend verstanden sind (Dixon 1999). Dazu gehört auch die Veränderung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen. Sowohl bei Getreiden als auch bei Leguminosen wird eine Steigerung der ernährungsphysiologischen Wertigkeit der Speicherproteine durch Anreicherung bestimmter Aminosäuren angestrebt. Allerdings kann dies zu Veränderungen im Gesamtproteingehalt sowie zur Anreicherung von Aminosäuren bis auf ein toxisches Niveau führen.

5.7. Management

Unter der optimistischen Annahme, dass die oben beschriebenen Möglichkeiten durch Beseitigung technischer Probleme ausgeschöpft werden (können), wirft dies die Frage nach einem wirksamen Management auf. Die Entwicklung verdeutlicht, dass die meisten Modifikationen an nur wenigen, agronomisch interessanten Nutzpflanzen durchgeführt werden. Ist eine Erweiterung des Nutzpflanzen-Spektrums nicht zu erwarten, werden weiterhin exotische oder vernachlässigte Nutzpflanzen durch "optimierte" ersetzt. Neben einer weiteren Reduktion der genetischen Vielfalt landwirtschaftlich und industriell genutzter Arten, ist die zentrale Frage, wie diese wenigen Arten mit ihren dann jedoch vielen verschiedenen Eigenschaften gekennzeichnet und differenziert werden können (Murphy 1996). Während vor Jahrhunderten eine Vielzahl von Pflanzen einer Vielzahl von Zwecken diente, führen Pflanzenzüchtung, Pflanzenbau und vielleicht auch bio- und gentechnische Verfahren eher zu einer geringen Anzahl von Pflanzen mit einer Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften. Dies ist nicht zuletzt auf eine Globalisierung der Märkte und die damit verbundene Notwendigkeit zurückzuführen, allgemein verbindliche Produktions- und Qualitätsstandards zu entwickeln. In beiden Fällen ist das Wissen um diese Eigenschaften und deren Kennzeichnung (über Form, Farbe und Geruch oder entsprechende Etiketten) von entscheidender Bedeutung und eine der wichtigsten Strategien zur Risikominimierung.

6. Zuständigkeiten

Ein wichtiger Punkt, der bereits in der Aufgabenstellung angeschnitten wurde, ist die Frage, wer für die Bewertung der Produkte zuständig ist und welche Aufgabenabgrenzung diese Stellen besitzen. An dieser frühen Stelle sei bereits darauf hingewiesen, dass die Bewertung und Zulassung pharmazeutischer Produkte keine Aufgabe der Behörden ist, die für die Genehmigung von Freisetzung und „In Verkehr bringen“ transgener Organismen zuständig sind. Allerdings ist in der Regel auch bei der zulassenden Behörde eine Produktionsgenehmigung vorzulegen - entweder für die Freisetzung der transgenen Pflanze oder den Betrieb einer gentechnischen Anlage.

Darüber hinaus ist vorwegnehmend festzustellen, dass die Produktion von Vakzinen, hochwirksamen Peptiden, therapeutisch nutzbaren Proteinen und Peptiden oder Antikörpern nach augenblicklichem Sachstand weder auf großen Flächen noch unter unkontrollierten Bedingungen erfolgen wird. Die Produktion wird auch nicht den bekannten landwirtschaftlichen Praktiken folgen und nur in engen vertraglichen Grenzen und unter restriktiven Bedingungen möglich sein. Diese Annahme läßt sich schon allein aus dem Wert dieser Pflanzen (bzw. der Produkte) sowie aus den notwendigen Bedingungen für die Qualitätssicherung dieser pharmazeutischen Produkte ableiten. Allerdings greifen die Zulassungsbehörden für Arzneimittel natürlich erst bei der Zulassung, nicht bei der Produktion ein. Eine Umweltverträglichkeitsprüfung ist, wenn überhaupt, nur für das Produkt und nicht für die Produktion vorgesehen.

Fraglich ist, in welchem Kontext Freisetzungen überhaupt erfolgen. Bei kommerzieller Produktion handelt es sich nicht mehr um eine experimentelle Freisetzung. Andererseits ist von einem (großflächigen?) Anbau in der Regel erst dann auszugehen, wenn die transgenen

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

Pflanzen „In Verkehr“ gebracht wurden. Dieses kann allerdings nur unter definierten und restriktiven Bedingungen erfolgen (z.B. lokal und zeitlich begrenzt, besondere Ansprüche an Kennzeichnung und Trennung). Es ist also für die Beurteilung entsprechender Risiken von Bedeutung, ob die „Freisetzung“ bzw. das „In Verkehr bringen“ überhaupt ein realistisches Szenario darstellt und inwieweit die bisherige Praxis angepaßt werden muß.

In Deutschland ist das Bundesamt für Arzneimittel (BfArM) für die Zulassung von Human-Fertigarzneimitteln zuständig, die neu auf den Markt kommen sollen. Für homöopathische Produkte ist unter bestimmten Umständen eine Registrierung vorgesehen. Die Zulassung erfolgt, wenn der Antragsteller die pharmazeutische Qualität, die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit nachweisen kann. Naturgemäß handelt es sich dabei um eine Risiko/Nutzen-Abschätzung. Rechtliche Grundlage für die Zulassung ist das Arzneimittelgesetz (AMG, hier: § 21 Abs. 1 bzw. § 38 Abs. 1 für die Registrierung).

Für die Zulassung von Seren, Impfstoffen, Testallergenen, Testseren und Testantigenen sowie für Blutzubereitungen ist das Paul-Ehrlich-Institut (PEI) in Langen verantwortlich. Tierarzneimittel werden vom Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) zugelassen. Neben diesem nationalen Verfahren erlaubt die Europäischen Kommission noch zwei weitere Zulassungsverfahren.

Das „zentrale Zulassungsverfahren“ basiert auf der EG-Richtlinie (Council Regulation) EEC 2309/93, welche 1993 die „European Agency for the Evaluation of Medicinal Products“ (EMA) in London etablierte. Seit 1995 arbeitet EMA und nach Auskunft des PEI durchlaufen vor allem die „modernen“ Arzneimittel das zentrale Zulassungsverfahren. Für medizinische Produkte aus biotechnologischen Verfahren ist dieses zentrale Verfahren obligatorisch. Entsprechende Anträge werden von EMA binnen 210 Tagen entschieden. EMA und sein „Management Board“ (bestehend aus je 2 Vertretern der Mitgliedsstaaten, 2 Vertretern der Europäischen Kommission und zwei Vertretern des Europäischen Parlaments) wird dabei durch zwei wissenschaftliche Komitees unterstützt: das „Committee for Proprietary Medicinal Products“, CPMP, für Marken-Arzneimittel und das „Committee for Veterinary Medicinal Products“, CVMP, für Tierarzneimittel. Jedes Komitee setzt sich aus je 2 Vertretern der Mitgliedsstaaten zusammen.

Sowohl für human- als auch für veterinärmedizinische Produkte verlangt EMA eine Produktionsgenehmigung. Das heißt, der Antragsteller muß darstellen, dass eine Zustimmung der entsprechenden Behörden nach der Richtlinie 90/220/EEC erfolgt ist. Der Berichtsersteller von EMA soll sich dabei mit den zuständigen nationalen Behörden konsultieren (in diesem Falle dem RKI) und garantieren, dass die Umwelt-Folgenabschätzung („environmental risk assessment“, ERA) bei den entsprechenden Behörden eingeht. Der ERA-Bericht (hier des RKI) geht dann zurück und wird entweder dem CVMP oder dem CPMP zur Kommentierung vorgelegt. ERA und vor allem die Zustimmung zum „In Verkehr bringen“ bleibt damit ein integraler Bestandteil des gesamten Zulassungsverfahrens, muß vom Antragsteller vorgelegt werden und wird von den nach 90/220/EEC zuständigen Behörden und EMA begutachtet. Auf Grund der geringen Erfahrungen sind für die Zulassung humanmedizinischer Produkte -anders als bei veterinär-medizinischen Produkten- noch keine „Standard Operation Procedures“, SOPs, formuliert worden. Es sind auch noch keine „notes for guidance“ im Zusammenhang mit Pharmazeutika produzierenden Pflanzen bekannt.

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

In den USA sieht die Situation nicht wesentlich anders aus. Dort haben, zumindest bis 1998, etwa 90% der Freisetzungen mit solchen transgenen Pflanzen stattgefunden, die entweder Antikörper, Vakzine oder andere pharmazeutischen Proteine produzieren. Im allgemeinen sind drei Behörden an der Genehmigung zur Freisetzung transgener Pflanzen beteiligt. Das USDA-APHIS reguliert die Freisetzung transgener Pflanzen unter dem „Federal Plant Pest Act“ (FPPA), dem „Plant Quarantine Act“ (PQA) sowie dem „Virus, Serum and Toxin Act“ (VSTA). Eine Abschätzung möglicher Folgen für die Umwelt wird in seltenen Fällen bei der Genehmigung einer Freisetzung („permit for release into environment“) oder bei einem Antrag auf Erteilung eines deregulierten Status („petition for determination of non-regulated status“) durchgeführt. Die „Environmental Protection Agency“ (EPA) reguliert die Freisetzung unter dem „Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act“ (FIFRA), dem „Toxic Substances Control Act“ (TSCA) sowie dem „Federal Food, Drug and Cosmetic Act“ (FDCA), der ebenfalls Grundlage für die regulierende Aktivität der Food and Drug Administration“ (FDA) ist. Schwierig ist die Einordnung jedoch z.B. bei der Regulierung der Freisetzung von transgenen Fischen mit Wachstumshormongenen. Mangels entsprechender Regularien fällt der transgene Fisch unter den FDCA, wird also vom „Centre for Veterinary Medicine“ des FDA als Medikament behandelt (ähnlich dem rekombinanten Rinderwachstumshormon, rBST).

Zur Produktion von Biologika und pharmazeutischen Produkten in Pflanzen existiert eine gemeinsame Arbeitsgruppe mit Vertretern der FDA, dem Plant Protection and Quarantine (PPQ) Department des USDA und dem USDA Center for Veterinary Biologics (CVB). Innerhalb der FDA sind mehrere Abteilungen vertreten, darunter sind das Center for Drug Evaluation and Research (CDER), das Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), das Center for Food Safety and Nutrition (CFSAN) und das Center for Veterinary Medicine (CVM). Nach Auskunft von Charles Arntzen⁴ ist die US-Regierung zur Zeit dabei, Regularien für die Produktion makromolekularer Medikamente zu entwickeln, vermutlich wird dabei das FDA eine entscheidende Rolle spielen. Es sind nur sehr wenige Bewertungen von Umweltrisiken („environmental assessments“, EAs) durchgeführt worden. Eines zur Produktion von transgenem, humanes Hämoglobin produzierendem Mais, wird im zweiten Teil dieses Gutachtens diskutiert. Für die meisten Fälle jedoch wurde kein EA oder ein "generisches" EA erstellt, welches die gängigsten Daten zu Wachstum, Biologie und Verbreitung der transgenen Pflanze enthält⁵. Die für eine Abschätzung der Wirkung des Transgens notwendigen Informationen zum Transgen selbst waren als vertraulich („confidential business information“, CBI) klassifiziert.

7. Einordnung in die Risikodebatte: Kategorisierung von GMO/GVP/LMO

In der Folge werden, in Anlehnung an die Sprache der Biodiversitätskonvention bzw. des Cartagena-Protokolls, gentechnisch veränderte Organismen als „LMO“ bezeichnet. Dies soll alle lebenden Organismen beschreiben, deren Erbmaterial dauerhaft und gezielt verändert

⁴ Prof. Dr. Arntzen ist „Distinguished Professor“ an der Arizona State University und Projektleiter am Boyce Thompson Institute.

⁵ Dieser Ansatz ist möglich, da die Freisetzungen räumlich und zeitlich begrenzt waren. Eine unkontrollierte Ausbreitung oder eine Wirkung über die eigentliche Fläche hinaus wird durch ein geeignetes Management verhindert.

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

wurde – in einer Weise wie es die „natürlichen“ Prozesse nicht vermögen. D.h., Mutanten und Art- oder Gattungsbastarde zählen nicht dazu, so sie auch in der Natur entstehen können.

Die konventionelle Definition beschreibt mit den Begriff „Risiko“ als Produkt aus Eintrittswahrscheinlichkeit und Schadenshöhe. Die (natur-)wissenschaftliche Analyse bedient sich dabei auch spezifischer Modelle, Experimente und Analogien als Instrumente einer möglichst umfassenden und genauen Abschätzung dieser beiden Parameter. Die Genauigkeit hängt dabei naturgemäß von der Menge und Aussagekraft der dadurch gewonnenen Daten ab. Nicht nur in der öffentlichen Diskussion geht der Begriff des „Risikos“ jedoch über diese Definition hinaus, da Analyse und Bewertung oft synonym gebraucht wird.

In der Bewertung hat das „Risiko“ einen sehr subjektiven Charakter. Dies hat mehrere Gründe:

- Unterschiedliche Gruppen oder Individuen (z.B. Produzenten, Konsumenten) innerhalb einer Gesellschaft bewerten Nutzen und Risiko unterschiedlich,
- Risiken entstehen auf unterschiedlichen Feldern (z.B. Sozio-Ökonomie, Politik, Handel, Ökologie, Gesundheit),
- Risiken entstehen aus Aktionen oder ihrer Verhinderung,
- Gesamtrisiken resultieren aus der vergleichenden Bewertung der möglichen Alternativen, so sie berücksichtigt werden können.

Der Wahrnehmung eines Risikos liegen also unterschiedliche Erwartungen und Motive oder Perspektiven zu Grunde. Eintrittswahrscheinlichkeit und mögliche Schadenshöhe lassen sich naturgemäß nicht mit absoluter Genauigkeit belegen oder ableiten. Das Ausmaß der Ungenauigkeit erwächst in der Regel aus einem Mangel an Daten. Neben methodischen Problemen (z.B. Meßgenauigkeiten, Anzahl parametrischer Daten, Zeithorizonte, Informationsgehalt) spielen auch die resultierenden Kosten eine große Rolle. Folgerichtig hat die Bewertung eines Risikos schon einen Einfluß auf die Risikoanalyse selbst. Mit anderen Worten: schon der Aufwand, mit dem ein mögliches Risiko analysiert wird, hängt entscheidend davon ab, wie das Risiko vor dem Hintergrund des möglichen Nutzens bewertet wird. Eine wissenschaftlich fundierte Risiko-Analyse ist zwar von einer politischen Entscheidung zu differenzieren, diese nimmt aber bereits faktisch Einfluß und resultiert in der Regel aus einer gesellschaftlichen Legitimation der Entscheidungsträger.

Bisher gibt es keine Originalarbeiten, die spezifische oder einzigartige Risiken transgener Pflanzen dokumentieren oder nachweisen. Publikationen, die auf besondere Risiken verweisen, haben entweder keine experimentelle und damit nachprüfbare Grundlage (z.B. die Diskussion über die Auswirkung des 35S-Promotors, Ho et al. 1999 oder der Zusammenhang zwischen LMOs und Infektionskrankheiten, Ho et al. 1998) oder sie sind experimentell unzureichend (z.B. transgene Lektin-Kartoffeln, Ewen und Pusztai 1999, Bt-Toxin in Mais und Monarch-Falter, Losey et al. 2000). Aus Sicht einer wissenschaftlich fundierten Risikoanalyse ist daher eine Kategorisierung von LMOs insgesamt nicht zu rechtfertigen. Auch die Berücksichtigung des Vorsorgeprinzips, ausgelöst durch einen Mangel an Information, läßt diese Kategorisierung nicht zu. Einen Mangel an Information gibt es auch bei vielen konventionellen Anwendungen, selbst beim organischen Landbau oder der Produktion „biologisch-organischer“ Nahrungsmittel. Auch hier gibt es keine Langzeit-Studien, die sich z.B. mit den Folgen der dauerhaften Aufnahme kontaminierender pflanzenpathogener Viren und Bakterien auseinandersetzen. Nur wenig ist über die langfristigen Folgen des Einsatzes organi-

GENE-FARMING: 1. EINFÜHRUNG

scher Dünger -der ggf. tier- und humanpathogene Keime enthält- bekannt. Diese Daten wären aber zu erheben, will man zu einer auf Daten beruhenden Risikobewertung kommen. Abgesehen davon kann eine Risikoanalyse nur am Produkt und seinen Wechselwirkungen mit der belebten und unbelebten Umwelt erfolgen.

Offensichtlich ist auch das Konzept der „Familiarität“ („concept of familiarity“, OECD) nur ein Werkzeug für eine wissenschaftlich fundierte Folgenabschätzung. Die Feststellung der „Familiarität“ ist daher nicht mit einer Risikobewertung zu verwechseln. Im Zusammenhang mit der Risikobewertung von LMOs ist der Begriff der "wissenschaftlichen Unsicherheit" durch den Begriff "neu" oder "ungewohnt" substituiert. Dies führt in der Folge zu einer prozeßorientierten Kategorisierung. Mit anderen Worten, der Auslöser für eine Kategorisierung von LMOs ist in erster Linie die Tatsache, dass die LMOs neu sind⁶. Ein holistischer Ansatz bei der Risikobewertung muß jedoch auch die Frage nach den Alternativen beantworten. Nicht nur, ob diese existieren, sondern auch, welche Folgen ihr Einsatz hat. Dies beinhaltet selbstverständlich auch die Beurteilung des „Nicht-Einsatzes" eines Produktes. Der Einsatz von Bt-Mais (z.B. Reduktion des Insektizidverbrauchs), DDT zur Bekämpfung der Malaria (z.B. Reduktion der Malaria-Inzidenz in Sri Lanka, Swaziland und Madagaskar um eine Größenordnung) oder die grüne Revolution sind brauchbare Beispiele für die Notwendigkeit, auch diese Frage zu beantworten.

Die Diskussion um Risikoanalyse, Risikobewertung und Kategorisierung ist notwendig, da diese in Europa, den USA und anderen Regionen der Welt durchaus unterschiedlich geführt wird. Transgene, Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen stellen durchaus eine neue Qualität dar. Zwar lassen sich Parallelen zur Bewertung transgener Nutzpflanzen der ersten Generation (Herbizidresistenz und Resistenz gegen biotische Stressoren) ziehen, allerdings sind die Größenordnung der Anbaufläche, die mögliche landwirtschaftliche Praxis und die „Zielorganismen“ völlig anders. Auch Ergebnisse und Erfahrungen zum Eintrag pharmazeutischer Produkte in die Umwelt könnten berücksichtigt werden. Produkte und Produktionswege lassen sich jedoch nicht mit denen Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen vergleichen.

Das bisher gesagte schließt eine genaue Risikoanalyse und -bewertung transgener Pflanzen nicht aus – gerade hier sind entsprechende Analysen wegen der zur Verfügung stehenden Methodik oft überhaupt erst durchführbar. Es ist aber wichtig darauf hinzuweisen, dass sich die LMO-Kategorisierung hier aus der Aufgabenstellung ableitet. Eine vergleichende Risikoanalyse und Risikobewertung ist vor allem deshalb schwierig, weil in den entsprechenden Bereichen (z.B. „natürliche“ Neu-/Rekombination von phytopathogenen Viren) keine Daten erhoben worden sind. Mit der Beschreibung möglicher Risikoszenarien ist daher noch keine Risikobewertung präjudiziert.

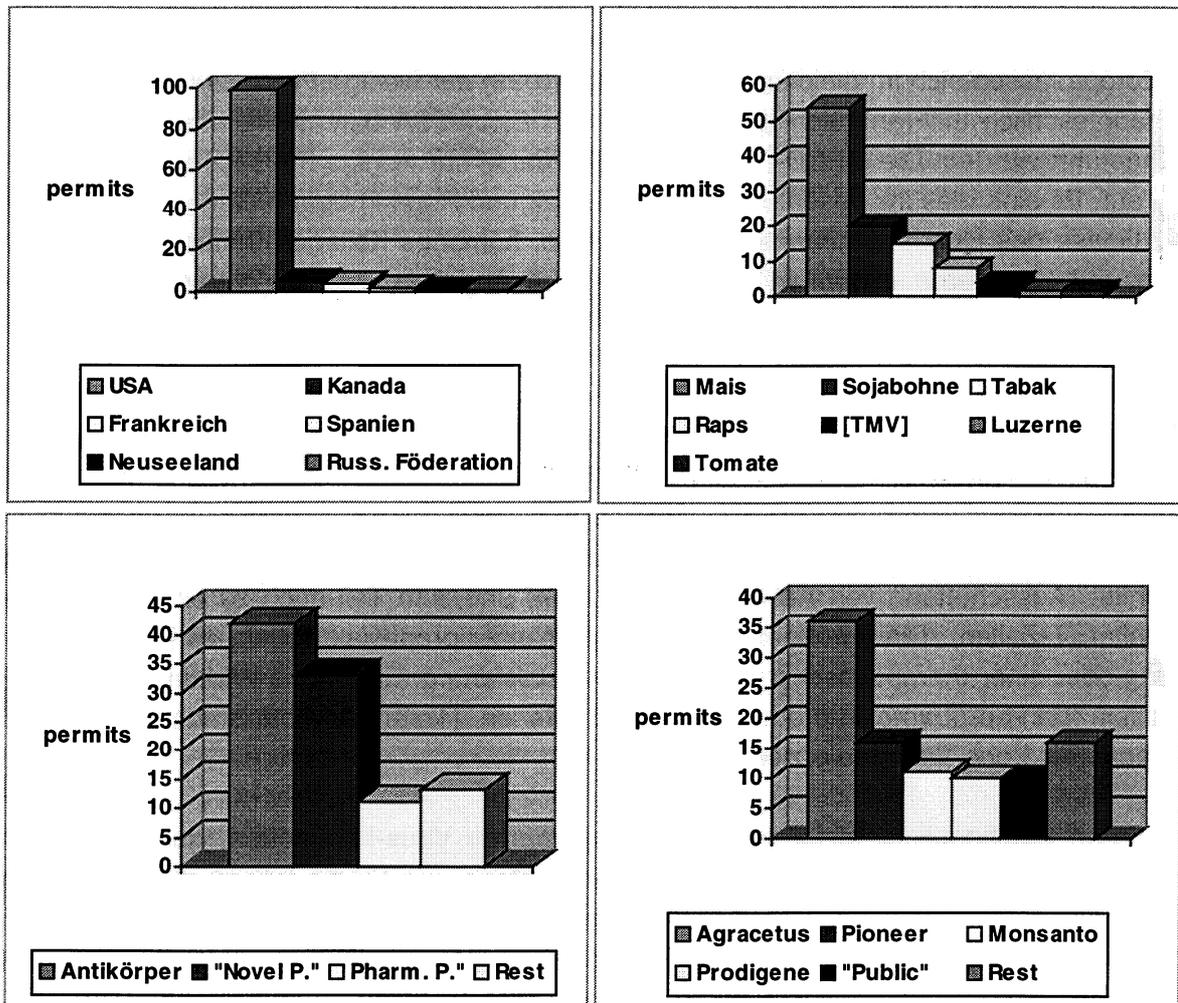
⁶ Dies führt schließlich auch zum Cartagena-Protokoll zur Biologischen Sicherheit. Dieses Protokoll, das erste unter der Biodiversitätskonvention, ist völkerrechtlich verbindlich und tritt in Kraft sobald es von der fünfzigsten Partei („Party“) ratifiziert worden ist.

Kapitel 2: Stand der wissenschaftlichen Entwicklung

1. Orientierung

1983 zeigten Fraley et al. erstmals die stabile Expression bakterieller Gene in Pflanzenzellen. 1985 dann produzierten Horsch et al. die ersten transgenen Pflanzen - und damit auch die ersten „xenogenen“ Proteine in Pflanzen. Hiatt (1989) und Düring et al. (1990) gelang die Produktion monoklonaler Antikörper und Mason et al. (1992) konnte mit der erfolgreichen Expression des Hepatitis B Oberflächen-Antigens das erste Vakzin in Pflanzen produzieren. Über die ersten klinischen Tests der Wirkung von in Pflanzen produzierten und oral applizierten Vakzine berichten Tacket et al. (1998, 2000).

Abbildung 1: Graphische Darstellung der Freisetzungen transgener, Pharmazeutika produzierender Pflanzen; ol: Verteilung nach Ländern, or: Verteilung nach Nutzpflanze, ul: Verteilung nach Eigenschaft; ur: Verteilung nach Antragsteller (public: Universität)



Nach einer Recherche in der OECD-Datenbank zu Freisetzungsexperimenten (1990-1998) hat es in den Mitgliedsstaaten (letzte Aktualisierung: April 1999) mehr als 100 Freisetzungen mit transgenen Pflanzen gegeben, die medizinisch nutzbare Produkte produzieren. Die Deklaration kann jedoch irreführend sein. Darunter fallen z.B. auch Kollagen oder Enzyme (Lipase, Peroxidase), die nicht eindeutig als medizinisch-pharmazeutische Produkte

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

identifiziert werden können. Ohne genaue Kenntnis der Genkonstrukte ist also nicht klar, um welche pharmazeutisch wirksamen Produkte es sich handelt. Die graphische Aufschlüsselung der OECD- und APHIS-Daten mag deshalb einen ersten Eindruck vermitteln, aufschlußreicher ist der im folgenden vermittelte Überblick über Forschungsarbeiten. Aus den Datenbanken lassen sich -zumindest für den Zeitraum bis 1998- folgende Schlüsse ziehen:

- rekombinante Antikörper sind ein sehr wichtiges erstes Produkt aus Pflanzen (von 1993-1998 sind in den USA 43 Anträge gestellt worden, einer wurde abgelehnt, bis auf sechs Anträge wurden alle von der Firma Agracetus gestellt; Holzmann 1994),
- es wurden überwiegend Nutzpflanzen eingesetzt, die auch in der Nahrungs- und Futtermittelproduktion verwandt werden,
- die meisten Freisetzungen fanden in den USA statt,
- nur etwa 10% der Freisetzungen wurden von öffentlichen Forschungsinstitutionen durchgeführt,
- für 75% der Freisetzungen sind die sicherheitsrelevanten (= interessanten) Informationen als vertraulich gekennzeichnet,
- die Bezeichnung „pharmaceuticals“ ist unzureichend und irreführend,
- bislang ist keine lizenziertes Produkt aus transgenen Pflanzen auf dem Markt.

Für Europa lassen sich im gleichen Zeitraum (bis 1998) nur wenige Freisetzungen ermitteln, die hauptsächlich in Frankreich und Spanien von BiocemSA bzw. Meristem Therapeutics durchgeführt wurden. Die OECD-Datenbank führt dabei nur wenige Freisetzungen in Frankreich auf. Es sind dies im wesentlichen Mais, Tabak und Raps in denen Gene für die gastrische Lipase des Hundes, humanes α -1-antitrypsin, humanes Kollagen, humanes Serumalbumin und Lactoferrin exprimiert werden. Genaue Angaben über die verwendeten Konstrukte, Freisetzungsfelder und Folgenabschätzungen waren auch von Firmenseite nicht zu erhalten.

2. Vakzine/Impfstoffe

Die meisten bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten führen zu einer humoralen Immunität (Ausschüttung von Antikörpern, B-Zellen) und zum Teil auch zu einer zellulären Immunität (T-Zellen). Dies eröffnet die Möglichkeit einer prophylaktischen, aktiven Immunisierung oder einer therapeutischen, passiven Immunisierung. Eine hohe Wirkung wird dabei vor allem bei bei Exotoxin-produzierenden Bakterien (Tetanus, Botulismus, Gasbrand, Diphtherie etc.) und Virämien erzielt.

Zu den traditionellen, meist parenteral⁷ applizierten Virus-Impfstoffen, gehören durch geeignete Behandlung inaktivierte Erreger (Tot-Impfstoffe, wie für die japanische Enzephalitis oder die equine Enzephalomyelitis) oder Lebendimpfstoffe (meist durch mehrere artfremde Passagen attenuierte Viren: z.B. Röteln/Rötelnembryopathie; Poliomyelitis; Zeckenenzephalitis; Gelbfieber; Tollwut; Pocken). Eine ähnlich wirksame Immunisierung läßt sich gegen Exotoxine erzielen (Anatoxine/Toxoide bei Tetanus oder Diphtherie). Weitaus weniger wirksam sind Impfstoffe gegen Bakterien selbst (z.B. Cholera oder Typhus).

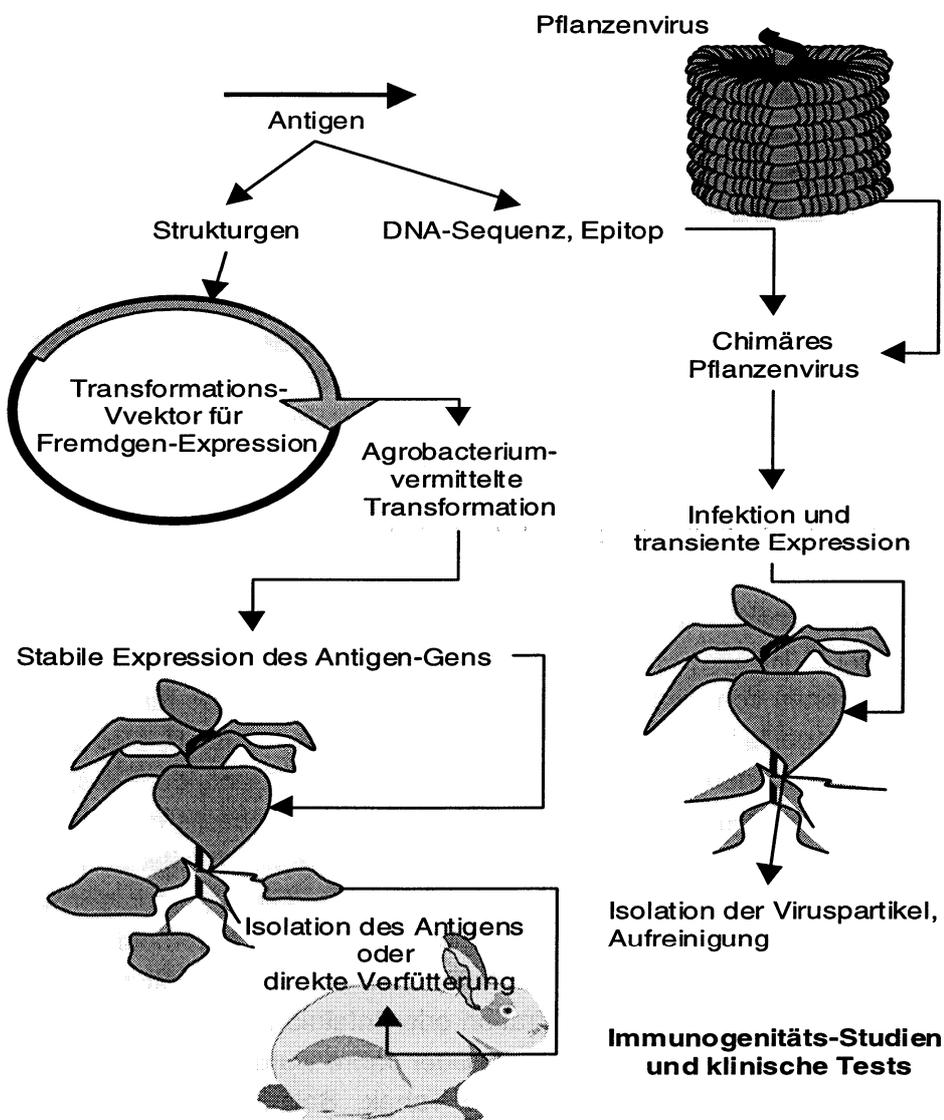
In der Regel sind eine Immunantwort generierende Lebendimpfstoffe wirksamer, bergen aber auch die Gefahr unbeabsichtigter Infektionen. Rekombinante Vakzine hingegen können

⁷ parenteral: Applikation eines Vakzins unter Umgehung des Magen-Darm-Traktes, also meist durch intravenöse, subkutane, intraperitoneale oder intramuskuläre Injektion.

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

aus gentechnisch attenuierten Viren oder auch nur aus antigenen, nicht-infektiösen Untereinheiten bestehen. Darüber hinaus können sie oral (erstmal beschrieben durch Haq et al. 1995) bzw. über die Nahrung aufgenommen werden. Wichtig ist dabei, inwieweit die Impfstoffe eine Immunreaktion über die Schleimhäute auslösen können („mucosal immune system“, MIS). Die Erkennung und Aufnahme des Antigens aus dem Intestinalraum durch die M-Zellen des MIS und dessen Transport und Prozessierung in den darunterliegenden Zellschichten, löst in der Regel eine durch T-Helfer Zellen unterstützte lokale und systemische Immunantwort unter Ausschüttung von IgA-Antikörpern aus.

Abbildung 2: Strategien für die Produktion von Vakzinen/Antigenen in Pflanzen. Das gesamte, das Antigen kodierende Strukturgen wird a) ausgestattet mit regulatorischen Sequenzen und stabil in Pflanzen exprimiert oder b) nur die das Epitop kodierende Sequenz wird in das Hüllprotein eines phytopathogenen Virus eingebaut und nach Infektion, transient, exprimiert. Die Vakzine müssen entweder reisoliert und aufgereinigt werden oder verbleiben im Pflanzenmaterial zur Lagerung oder auch Applikation - „eßbare Vakzine“ (nach Mason und Arntzen 1995).



Vor allem dort, wo eine Vermehrung oder Passagen schwierig sind (z.B. Hepatitis) oder wo Schleimhäute befallen werden, ist die Aktivierung des MIS wünschenswert. Es zeigt sich auch, dass die orale Applikation der Vakzine oft effizienter ist als eine parenterale Applika-

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

tion. Für die Verwendung rekombinanter Vakzin-Peptide oder Untereinheiten ist dieses Verfahren aber oft ineffizient. Aufgereinigte Virusfraktionen, deren Hüllproteine antigene Peptide präsentieren, lösen meist eine nur geringe Immunantwort aus. Geeigneter ist daher die Verwendung nicht infektiöser Virus-ähnlicher Partikel („virus-like particles“, VLP). Größere Mengen werden für die intranasale Applikation oder die Verfütterung von Vakzinen in Nahrungsmitteln (siehe oben: „edible vaccines“) benötigt. Hier stellt die Produktion in Pflanzen eine echte und sichere Alternative zur Produktion in bakteriellen, tierischen oder humanen Zellkulturen dar (Ma und Vine 1999; Mahon 1998; Mason et al. 1999; Cramer et al. 1999). Nach Hood und Jilka (1999) ist jedoch, wie bei der Verwendung von Tot-Impfstoffen, die dauerhafte Immunisierung ein Problem. Dies ist auf die geringere Quantität des Impfstoffs als auch auf die fehlende zelluläre Immunität zurückzuführen.

Abgesehen von der Notwendigkeit sichere/risikoärmere Produktionssysteme zu entwickeln, ist für die Frage, welche Impfstoffe aus Pflanzen für die Sicherheitsforschung relevant sind oder werden können, auch ein Blick auf die möglichen ökonomischen Vorteile von Interesse. Für die Tierproduktion werden zur Zeit Kosten von weniger als 2-3 Euro pro Dosis/Impfung veranschlagt. Dort werden sich in Pflanzen produzierte Impfstoffe vermutlich nur dann durchsetzen, wenn die Kosten für die Produktion und vor allem die Aufreinigung minimiert werden können. Vielversprechend und kostengünstig wäre dabei die Verabreichung von multivalenten Vakzin-Präparaten durch Futtermischungen, z.B. durch Mischung verschiedener Vakzin-produzierender Mais oder Sojabohnen Linien.

Das Konzept, rekombinante Vakzine in Pflanzen zu produzieren ist erstmalig von Mason et al. (1990) und von Curtiss und Cardeneau (1990) realisiert worden. BioSource Technologies (jetzt LSBC, Large Scale Biology Corporation, www.lsbc.com) hat mit Geneware® eine Familie von Pflanzenviren entwickelt, die als Expressionssysteme dienen und bereits bis 1996 schon 16 rekombinante Pflanzenviren freigesetzt (Dixon und Arntzen 1997). Neben LSBC hält die Firma Prodigene (www.prodigene.com) eine Reihe von Patenten zur Produktion von Vakzinen und zur Nutzung viraler Expressionssysteme.

Die Arbeitsgruppe um Charles Arntzen klonierte die kodierende Region des Hepatitis B Virus Oberflächenantigens (HBsAg) unter die Kontrolle eines 35S-Promotors und erzielte in Tabak Vakzinkonzentrationen von etwa 0,1% der löslichen Proteine - eine für die praktische Anwendung noch zu geringe Menge. Neben der Verwendung als Impfstoff, also zur Auslösung einer Immunantwort, können rekombinante Vakzine (inklusive anti-ideotypischer Antikörper) auch zur Behandlung von Autoimmunerkrankungen (z.B. Diabetes melitus), zur Immuntherapie (z.B. bei B-Zell-Lymphomen) und zur transplantationsbegleitenden Therapie (z.B. Minimierung der Abstoßungsreaktion) eingesetzt werden. Die Struktur der Vakzine reicht von kleinen Peptidsequenzen in phytopathogenen Viren, über komplette Proteine, scFv-Fragmente bis zu VLPs. Produziert werden die Vakzine in Pflanzen entweder transient (transiente Expression nach Agrobakterien-Infiltration oder Infektion der Pflanze mit virulenten, chimären Pflanzenviren) oder stabil. Anfang der 90er Jahre wurden zunächst Hepatitis-, Tollwut-, Cholera- und Cytomegalievirus-Vakzine in Tabak, Salat, Tomate und Kartoffel exprimiert. Erste Tierversuche gab es mit gereinigten Vakzin-Präparationen (aus stabil transformierten Pflanzen) gegen Hepatitis, bakterielle Diarrhöe, Norwalk-Virus und Maul- und Klauenseuche Virus (FMDV). Die Applikationen erfolgten oral oder parenteral. Erst 1993 klonierten Usha et al. erstmalig ein Antigen-Gen eines tierpathogenen Virus in einen Pflanzenvirus und Brennan et al. (1999) dokumentierten die Immunogenität von chimären Virus-Parti-

keln bei intranasaler oder oraler Applikation an Mäusen. Vor allem „tobacco mosaic virus“ (TMV), „cowpea mosaic virus“ (CPMV), „tomato bushy stunt virus“ (TBSV) und „alfalfa mosaic virus“ (AIMV) sind dabei bisher verwendet worden (Walmsley und Arntzen 2000).

Es kann durchaus angenommen werden, dass die Bedeutung rekombinanter Vakzine und der Bedarf an einer schnellen und ausreichenden Produktion deutlich zunehmen wird, vor allem wegen der steigenden Mobilität und höheren Populationsdichten der Menschen (Stichwort: Mega-Städte und Flugverkehr). Steigende Populationsdichten spielen allerdings auch in der intensiven Tierhaltung und in geschützten Wildtierreservaten eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Verbreitung neuer Infektionskrankheiten (Daszak et al. 2000). 12 von 30 aufgelisteten Biotechnologie-Patenten im Bereich „Healthcare Products and Medicine“ (Patent Abstracts/Biotechnology Advances 18: 249ff.) beschreiben die Produktion rekombinanter Vakzine. Hinzu kommt, dass geringere Produktionskosten sowie das zunehmende Wissen über (Fehl-) Funktion und Modulation des Immunsystems die Anwendung immer attraktiver machen bzw. neue Anwendungsbereiche eröffnen. Im folgenden sollen einige Beispiele einen etwas detaillierteren Einblick in die Produktion und Funktionsweise rekombinanter Vakzine aus Pflanzen vermitteln. Dabei wird zunächst auf Vakzine für tierische Systeme eingegangen.

Der erste Bericht über eine induzierte Immunität durch Injektion des Saftes einer transgenen Pflanze stammt von Carillo et al. (1998). Die Autoren klonierten das VP-1 Gen des FMDV (Maul- und Klauenseuche Virus) in transgene Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*) und immunisierten mit dem Pflanzensaft Mäuse durch Injektion in die Bauchdecke. Das Serum zeigte einen hohen Antikörper-Titer gegen FMDV und die Mäuse besaßen einen soliden Schutz. Ein Jahr zuvor hatten Dalsgaard et al. (1997) erstmalig gezeigt, dass ein in Pflanzen produziertes Vakzin zur Immunisierung des Zielorganismus benutzt werden kann. Die Autoren identifizierten eine kurze antigene Sequenz des „mink enteritis virus“ (MEV, Parvo-Virus), klonierten diese in einen infektiösen cDNA-Klon des „cowpea mosaic virus“ (CPMV) und infizierten damit Kuherbsen. Schon die einmalige, subkutane Injektion von etwa 1 mg des chimären CPMV führte zu einem soliden Schutz des Nerzes gegen die Infektion mit MEV.

Ein drittes Beispiel -und eine weitere Strategie- dokumentierten Modelska et al. (1998). Die Autoren nutzten das Hüllprotein eines pflanzenpathogenen Virus („alfalfa mosaic virus“, AIMV), um dort antigene Peptide verschiedener Tollwut-Virus Stämme und des HIV einzubauen. Dieses Konstrukt wurde dann in das Genom von TMV eingebaut. *In vitro* Transkripte wurden zur Infektion von *Nicotiana benthamiana* und Spinat (*Spinacia oleracea*) verwandt. Neben einer Immunantwort nach Injektion des gereinigten chimären Viruspartikels, demonstrierten die Autoren auch eine zumindest partielle Immunisierung von Mäusen nach Fütterung der Virus-infizierten Spinatblätter. Wie die Tabelle 2 zeigt, sind bereits eine ganze Reihe von Impfstoffen gegen Viren und Bakterien-Toxine in Pflanzen produziert worden, die sich z.T. auch schon in der Erprobung befinden.

Für die Anwendung am Menschen sieht das Bild nicht wesentlich anders aus. Auch hier gibt es eine ganze Reihe von Verfahren und Anwendungen und nach Walmsley und Arntzen (2000) laufen zur Zeit 3 klinische Studien zur Verwendung von Vakzinen aus Pflanzen. Die folgenden Beispiele und die Tabelle 3 können dabei jedoch nur eine Momentaufnahme sein. So nutzten Zhang et al. (2000) das Hüllprotein-Gen des TBSV, um das p24-

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

Protein des HIV zu produzieren. Wie auch schon für TMV und CPMV gezeigt, konnte auch hier das Epitop so eingebaut werden, dass die Virulenz des TBSV und die Fähigkeit zur systemischen Ausbreitung erhalten blieb.

Tabelle 2: Beispiele der Produktion rekombinanter, in der Veterinärmedizin einsetzbarer Vakzine in Pflanzen (nach Hood und Jilka 1999, verändert und ergänzt)

Krankheit	Ursache	Vakzine/ Antigen	Pflanze	Vektor	Applikation/ Dosis	Vakzine- menge	Status	Quelle
Tollwut	Rabies-Virus	24 kDa Glyco-Protein	Tabak, Spinat	AIMV-TMV re-komb. Virus	ip 150 µg oral 1 mg Futter, 7 g	n.b.	L, partielle Immunität	Modelska et al. 1998
Enteritis Virus, Nerz	Parvo-Virus	VP2 Kap-Prot. Epi. 17aa	<i>Vigna unguis</i> , Kuherbse	CPMV [CVP] transient	sc 100 µg sc 1 mg Nerz	n.b.	L, partielle Immunität	Dalsgaard et al. 1997
MKS	FMDV	VP1 FMDV	<i>A. thaliana</i>	<i>Agrobacterium</i>	ip 3 x 0,5 ml Maus	n.b.	L, Immunität	Carillo et al. 1998
Diarrhöe, Ferkel	TGEV, Virus	Spike Protein	Mais	<i>Agrobacterium</i>	Futter, 3 mg	0,4 % GLP	klin. Studie	nicht publ. Hood et al.
Diarrhöe, Ferkel	TGEV, Virus	Spike Protein	<i>Pichia</i>	Hefe, Plasmid	Futter, 3 mg	n.b.	L, IgG/IgA	nicht publ. Hood et al.
Diarrhöe, Ferkel	TGEV, Virus	Spike Protein	Luzerne, Tabak	<i>Agrobacterium</i>	ip, Futter	n.b.	L	Tuboly et al. 2000
-.-	Futter	Avidin	Mais	Plasmid, PB	14 mg, Mäuse	2,5 % GLP IgG, IgA	L, IgG/IgA	nicht publ. Hood et al.
Diarrhöe, Rinder	BVDV, Virus	BVDV E2 Glykoprot.	Gerste	Plasmid, PB	n.b.	n.b.	L	IMFC ¹ , 23
Haemor. Fieber, Kaninchen	HDV, Calicivirus	HDV, VP60	Kartoffel	<i>Agrobacterium</i>	sc, im	n.b.	L, TV, IgA, HDV-resistent	Castanon et al. 1999
PRR-Syndrom	PRRSV, Virus	ORF5	Tabak	<i>Agrobacterium</i>	n.b.	n.b.	n.b.	IMFC ¹ , 30
Orale Papillomatose	COPV, Virus	COPV L1	Tabak	<i>Agrobacterium</i>	n.b.	n.b.	n.b.	IMFC ¹ , 31

Abk.: AIMV: Alfalfa Mosaic Virus; BVDV: Bovine Viral Diarrhea Virus; COPV: Canine Oral Papilloma Virus; CPMV: Cowpea Mosaic Virus; FMDV: Foot and Mouth Disease Virus; in: intranasal; ip: intraperitoneal; iv: intravenös; KS1: klinische Studie, Phase 1; MKS: Maul- und Klauen Seuche; n.b.: nicht beschrieben; or: oral; ORF: Open Reading Frame; PRRSV: Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus; sc: subkutan; TGEV: Transmissible Gastroenteric Virus; GLP: Gesamtgehalt an löslichem Protein; TV: Tierversuch, m-Maus, r-Ratte, s-Schwein, L: Labor, experimentell; VKS: vorklinische Studien / ¹Beitrag während der "International Molecular Farming Conference", London, Kanada, 29. August - 1. September 1999, p=poster, w=keynote oder workshop Beitrag

Einen Schritt weiter ist man bei der Produktion von Vakzinen gegen den Karies-Versucher Nr. 1, *Streptococcus mutans*. Nach Ma (1999) und Wynn et al. (1999) ist ein in Pflanzen produziertes Vakzin in der klinischen Phase und mit einer Kommerzialisierung ist

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

innerhalb der nächsten 4-5 Jahre zu rechnen. Auch im Zusammenhang mit der Produktion oral zu applizierender Vakzine hat es schon einige wenige klinische Tests gegeben.

Hepatitis B Virus

Hepatitis B Viren haben eine sphärische Form und einen Durchmesser von etwa 42 nm. Stark antigen und im Blut zu finden sind jedoch VLPs mit etwa 22 nm Durchmesser, die sich aus dem Kapsidprotein zusammensetzen (Hepatitis B Oberflächen-Antigen, HBsAg). Das HBsAg-Gen wurde in Hefen exprimiert und war das erste zugelassene rekombinante Vakzin auf dem Markt. Mason et al. (1992) zeigten erstmalig die Produktion eines Antigens (des HbsAg) in Pflanzen und konnten auch nachweisen, dass die gebildeten VLPs ihre immunbiochemischen Eigenschaften behalten haben (allerdings wurden VLPs von 16 bis über 30 nm gefunden, die meisten aber in einem Bereich um 20 nm). In der Folge zeigten Thanavala et al. (1995), dass sich Mäuse durch Injektion mit HBsAg aus Tabak erfolgreich immunisieren ließen. Als Kontroll-Gruppe dienten Mäuse, die mit dem kommerziellen, rekombinanten Hefe-HBsAg immunisiert wurden. Das Antikörper-Ideotyp-Muster variierte etwas, allerdings waren die Reinheit des Antigen und das verwendete Adjuvanz nicht identisch. Mit beiden ließ sich aber eine B-Zell- und T-Zell-vermittelte Immunantwort induzieren. Dass das HBsAg auch nach oraler Gabe eine Immunantwort beim Menschen auslösen kann, zeigte schließlich Kapusta et al. (1999). Drei Probanden wurden mit insgesamt 350 g Salat in zwei Gaben immunisiert und zwei von ihnen zeigten nach 2 Wochen Antikörpertiter in einer Höhe, der eine Immunität gegen Hepatitis B vermitteln können sollte.

Norwalk-Virus

Tacket et al. (2000) haben das Kapsid-Protein des Norwalk-Virus (NV-CP) in Kartoffeln exprimiert und untersucht, ob die orale Aufnahme dieser Kartoffeln eine MIS-Antwort induziert. Die Expression des Kapsid-Proteins in einem Baculo-Virus/Insekten System führte zur Bildung von VLPs, die nach oraler Gabe eine Immunantwort beim Menschen auslösten (Ball et al. 1999). Die Expression in Kartoffeln und Tabak und die anschließende orale Verabreichung an Mäuse löste ebenfalls eine Immunantwort aus (Mason et al. 1996). Tacket et al. (2000) konnten in der klinischen Studie zeigen, dass 19 von 20 Probanden ebenfalls erhöhte IgG-Antikörpertiter zeigten, nachdem diese 1-3 Gaben von 150 g in verschiedenen Zeitabständen (bis 21 Tage) aufgenommen hatten. Die Nebenwirkungen der Einnahme roher Kartoffeln waren unabhängig davon, ob die Kartoffeln transgen waren oder nicht. Der Gehalt an NV-CP in den 150 g Portionen schwankte zwischen 215 und 751 µg und nur etwa 25-50% des NV-CP assemblierte in VLPs. Folgerichtig sind die erzielten anti-NV IgG-Titer wesentlich geringer als nach oraler Gabe von 250 µg gereinigtem NV-VLP oder nach Infektion mit dem NV zu beobachten ist (etwa 80 mal höher). Die Verwendung geeigneter starker und gewebespezifischer Promotoren, die Zugabe geeigneter Adjuvantien und ein höherer Anteil an VLPs sind nach Meinung der Autoren aber geeignet, „eßbare“ NV-Vakzine entscheidend zu verbessern.

E.coli LT-B

Den ersten klinischen Test mit einem „eßbaren“ Vakzin beschreiben Tacket et al. (1998). Sie produzierten die B-Untereinheit des hitzelabilen, Diarrhöe verursachenden *E.coli* Enterotoxins (*E.coli* LT-B, ETEC: enterotoxigenic *E.coli*) in transgenen Kartoffeln. Die Immunisierung erfolgte durch Gabe von 50-100 g transgener, roher Kartoffeln. Dies löste eine MIS-Antwort aus, die mit der vergleichbar ist, die durch die orale Applikation von 1 Million ETEC ausgelöst wird.

Neben diesen Pathogen-abgeleiteten Protein-Vakzinen gibt es auch DNA-basierende Vakzine. Vakzine auf DNA-Basis werden in die Zelle des Zielorganismus eingeschleust (direkt oder über virale Vektoren) und beginnen ein rekombinantes Antigen zu bilden. Auf diese soll, da sie im Rahmen von Freisetzung keine Rolle spielen, nicht eingegangen werden. Interessant ist jedoch eine weitere Klasse von Antigenen bzw. Vakzinen: solche die durch die transiente Produktion von anti-ideotypischen scFv-Antikörpern in TMV oder anderen phytopathogenen Viren hergestellt werden. McCormick et al. (1999), in einer Kooperation zwischen der Stanford University und Biosource (Vacaville, Ca, USA) stellten diesen Ansatz erstmals vor und berichteten über die erfolgreiche Expression eines Lymphom-spezifischen, anti-ideotypischen Antikörpers durch ein chimäres, Tabak infizierendes TMV. B-Zell-Lymphome haben die Eigenschaft, tumorspezifische Immunglobuline auf der Oberfläche zu exprimieren. Anti-ideotypische Antikörper werden in der Chemotherapie begleitend als Immunstimulantien eingesetzt, allerdings ist die Produktion recht aufwendig und langwierig. Das von McCormick et al. (1999) produzierte, tumor-spezifische scFv Vakzin war in der Lage, Mäuse selbst gegen eine lethale Dosis des Tumors (38C13 Maus B-Lymphom Tumor) zu schützen. Die Produktion tumorspezifischer Vakzine innerhalb von 4-6 Wochen eröffnet natürlich neue Möglichkeiten bei der Bekämpfung von B-Zell Tumoren. Klinische Tests sind für das Jahr 2001 vorgesehen.

Ähnliche Konzepte sind zum Beispiel bei der Bekämpfung von Hepatitis B induzierten Neoplasien möglich. Die Hepatitis B Infektion erhöht das Risiko an einem hepatozellulären Karzinom zu erkranken. Die Produktion und Anwendung eines kostengünstigen Hepatitis B Vakzins könnte dieses Risiko minimieren. Andererseits besteht für die meisten klinisch auffälligen Krebserkrankungen nur eine sehr eingeschränkte Möglichkeit prophylaktisch zu immunisieren (Mahon et al. 1998). Allerdings gibt es eben auch in der Immuntherapie -allein oder eine Chemotherapie begleitend- eine ganze Reihe von Möglichkeiten, wie am Beispiel von McCormick et al. (1999) deutlich wird.

Wie bereits angemerkt, erfordern Mobilität und Dichte der menschlichen Populationen in Zukunft die Produktion kostengünstiger, schnell zu produzierender und möglichst leicht zu transportierender und zu lagernder Vakzine. Nach Tacket und Mason (1999), Richter und Kipp (1999) und Mor et al. (1998) ist die Produktion „eßbarer“ Vakzine längst ein realistisches Konzept, auch wenn Letztere abschließend anmerken: "*Thus, much research still needs to be directed towards solving these and other problems before the world's children can be vaccinated with, for example, a spoonful of mashed transgenic banana.*"

Ohne den Anspruch auf Vollständigkeit zu erheben, kann festgehalten werden, dass in Tabak, Kartoffel, Salat, Lupine, Tomate und Spinat aktive Vakzine gegen Viren (Norwalk-, Tollwut-, Maul- und Klauenseuche-, Hepatitis-, Cytomegalie-Virus sowie TGEV und HIV) und Bakterien (*Vibrio cholerae*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *ET-E.coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) produziert wurden. Die für die Produktion ebenfalls zum Teil eingesetzten pflanzenpathogene Viren sind CPMV, TBSV, AIMV und TMV.

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

Tabelle 3: Beispiele für die Produktion rekombinanter, in der Humanmedizin einsetzbarer Vakzine in Pflanzen (nach Hood und Jilka 1999, verändert und ergänzt).

Krankheit	Ursache	Vakzine/ Antigen	Pflanze	Vektor	Applikation/ Dosis	Vakzine- menge	Status	Quelle
Lungenentzündung	<i>P. aeruginosa</i>	Peptide 10, 18, OMP-F	Kuherbse	CPMV, CVPs	subkutan	n.b.	L, TV-m, IgG	Brennan et al. 1999a
Opportun. Infektion	<i>S. aureus</i>	FnBP D2 Domäne	Kuherbse	CPMV, CPVs	In, or 400 µg Sc 20 µg	n.b.	L, TV-m, IgG/IgA	Brennan et al. 1999a/b
Cholera	<i>Vibrio cholerae</i>	CT-B-Toxin	Kartoffel	<i>Agrobacterium</i>	or 360 µg	<0,3 % GLP	L, VKS	Arakawa et al. 1998
Diarrhöe	<i>Escherichia coli</i>	Lt-B-Toxin	Kartoffel	<i>Agrobacterium</i>	Bis 1,1 mg, Nahrung	n.b.	IgG/IgA, TVs, KS1,2	Mason et al. 1998
Diarrhöe	Norwalk Virus	NV-Kapsid Protein	Kartoffel	<i>Agrobacterium</i>	n.b.	n.b.	L, IgG/IgA, TV-m, KS1,2	Walmsley & Arntzen 2000
B-Zell-Lymphom	verschieden	anti-ideotyp. scFv	Tabak	TMV	n.b.	20-60 µg/g FG, Blatt	L, TV-m	McCormick et al. 1999
Hepatitis B	Virus	OF-Antig.	Kartoffel, Tabak	<i>Agrobacterium</i>	oral, booster bei konv. Impfung	n.b.	TV-m, IgG/IgA KS 1,2	Walmsley & Arntzen 2000
Zytomegalie-Erkrankung	human. Zytomegalie Virus	Glykoprot. B	Tabak	<i>Agrobacterium</i>	n.b.	70-146 ng/mg GLP	L, immunolog. reaktiv	Tackaberry et al. 1999
AIDS	HIV	HIV VP3	N. bent.	AIMV-TMV rekomb. Vir.	n.b.	n.b.	L, immunolog. reaktiv	Yusibov et al. 1997
AIDS	HIV	HIV p24	Tabak	<i>Agrobacterium</i>	n.b.	n.b.	L, immunolog. reaktiv	IMFC ¹ p29
AIDS	HIV	HIV p24	Gurke, N. bent.	TBSV	n.b.	n.b.	L, immunolog. reaktiv	IMFC ¹ p29
Encephalomyelitis	Hepatitis, MHV, JHM	S-Protein, Epitop	Tabak	TMV	300-1.500 µg in, ip	n.b.	L, TV-m	Koo et al. 1999
Diabetes*	GAD	GAD	„low alkaloid“ Tabak, Kartoffel	<i>Agrobacterium</i>	oral, 1 mg/d	-	orale Toleranz, TV-m	IMFC ¹ w11, Ma&Jevnikar 1999
Diabetes*	GAD, Insulin	GAD, Insulin gekoppelt an CT-B	Kartoffel	<i>Agrobacterium</i>	oral, µg-Menge	-	L, TV-m, verzögerte kl. Sympt.	IMFC ¹ w35
Transplantat-Abstoßung*	Immunreaktion	MHC-II	Tabak	<i>Agrobacterium</i>	n.b.	1-2% GLP	L	Ma&Jevnikar 1999

Autoimmunerkrankungen*; Abk.: AIR: Autoimmunreaktion; CT-B: Cholera Toxin B; GAD: Glutaminsäure-Decarboxylase; KS1: klinische Studie, Phase 1; L: Labor; MAK: monoklonaler Antikörper; MHC: Major Histocompatibility Complex; TBSV: Tomato Bushy Stunt Virus; TV: Tierversuch, m-Maus, s-Schwein; VKS: vorklinische Studien; ¹Beitrag während der "International Molecular Farming Conference", London, Kanada, 29. August - 1. September 1999, p=poster, w=keynote oder workshop Beitrag

3. Rekombinante Antikörper

Hiatt (1989) und Düring et al. (1990) berichten erstmalig über die Produktion kompletter monoklonaler Antikörper in Pflanzen. Die Produktion von Antikörpern in Pflanzen („plantibodies“) ist neben dem Nutzen für therapeutische und diagnostische Zwecke (Ma 1995), auch für die Vermittlung von Pathogen-Resistenzen bei Pflanzen interessant (Schots et al. 1992).

Ein wesentliches Argument für die Produktion von Antikörpern sind die geringen Produktionskosten (nach Fischer et al. 1999, 2-10% der Kosten für die Produktion in *E.coli*). Wenn auch zu Beginn die Antikörper-Ausbeute noch relativ gering war, werden heute, durch Wahl geeigneter Promotoren und die Retention der Proteine im endoplasmatischen Reticulum, Konzentrationen im Prozentbereich des Gesamtproteingehaltes (GLP) erzielt.

Tabelle 4: Produktion rekombinanter, chimärer, gekoppelter oder anderweitig modifizierter Antikörper in Pflanzen

Antigen	Antikörper	Produktionssystem	Produktionsmenge	Anwendung	Status	Quelle
HSV-2 (Herpes genitalis)	MAK	Sojabohne stabil PB,	10 µg/g FG	Herpes Therapie	keine Läsionen, TV-m	Zeitlin et al. 1998
karzinoembryogenes Antigen	humaner scFv	Reis, Weizen, stabil PB, im Korn 5 - 10 Monate bei RT zu lagern	bis 30 µg/g FG	Diagnostik (CEA-Titer)	L	IMFC ¹ p14; Stoger et al. 2000
karzinoembryogenes Antigen	chimärer AK (Mensch/Maus)	Reis, stabil, PB	n.b.	Diagnostik (CEA-Titer)	L	IMFC ¹ p14
Herpes simplex 1 und 2	MAK	Mais, stabil, PB	n.b.	in Gel-Form, Herpes Therapie	n.b.	IMFC ¹ w19
humane Spermien	MAK	Mais, stabil, PB	n.b.	in Gel-Form, Kontrazeptivum	n.b.	IMFC ¹ w19
Karies, <i>Streptococcus mutans</i>	MAK, sekretiert	Tabak, AT	bis 300 µg, topisch	Prophylaxe, Zahnpaste	L	Ma et al. 1998
CEA	MAK	Tabak, TMV	n.b.	Diagnostik, CEA-Titer	VKS in Vorbereitung	Vaquero et al. 1999; Verch et al. 1998

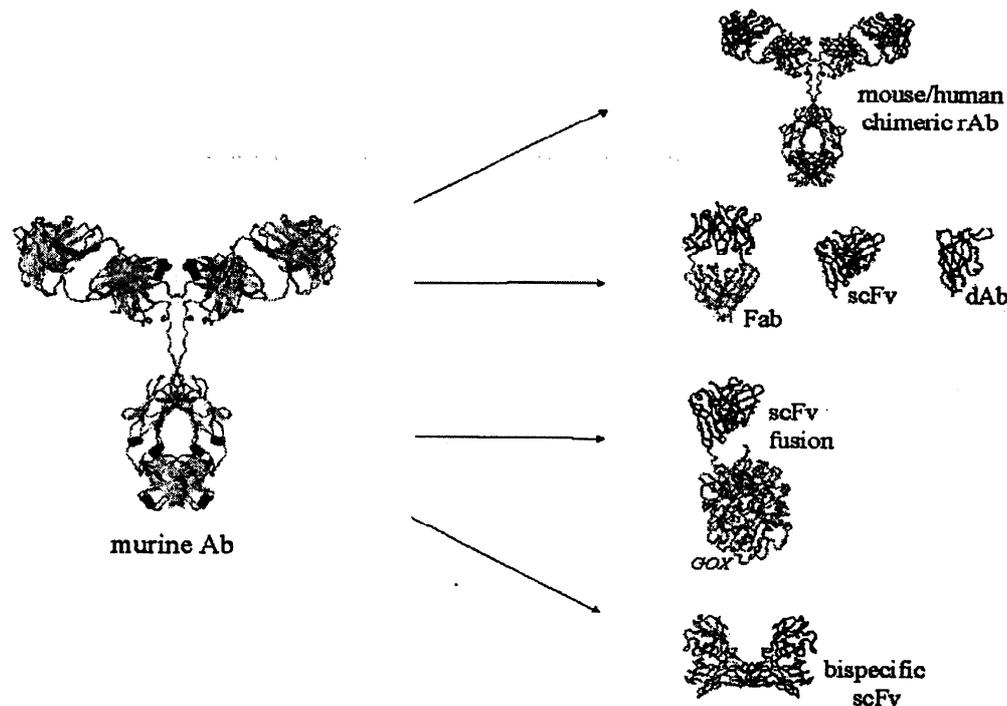
Abk.: AT: *Agrobacterium tumefaciens*; MAK: monoklonaler Antikörper; PB: particle bombardement; scFv: single chain Fv-Fragment; ¹Beitrag während der "International Molecular Farming Conference", London, Kanada, 29. August - 1. September 1999, p=poster, w=keynote oder workshop Beitrag

Die folgenden Beispiele aus der Literatur mögen einen Eindruck vermitteln, um welche Antikörper es sich handeln könnte (Tabelle 4). So berichten Stoger et al. (2000) über die Produktion von karzinoembryogen-spezifischen scFv-Antikörpern in Weizen und Reis, wie sie in der Therapie-begleitenden Diagnostik Verwendung finden. Die rekombinanten scFv-Fragmente werden in den Apoplasten und das endoplasmatische Retikulum sekretiert und lassen sich bei Raumtemperatur in den Samen für über 5 Monate lagern, ohne dass es zu einem signifikanten Verlust der immunbiochemischen Eigenschaften kommt.

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

Fiedler et al. dokumentierten bereits 1997, dass die Akkumulation von Antikörpern bis zu einer Konzentration von 3-7% des Gesamtproteingehaltes durch Retention im endoplasmatischen Retikulum von Tabak erreicht werden kann, ohne dass die immunologische Aktivität darunter leidet.

Abbildung 3: Antikörper-Formen und Antikörper-Engineering. Aus dem Antigen-bindenden Fragment (Fab), läßt sich das "single chain antibody fragment", scFv ableiten. Fusionen und bispezifische Antikörper lassen sich ebenfalls funktionell in Pflanzen exprimieren (Fischer et al. 1999)

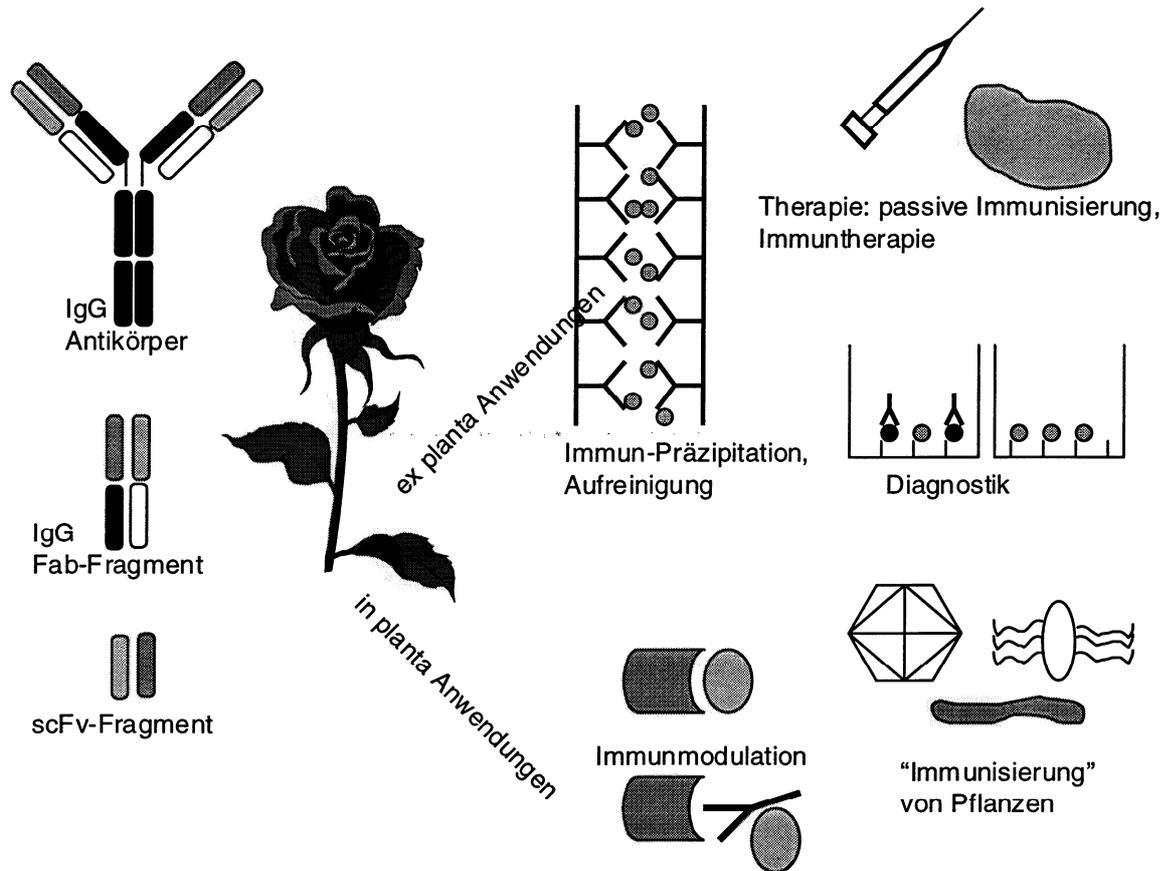


Problematisch für eine systemare Anwendung von „plantibodies“ sind die unterschiedlichen Glykosylierungsmuster bei Pflanzen und Säugern. So konnten Cabanes-Macheteau et al. (1999) feststellen, dass die N-Glykosylierungen eines IgG-Antikörpers in Tabak deutlich heterogener sind und einen hohen Gehalt an N-Glykanen des Mannose-Typs (daran Xylose/Fukose-Oligosaccharide) besitzen. Offensichtlich limitieren diese pflanzentypischen Glykosylierungen aber -in diesem Fall- nicht die Anwendung in der Immuntherapie. Gerade wenn hohe Expressionsraten verlangt werden, ist auch die Anpassung an das Muster der Kodon-Nutzung in Pflanzen erforderlich (siehe unten).

In den USA wurde die Freisetzung von Antikörper produzierenden Pflanzen Mitte der 90er Jahre vor allem von der Firma Agracetus (Monsanto Co., Middleton WI, USA) vorangetrieben. Um welche Antikörper es sich im einzelnen handelt, ist aus den Informationen der APHIS-Datenbank nicht immer ersichtlich. Es sind auch keine Daten oder Experimente zur Sicherheitsforschung dokumentiert. Erste klinische Tests mit in Pflanzen produzierten Antikörpern werden allerdings bereits durchgeführt. Die Firma Planet Biotechnology (Mountain View, CA, USA) entwickelte Antikörper gegen *Streptococcus mutans* in Tabak. Die Antikörper ließen sich erfolgreich gegen das Bakterium einsetzen, welches an der Bildung von Karies beteiligt ist (Ma 1999). Die Firma entwickelt zur Zeit eine ganze Reihe weiterer therapeutisch nutzbarer Antikörper gegen verschiedene Infektionskrankheiten des humanen Respirationssystems, der Haut, der Schleimhäute oder des Urogenitaltraktes.

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

Abbildung 4: Produktions- und Anwendungsmöglichkeiten rekombinanter Antikörper und Antikörperfragmente in transgenen Pflanzen (nach DeJaeger et al. 2000)



Agracetus dokumentierte die Effizienz der Antikörper-Produktion in Mais. Bis zu 5 Kilogramm eines pharmazeutisch reinen Antikörpers lassen sich pro Hektar Anbaufläche gewinnen⁸. Mit diesen Mengen sind auch breit angelegte Therapien, z.B. an Krebspatienten, kostengünstig durchzuführen (ausgehend von einem Bedarf im Gramm-Bereich pro Patient, muß man dann von einer hohen Anzahl kleinerer, kontrollierter Freisetzungsf lächen ausgehen). Zeitlin et al. (1998, in einer Kooperation zwischen der John Hopkins Universität und den Firmen ReProtect LLC, Protein Design Labs und Agracetus/Monsanto) produzierten erfolgreich Antikörper in Sojabohnen gegen vaginalen Herpes simplex 2 (HSV-2). Die Antikörper waren im Maus-Experiment therapeutisch wirksam und mit denen aus tierischen Zellkulturen in Stabilität und Effizienz vergleichbar. Wie bereits erwähnt, lassen sich scFv auch mit anderen Peptiden oder Proteinen fusionieren. Dies eröffnete die Möglichkeit eines gezielten Einsatzes cytotoxischer Substanzen -wie Ricin- in der Immuntherapie. Dieser Weg läßt sich natürlich auch in Pflanzen beschreiten, wo Sehnke und Ferl (1999) die weitgehend korrekte Prozessierung von Preproricin in Tabak nachweisen konnten. Die Produktion derart cytotoxischer Substanzen -auch gekoppelt an rekombinante Antikörper- und ihre Expression in Pflanzen kann selbstverständlich nur unter hohen Sicherheitsauflagen erfolgen. Dies sollte eine unkontrollierte Freisetzung ausschließen.

Die Produktion von Antikörpern, speziell Fab- und scFv-Fragmenten, in Pflanzen, zur Zeit neben Tabak vor allem Mais (Hood et al. 1999) und Kartoffel (Artsaenko et al. 1998), ist jedoch nicht auf therapeutische oder diagnostische Produkte beschränkt (siehe Abbildung 5).

⁸ Vaquero et al. (1999) berechnen den Bedarf für eine Tumor-Therapie der etwa 650.000 Darmkrebspatienten/Jahr in den USA auf etwa 6,5 – 130 kg (also 1 – 25 Hektar).

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

In der Literatur finden sich einige Beispiele zur Vermittlung von Virusresistenzen, wie z.B. für „tobacco mosaic virus“ (Zimmermann et al. 1998) und Tosspoviren (Franconi et al. 1999), „artichoke mottled crinkle virus“ (Tavladoraki et al. 1993), und sogar Nematodenresistenz (Baum et al. 1996). Zwar sind die Antikörper-Konzentrationen im Cytosol -dem Ort der Virus-Replikation- äußerst gering, für die Vermittlung einer Toleranz jedoch ausreichend (Casadevall 1998). Darüber hinaus konnten Schillberg et al. (2000, nach Fischer et al. 1999) zeigen, dass auch die Verankerung eines TMV-spezifischen Antikörpers in der Plasmamembran der Pflanzenzelle eine Resistenz gegen TMV vermittelt.

Bi-spezifische Antikörper, gegen verschiedene konservative Domänen eines Virus oder gegen verschiedene Viren, könnten eine echte Alternative zu den gängigen Pathogen-vermittelten Virusresistenzen sein. Darüber hinaus fassen Jaeger et al. (2000) noch eine ganze Reihe weiterer Anwendungsmöglichkeiten unter dem Begriff „Immunmodulation“ zusammen - vor allem für die Grundlagenforschung eröffnet sich damit ein interessantes Methodenspektrum. Gemeint ist damit die Modulation der Konzentration und/oder Aktivität eines Antigens durch die Expression spezifischer Antikörper. Antigene können dabei pflanzliche Stoffwechselprodukte, Phytohormone und andere Botenstoffe sein. Enzymaktivitäten könnten durch Bindung an allosterische oder reaktive Zentren oder durch Verhinderung der Bindung von Komplexen oder Kofaktoren/Effektoren moduliert werden. Wichtigste Voraussetzung: das „Zielobjekt“ hat antigene Eigenschaften. Die Expression von scFV-Fragmenten gegen Abscisinsäure (anti-ABA), Gibberelinsäure (anti-GA) oder Phytochrome sowie die Produktion eines anti-dihydroflavonol-4-reductase scFv-Fragmentes werden von DeJaeger et al. (2000) als Beispiele angeführt.

4. Produktionsverfahren

Die Produktionsverfahren selbst sind recht vielfältig und reichen von transienter Expression in durch Agrobakterien infiltrierte Blattmaterial (Fischer et al. 1999), über die transiente Expression durch phytopathogene Viren⁹ bis zur stabilen Expression in transgenen Pflanzen. Die Gruppe um Charles Arntzen ist zur Zeit dabei, Vakzine in Tomaten zu produzieren. Die Trocknung und Homogenisierung der Tomatenmasse erlaubt dann nicht nur eine bessere Kontrolle der Applikationsmenge, sondern damit wird auch die Verbreitung vermehrungsfähigen Materials außerhalb des Produktionsbereiches vermieden. Idealerweise werden für die Produktion samenlose und männlich sterile Pflanzen verwendet. An einer weiteren, recht exotisch anmutenden Variante arbeitet eine Arbeitsgruppe der Universität Wageningen (DLF, 26.9.2000). Die Gruppe um Prof. Dr. Eric Toissant stattete das GFP-Gen („green fluorescent protein“) mit einem pollenspezifischen Promotor aus und transformierte damit Nelken. Die „Ernte“ erfolgt über Bienen, die das GFP im Honig ansammeln. Nach Angaben von Prof. Toissant werden Konzentrationen von 1-2% erreicht. Natürlich erfolgt die Produktion unter diesen Umständen in einem Sicherheitsgewächshaus.

⁹ Die Hüllproteingene einiger Pflanzenviren werden modifiziert und exprimieren eine fremde DNA-Sequenz (z.B. ein HIV-Epitop) auf ihrer Oberfläche. Wirtspflanzen werden mit diesen chimären Viren infiziert, das Epitop gleichzeitig vermehrt. Die Pflanze selbst ist nicht transgen (siehe unter Kapitel 4, Risiko-Management).

5. Produktion von Milch- und Blutproteinen

Chong et al. waren 1997 die Ersten, die mit humanem β -Casein ein Milchprotein in Kartoffeln erfolgreich exprimierten. Die Menge war allerdings mit 0,01% des löslichen Proteins noch gering und das in Kartoffeln produzierte Protein war auch geringfügig kleiner als „Original“. Mittlerweile sind aber auch schon humanes Lactoferrin (bis 0,05%) und humanes α -Lactalbumin (Takase und Hagiwara 1998) in Kartoffeln, Tomaten bzw. Tabak produziert worden. Arakawa et al. (1999) denken dabei durchaus an eine verbesserte Rekonstitution menschlicher Milchprodukte in Nahrungspflanzen – als ergänzendes Nahrungsmittel sowie als Milch-Substitut. So ließe sich jährliche Bedarf von Vorschulkindern an β -Casein durch 0,5 Hektar transgene Kartoffeln decken.

Auch Blutproteine wurden bereits erfolgreich in Pflanzen produziert. Darunter auch menschliches Hämoglobin (siehe Hämoglobin in Mais, Seite 14). Die Produktion dieser Blutbestandteile und Blutersatzstoffe in Pflanzen minimiert natürlich die Kontaminationsgefahr. Im Vergleich zur Gewinnung aus tierischen Systemen, ist auch die Gefahr einer Infektion durch Pathogene, die die Spezies-Grenze überschreiten, weitaus geringer (vergleiche Diskussion zur Xenotransplantation). Neben Hämoglobin ist auch humanes Serumalbumin in der Testung.

Insbesondere aus den Tabellen 4 und 5 läßt sich deutlich der Übergang von Arzneimitteln über präventive Therapeutika bis zu „Nutraceuticals“ ablesen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der Bericht von Brower et al. (1998). Die Autoren beschreiben einige verwandte Produkte, die sich schon jetzt auf dem Markt befinden und die ggf. auch als Referenz für eine Risikoanalyse und Bewertung dienen können. Als Nahrungsmittel-Zusatzstoff für immundefiziente Patienten oder Frühgeborene produziert die niederländische Firma „Pharming“ Lactoferrin und Lysozyme in transgenen Tieren. Die Firma GalaGen (Arden Hills, MN, USA) produziert einen Kefir, der mit polyklonalen Antikörpern aus Rindern angereichert ist und die Firma InterNutria (Framingham, MA, USA) hat einen mit Serotonin angereicherten Schoko-Riegel entwickelt, der zur Abschwächung des prä-menstruellen Syndroms dienen soll. Als „medical food“ gekennzeichnet ist ein Getränk für Diabetiker, das in Pflanzen produziertes Insulin enthält (Metabolex, Hayward, CA, USA). Daneben sind bereits eine ganze Reihe von Produkten auf dem Markt (auch nicht-rekombinante), deren pflanzliche Inhaltsstoffe sehr stark von der „natürlichen“ Zusammensetzung abweichen. Dazu gehören vor allem Soja- und Rapsöle mit veränderten Fettsäuremustern, veränderten Sterolen und modifizierten Glukanen.

Als Indikator für weitere Entwicklungen mag die Zulassung von Bio-Pharmazeutika in den USA gelten sowie eine Analyse der bereits jetzt in transgenen Tieren und/oder Fermenten hergestellten rekombinanten Proteine und Peptide. Das „Tufts Center for the Study of Drug Development“ (CSDD) erstellt periodisch Trend-Berichte über die Entwicklung von Medikamenten durch entsprechende Umfragen bei den Pharma-Unternehmen. Solche Berichte dienen auch dazu, die Zulassungsbehörde, hier das FDA, über neue Produkte und Trends zu informieren und die Zulassungsverfahren ggf. zu beschleunigen (Reichert 2000).

GENE-FARMING: 2. STAND DER WISSENSCHAFT

Tabelle 5: Produktion von Milch- und Blutproteinen sowie therapeutisch wirksamer Proteine und Peptide in transgenen Pflanzen

Produkt	Produktionssystem	Anwendung	Status	Quelle
humanes Interleukin, IL-10	Tabak	„inflammatory bowel disease“, IBD	L	IMFC ¹ w33, p21
humanes Somatotropin	Tabak, bis 0,16 % GLP	Zwergwuchs, Turner-Syndrom	L, biolog. Wirkung in Ratten-Zelllinie	Staub et al. 2000, IMFC ¹ p6
humanes Lactoferrin	Reis, Tomate	Verbesserung der Eisen-Verfügbarkeit	L	IMFC ¹ p2, Salmon et al. 1998
humanes Lactoferrin	Kartoffel, Tomate, bis 0,05 % GLP	Verbesserung der Eisen-Verfügbarkeit	L	Chong, nach Arakawa et al. 1999
humanes β -Casein	Kartoffel, Tomate, bis 0,01 % GLP	? Immunstimulation, antibakteriell	L	Chong et al. 1997, Arakawa et al. 1999
humanes Hämoglobin	Tabak, Mais	Blutersatzstoff, Notfallmedizin	L, Freisetzung	Deryck et al. 1997, APHIS
humanes Serum Albumin	Kartoffel, Tabak, bis 0,025 % GLP	Blutkomponente	L, bis zu 1-2 % GLP möglich	Sijmons et al. 1990, nach Theissen 1999
humanes α -Lactalbumin	Tabak, bis 5 μ g/mg FG	Regulation der Laktose-Synthase	L	Takase und Hagiwara 1998
humanes Protein C, Serum-Protease	Tabak	Koagulation/Antikoagulation	L	Cramer et al. 1996
humane Glukocerebrosidase	Tabak, >1 mg/g FG	Gaucher-Krankheit	L, Freisetzung (?)	Cramer et al. 1996
Soja Ferritin	Weizen, Reis	Verbesserung der Eisen-Verfügbarkeit	L	IMFC ¹ p4
epiderm. Wachstumsfaktor beim Schwein, pEGF	Tabak, bis 0,12 % GLP	Peptidhormon	L	IMFC ¹ p15
humanes Interferon α 2b/ α 8	Kartoffel, 7-150 bzw. 28-218 IU/g FG	Peptidhormon	L, keine biolog. Wirkung	IMFC ¹ p18
IGF-I, „insulin-like growth factor“	n.b.	Ähnlichkeit mit Insulin	L	IMFC ¹ p20
Preproricin, Ricin	Tabak	cytotoxisches Therapeutikum	L	Sehnke und Ferl 1999
Hirudin-Oleoin-Fusionsprotein	Raps	Antikoagulanz	L	IMFC ¹ p40

FG: Frischgewicht; GLP: Gesamtgehalt löslicher Proteine, L: Labor; ¹Beitrag während der "International Molecular Farming Conference", London, Kanada, 29. August - 1. September 1999, p=poster, w=keynote oder workshop Beitrag

Die Verbesserung und Modifikation von Milch und Milchprodukten wird auch durch Züchtung/gentechnische Verfahren an Tieren angestrebt. Ziele sind dabei die Modifikation/Verbesserung von: Proteinmuster, Verarbeitung, Gesamtproteingehalte, Fettsäuremuster und Aminosäuremuster sowie die „Humanisierung“ von Kuhmilch (Bosce et al. 2000). Bisher hat dies allerdings noch zu sehr wenigen kommerziell erhältlichen Produkten geführt.

Kapitel 3: Folgenabschätzung, Risiko-/Sicherheitsbewertung

1. Orientierung

In diesem Kapitel soll die Frage beantwortet werden, *welche spezifischen Risiken aus einer zukünftigen, auch großflächigen, Freisetzung solcher Pflanzen für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt identifiziert werden können?*

Diese Frage impliziert bereits, dass es:

- a) spezifische Risiken gibt und
- b) dass es zu großflächigen Freisetzungen bzw. zum kommerziellen Anbau kommt. Unter diesen Prämissen ergibt sich dann die Frage, ob
- c) generalisierende Aussagen gemacht werden können.

Für eine Bewertung ist es jedoch wichtig zu prüfen, unter welchen Umständen eine Interaktion der betreffenden Pflanzen mit der Umwelt erfolgen kann. Zu differenzieren ist hier die Freisetzung, verstanden als experimentelles Stadium, und der Anbau, verstanden als kommerzielle Freisetzung einer marktzugelassenen Pflanze.

Natürlich stellen sich bei der Produktion von Bio-Pharmazeutika in Pflanzen andere Fragen als bei der Freisetzung herbizidresistenter Nutzpflanzen. Andererseits gebietet die Vielzahl der in Kapitel 2 dokumentierten Anwendungen eine Fall-zu-Fall Betrachtung, die sehr stark von der Pflanze und/oder dem Vektor (dem Produktionssystem), der Größe und Verteilung möglicher Anbauflächen, der biochemischen, immunbiologischen und physiologischen Eigenschaften der Produkte sowie der angedachten Verwendung (direkt oder nach Prozessierung und Formulierung) abhängt. Von entscheidender Bedeutung ist aber auch, unter welchen Umständen ein Anbau bzw. eine Freisetzung überhaupt möglich oder beabsichtigt ist.

Eine exakte Analyse möglicher Risiken erfordert, neben einer detaillierten Beschreibung der Anbaubedingungen, in jedem Fall ein Kenntnis der Wirkungsweise der in den Pflanzen produzierten Produkte – im Hinblick auf die Konsumenten und auch im Hinblick auf mögliche Nichtzielorganismen. Schwierig zu beantworten ist die Frage, wann die Risikoanalyse hinreichende Daten (informativ, genau, stabil, genug) ermittelt hat, die eine Bewertung ermöglichen und aus der sich dann Risikomanagement-Strategien ableiten lassen. Hier stellt sich die Frage nach möglichen Auslösern für entsprechend tiefergehende Analysen und detailliertere Untersuchungen bzw. nach einer möglichen Klassifizierung. Die Produktion von Strukturproteinen, z.B. die Produktion von Kollagen, wird möglicherweise *a priori* eine andere Bewertung erfahren als die von Peptidhormonen. Zwar darf zunächst angenommen werden, dass die Expression spezieller Botenstoffe, wie z.B. die der Interleukine, keine Auswirkungen auf die Pflanze selbst oder pflanzenfressende Insekten hat, weil ein entsprechendes endokrines System fehlt. Allerdings stellen diese Neurosekrete (Peptid- oder Protein-Hormone) die phylogenetisch älteste Stufe der humoralen Koordination dar und sind vor allem bei den Invertebraten (Wirbellose) verbreitet¹⁰.

¹⁰ Andererseits produzieren einige Pflanzen Östrogen-ähnliche Substanzen (Phytoöstrogene, s.u.) oder andere Steroide wie Ecdyson-Analoga zur Pathogenabwehr (Ecdyson: Häutungshormon bei Insekten, eines der wenigen Beispiele für Nicht-Peptid-Hormone).

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

Wird in einem solchen Fall eine großflächige Freisetzung oder ein Anbau beantragt, so wären Gefährdungskennung, Expositions- und Wirkungsanalyse sicherlich integrale Bestandteile einer Risikobewertung (in Analogie zum Eintrag von Pharmazeutika in die Umwelt, s.u.).

Die Frage ist auch, ob die Pflanze selbst oder deren Früchte als Medikament zugelassen und verwendet werden. Die größte Zukunft haben hier wahrscheinlich Vakzine produzierende Pflanzen. Zumindest geht Charles Arntzen (pers. Mitteilung) davon aus, dass mit einer Zulassung und Kommerzialisierung „eßbarer“ Vakzine in den nächsten 3-5 Jahren zu rechnen sein wird. An der Entwicklung bzw. Modifizierung entsprechender Regularien wird nach seinen Aussagen zur Zeit in den USA gearbeitet. Arntzen geht allerdings auch davon aus, dass großflächige Freisetzungen (oder ein „Anbau“) dieser „speciality crops“ nicht zu erwarten sind, sondern diese entweder unter kontrollierten Bedingungen im (zeitlich und räumlich beschränkten) Freiland oder in Gewächshäusern stattfinden werden. Zur Zeit stehen allerdings noch mehr die Fragen der Produkt- und Anwendungssicherheit im Vordergrund. Die Erarbeitung oder Überarbeitung entsprechender Regularien in den USA ist aber angedacht, da hier offensichtlich durchaus Lücken zu sehen sind. Für die meisten Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen erscheint also eine großflächige, unkontrollierte und weit vom Verarbeitungsort entfernte Freisetzung/Anbau eher unwahrscheinlich.

Konkrete Risikoszenarien sind daher zunächst schwer zu erarbeiten. So hat die Expression von Interferon-Genen in Pflanzen sicherlich wenig Einfluß auf die „Fitness“ der transgenen Pflanze. Die Wirkung auf bestäubende Insekten oder andere „Besucher“ mag ebenfalls marginal sein. Welche Folgen aber hätte die massenhafte, wenn auch gering dosierte, Applikation beim Menschen? Selbstverständlich muß daher eine Vermischung oder Verwechslung mit Nahrungspflanzen, legal oder illegal, auszuschließen sein. Darauf wird im Kapitel 4, Risiko-Management, noch detailliert eingegangen.

Auf der anderen Seite gibt es eine Reihe von Problemen bei der Expression von Proteinen und Peptiden in heterologen Systemen, die mittelbar auch einen Risikofaktor darstellen können. Eine unmittelbare Auswirkung auf die Umwelt auf Grund dieser Probleme ist dann nicht zu erwarten, wenn entsprechende Analyse- und Screening-Verfahren vorgeschaltet sind, so daß nur gut charakterisierte Pflanzenlinien (z.B. stabile Expression) ins Freiland gelangen. Eine Vielzahl von Informationen sollte sich hier auch aus klinischen Studien und entsprechenden Zulassungsverfahren gewinnen lassen, soweit diese dann auch der, die Freisetzung/Inverkehrbringen nach Gentechnikrecht genehmigenden Behörde zugänglich sind. Prinzipiell lassen sich zunächst drei Risiko-Gruppen identifizieren:

1. **Produktisiko 1.** Ein Risiko für Mensch und Umwelt durch die Anwendung des Produktes: Bio-Pharmazeutika sollen eine Wirkung auf Menschen und Tiere haben. Daraus lassen sich unmittelbare Risiken (z.B. Nebenwirkungen) ableiten, die schon vor der Zulassung, bei einer möglichen, auch experimentellen, Freisetzung berücksichtigt werden können. Hierbei ist zu beachten, dass bei einer Risikoanalyse und Bewertung durch die Zulassungsbehörden (z.B. EMEA) der kranke Patient und nicht der gesunde Mensch/oder das gesunde Tier als Referenz dient.

Es würde sicherlich Rahmen und Ziel des Gutachtens sprengen, auf die potentiellen Risiken in der Anwendung der unter Kapitel 2 beschriebenen Produkte einzugehen - dies ist in erster

Linie auch Aufgabe der entsprechenden Zulassungsbehörden, ebenso wie die Qualitätssicherung und deren Überwachung. Dennoch können Frage der Qualitätssicherung und medizinischen Wirksamkeit bzw. eventuell auftretende Nebenwirkungen, auch für eine Abschätzung von möglichen Umweltrisiken von Bedeutung sein. Da die Mehrzahl der oben beschriebenen Produkte eine Zulassung besitzt (nur das Produktionssystem ist neu), können diese Informationen vergleichsweise einfach abgefragt werden.

2. Produktrisiko 2. Ein „Risiko“ für das Produkt selbst: Modifikationen des Produktes, bedingt durch Wechselwirkungen mit der belebten Umwelt (z.B. Endophyten, Symbionten, Pathogene) und unbelebten Umwelt (z.B. Licht, Hitze, Wasser). Im weiteren Sinne können hierzu auch Risiken gezählt werden, die aus dem Produktionsprozeß, d.h. der Expression in einem heterologen System, erwachsen könnten. Risiken die aus möglichen Fehlern des Produktionssystem entstehen und einen Einfluß auf die Struktur oder Funktion des Produktes haben können, sind:

- AS-Sequenzveränderung durch unterschiedliche Kodon-Nutzung,
- Modifikationen durch unterschiedliche Aminosäurepools,
- veränderte oder ausbleibende Prozessierung (Glykosylierungsmuster),
- veränderte Primär-/Sekundärstruktur (Splicing-Sites/Schnittstellen, Disulfid-Brücken),
- veränderte „Halbwertszeiten“ von mRNA und/oder Protein,
- veränderte Tertiärstruktur (Proteinfaltung, assistierende Proteine, Chaperone),
- modifizierte Funktion durch andere Substrat- und Produktpools oder Verteilung (Rückkopplungsmechanismen),
- modifizierte intrazelluläre Verteilung (Kompartimentierung [pH], Signalsequenzen).

Für alle Szenarien gibt es in der Literatur Beispiele (siehe unter 2. Proteinstruktur) - und die Liste ist sicherlich nicht vollständig. Diese Szenarien sind auch nicht auf pharmazeutisch wirksame Proteine beschränkt, sondern treffen auf alle (in transgenen Pflanzen produzierte) Proteine zu. Analoge Phänomene sind auch bei weiten Kreuzungen und Mutanten (Mutationszüchtung) zu erwarten und beobachtet worden. Zunächst mag dies nach einem Problem allein für den Hersteller aussehen. Problematisch ist aber, dass eine Umweltwirkung in solchen Fällen nicht immer offensichtlich ist, da die phänotypische Veränderung oft nicht deutlich ausgeprägt ist und die Veränderung vorübergehend sein kann – je nach Wirkung der äußeren Faktoren (siehe Beispiele).

3. Umweltrisiko. Hier ist die Frage zu beantworten, inwieweit ein Produkt, dessen Vorläufer oder Abbauprodukt die belebte Umwelt (z.B. Organismen die als Phytophagen, Saprophyten oder in anderer probiotischer, symbiotischer oder antibiotischer Beziehung zur Pflanze existieren) beeinflusst. Gerade für diesem Bereich ist die Datenlage sehr dürftig. Hier kann zum Teil nur auf relevante Ergebnisse zur Umweltverträglichkeitsprüfung von Arzneimitteln zurückgegriffen werden (für eine Ableitung potentieller Umweltrisiken aus den Ergebnissen der Wirkungsanalyse siehe Punkt 1).

Abgesehen von den Risiken, die sich aus den bekannten Eigenschaften des Produktionssystem und des herzustellenden Produktes ergeben, gibt es noch eine ganze Reihe eher spekulative Szenarien wie:

- mögliche Rekombination oder Aktivierung pathogener Viren (z.B. Retroelemente),
- unerwartetes Auftreten „Fitness“-relevanter Eigenschaften,
- Manifestation kryptischer Funktionen in heterologen Systemen (siehe unten).

2. *Veränderte Protein-Struktur*

Die Expression von Fremdproteinen in heterologen Systemen kann einen deutlichen Einfluß auf Struktur und Funktion des Fremdproteins ausüben. Eine ganze Reihe von Faktoren kann dabei zu kleineren Modifikationen oder zu recht dramatischen Veränderungen führen (siehe oben).

2.1. Translations- und Transkriptionsfehler bei heterologer Expression

In einem Review führen Kurland und Gallant (1996) einige Faktoren auf, die bei der Expression von Proteinen in heterologen Expressionssystemen zu Fehlern in der Primärstruktur von Proteinen oder auch zum Kettenabbruch führen können. Kurland und Gallant unterscheiden daher „missense“ Fehler und „processivity“ Fehler. „Missense“ Fehler, meist einfache Aminosäure Substitutionen, wie sie unter normalen Umständen mit einer Häufigkeit von 1 pro 1.000 oder 10.000 Aminosäuren auftauchen, haben meist keine oder nur geringe Konsequenzen - die überwiegende Mehrzahl der Proteine ist korrekt. Allerdings gibt es auch „hot spots“ oder Kodon-spezifische Fehler, die bei Bakterien mit Häufigkeiten im Prozentbereich auftauchen. Die Häufigkeit dieser Fehler steigt dann noch weiter an, wenn die entsprechenden tRNAs oder Aminosäuren im Mangel vorliegen (Parker 1989).

Dramatischer sind die Folgen dann, wenn eine fehlerhafte Bindung der Aminoacyl-tRNA zu Verschiebungen im Leseraster (Barak et al. 1996) oder zum Kettenabbruch führt oder das Kodon in ein Terminationskodon übersetzt wird. Für *E.coli* belegten dies Dong et al. (1996). Die Tatsache, dass das in *E.coli* eingebrachte heterologe Protein-Gen zwei AGG Kodons besaß, die in *E.coli* nur sehr selten für Arginin genutzt werden, führte zu einer 50%igen Reduktion der Menge an heterologem Protein. Zu erwarten ist eine Häufung solcher Fehler, wenn insbesondere die hohe Expression eines heterologen Proteins zu einer Differenz zwischen Nachfrage (durch entsprechende Kodons) und Angebot bestimmter Aminosäuren oder entsprechender tRNAs führt - von Kurland und Gallant (1996) als „hungry codons“ beschrieben.

Für die Abschätzung der damit verbundenen Risiken ist vielleicht weniger die Frage der Proteinausbeute (Kettenabbruch) von Bedeutung als die Frage nach Translationsfehlern (Aminosäuresubstitution). Die Detektion dieser Fehler ist schwierig. Sie führen recht selten zu einer signifikanten Veränderung der Aktivität und die modifizierten Proteine repräsentieren in der Regel eine Minderheit in der Gesamtpopulation des Proteins. Die Veränderung der Konformation von Proteinen kann aber durchaus Einfluß auf deren physikochemische Eigenschaften haben. Schon vor mehr als 30 Jahren wies Landgridge nach (1968, nach Kurland und Galant 1996), das etwa die Hälfte der zufälligen Aminosäureveränderungen der β -Galaktosidase die thermische Stabilität des Proteins beeinflusst.

Aber nicht nur Translationsfehler können für die thermische Stabilität und den „steady-state“ Spiegel verantwortlich sein. Köhne et al. (1998) beobachteten an Tabak einen Funktionsverlust des PAT-Proteins bei Temperaturen über 37°C. Allerdings wurde hier festgestellt, dass das aus *Streptomyces viridochromogenes* stammende Gen komplett (aber reversibel) abgeschaltet wird, während eine synthetische, an den GC-Gehalt der Pflanze angepasste Sequenz weiterhin transkribiert und translatiert wird. Neben Unterschieden im GC-

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

Gehalt scheinen auch 3'- und 5'-untranslatierte Leader-Sequenzen die Stabilität der Transkription und Translation zu beeinflussen. Zwar sind die Mechanismen im einzelnen noch unverstanden, die „Anpassung“ der Sequenz an den „genomischen“ Hintergrund bzw. die Kodonverwendung der Pflanze führt jedoch oft zur gewünschten Stabilität in Expression und Funktion (Jensen-Gath 1998; Broer, pers. Mitteilung).

Für Translationsfehler bzw. Änderungen in Primär- und Sekundärstruktur heterologer Proteine gibt es jedoch weitere Beispiele (zitiert nach Kurland und Gallant): Lu et al. wiesen bei Expression eines humanen Wachstumshormogens im *E.coli* Expressionssystem drei Aminosäure-Substitutionen nach und Carrier und Rosenberger konnten Phenylalanin im epidermalen Wachstumshormon der Maus nachweisen, wenn das entsprechende Gen in *E.coli* exprimiert wurde - das Maus-Gen besitzt kein Kodon für Phenylalanin. Der Einbau erfolgte durch einen Lesefehler. In weiteren Beispielen werden für derartige Fehler bei der Translation Häufigkeiten zwischen 0,1% und mehr als 5% angegeben.

Auch für Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen gibt es mittlerweile eine Reihe von Beispielen die zeigen, dass Fehler bei der Expression heterologer Proteine eher die Regel als die Ausnahme sind, auch wenn damit nicht gleich ein Funktionsverlust verbunden ist. Anlässlich der „International Molecular Farming Conference“ (1999) in Kanada wurde über eine ganze Reihe dieser Fälle berichtet.

Matsumura et al. (IMFC, P18, 1999) exprimierten humanes Interferon $\alpha 2b$ und $\alpha 8$ unter Kontrolle des 35S-Promotors in Kartoffeln und fanden, dass beide Interferone immunbiochemisch zu detektieren waren. Während Interferon $\alpha 8$ auch biologisch aktiv war, konnte dieser Nachweis für Interferon $\alpha 2b$ nicht erbracht werden.

Hogge et al. (IMFC, P40, 1999) produzierten in Raps ein Hirudin-Oleosin Fusionsprotein, mußten jedoch feststellen, dass neben dem korrekten Hirudin auch ein, am C-terminalen Ende um 2 Aminosäuren verkürztes, Hirudin-Derivat produziert wurde.

Andere Autoren hingegen dokumentierten die korrekte Expression und Prozessierung von heterologen Genen bzw. deren Produkte. So berichten Menassa et al. (IMFC, P21, 1999) über ein korrekt prozessiertes humanes Interleukin-10 in Tabak und Leite et al. (IMFC, P6, 1999) gelang es, humanes Wachstumshormon ebenfalls in Tabak zu produzieren - mit korrekter Aminosäuresequenz und Rezeptorbindung.

Interessanterweise scheint der Erfolg auch vom verwendeten Produktionssystem abzuhängen. So exprimierten Mitra und Zhang (1994) ein humanes Lactoferrin-Gen in Tabak-Suspensionszellen, konnten jedoch nur ein verkürztes Lactoferrin isolieren. Die Ursache für diese post-translationale Modifikation konnte nicht ermittelt werden. Hingegen berichten Anzai et al. (IMFC, P2, 1999) über die Produktion von humanem Lactoferrin in Reis. Hier zeigte sich nur am N-Terminus eine pflanzentypische Zuckerkette als einzige Veränderung.

Der Nachweis solcher Veränderungen hängt natürlich auch von der verwendeten Detektionsmethode ab. Eine genauere Analyse der N-terminalen Proteinsequenzen des in Tabak exprimierten Ricin-Gens der Castor-Bohne durch Sehnke und Ferl (1999) ergab, dass die beiden Ketten des Preproricins neue Prozessierungsmuster aufwiesen. So wurde in etwa der Hälfte der Ricin-a Kette eine zusätzliche Aminosäure des Signaleptids nachgewiesen

und in etwa 10% der Ricin-b Ketten fehlte ein Alanin-Rest. Davon waren jedoch die Funktion und immunologischen Eigenschaften nicht betroffen. Terashima et al. (1999) nutzten eine Reis-Zellkultur, um humanes α 1-Antitrypsin zu produzieren und stellten fest, dass der größte Teil des Proteins am C-terminalen Ende gleich mehrfach prozessiert wurde.

Für Antikörper, scFv- und Fab-Fragmente oder Vakzine werden solche Untersuchungen selten oder gar nicht durchgeführt (Commandeur, pers. Mitteilung). Für diese Produkte sind die biochemischen und vor allem die immunologischen Eigenschaften von großer Bedeutung. In keinem der oben beschriebenen Fälle wurden Aussagen über mögliche Risiken gemacht – vor allem weil es sich um (noch) nicht marktfähige Produkte handelte.

2.2. Proteinfaltung und Chaperone

Boston et al. (1996) und Clarke und Waltho (1997) fassen eine ganze Reihe von Arbeiten zur Funktion sogenannter „foldases“ oder molekularer Chaperone zusammen. Chaperone sind Proteine, die ganz wesentlich an der korrekten Faltung anderer Proteine *in vivo* beteiligt sind oder diese, z.B. unter Streßbedingungen, stabilisieren. Dazu gehören z.B. Protein-Disulfid-Isomerasen oder Peptidyl-Prolyl-Isomerasen, die an der Modifikation von Disulfid-Brücken oder Peptid-Bindungen beteiligt sind. Die Autoren gehen davon aus, dass die meisten zellulären Proteine bei der Synthese, der Prozessierung oder auch der intrazellulären Verteilung mit entsprechenden Chaperonen in Berührung kommen. Für die Expression von Proteinen in heterologen Expressionssystemen resultieren daraus die Fragen: a) benötigen die Fremdproteine Chaperone, um ihre Struktur und Funktion zu gewinnen und zu erhalten, b) sind diese im heterologen System in ausreichender Menge und mit ausreichender Spezifität vorhanden und c) führt die Interaktion mit „falschen“ Chaperonen zu neuen Funktionen. Dabei kann die erfolgreiche Faltung eines Proteins sogar davon abhängen, in welchem Pflanzenorgan es produziert wird. So beobachteten Bosch et al. (1994) die korrekte Produktion und Faltung eines Forellenwachstumshormons nur in Tabakblättern, nicht jedoch in Tabaksamen.

Die unter 2.1. beschriebenen „Fehler“ sind durchaus geeignet, die Interaktion mit Chaperonen zu beeinflussen und zu einem Funktionsverlust führen - entweder durch fehlerhafte Faltung oder veränderte Proteindegradation (Straus et al. 1988). So konnten z.B. Panahi et al. (IMFC, P20, 1999) keine korrekte Faltung von humanem Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor in bakteriellen und Hefe-Expressionssystem erreichen. Die Expression eines Proteins mit fehlerhafter Aminosäure-Sequenz ist offensichtlich in der Lage, bestimmte Chaperone zu titrieren. Dies gilt auch für die Überexpression heterologer Proteine, wie Parekh et al. (1995) am Beispiel der Expression des Rinderpankreas Trypsin-Inhibitor-Gens in Hefen nachweisen konnte. Ähnliches gilt für die Expression besonders komplexer Proteine (z.B. Antikörper oder VLPs), für deren Faltung vielleicht gar keine Chaperone existieren.

Im Falle einer Freisetzung bzw. eines Anbaus dieser Pflanzen ist sicherlich zunächst das Risiko zu bewerten, welches aus der Wirkung des korrekt exprimierten Produktes abzuleiten ist. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass im Falle einer medizinisch-therapeutischen oder diagnostischen Anwendung diese „Fehler“ schon bei der Produktion weitgehend ausgeschlossen werden müssen (Reduktion der „downstream“-Kosten). Zu klären wäre dann, ob es zu einer Häufung dieser „Fehler“ unter bestimmten Umweltbedingungen (Hitze,

Trockenheit, Pathogenbefall) kommen kann und ob diese dann für die Bewertung relevant sind.

2.3. Glykosylierung

In den meisten eukaryontischen Zellen beginnt die N-Glykosylierung mit dem Transfer von Glc3Man9GlcNAc2-Oligosacchariden aus Asparagin-Resten im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Daran schließt sich in Pflanzen eine weitere Prozessierung dieser Vorläufer in Zuckerseitenketten vom Mannose-Typ und noch komplexerer N-Glykane an. Pflanzen unterscheiden sich im Glykosylierungsmuster von Wirbeltieren vor allem durch die Existenz zweier Glykosyltransferasen, die β -1,2-Xyloyl-Transferase und die α -1,3-Fukosyl-Transferase sowie durch die Abwesenheit einer Sialyl-Transferase. Zuckerseitenketten pflanzlicher Proteine zeichnen sich deshalb durch einen hohen Anteil von Xylose- und Fukose-Zuckern und die Abwesenheit von Sialsäure aus (verschiedene Autoren¹¹). Entsprechende heterologe Proteine zeigen ebenfalls, zumindest teilweise, diese Glykosylierungsmuster. Diese Zuckerkomponenten (für die in dieser Kombination bislang keine orale Toleranz entwickelt werden konnte) gelten als hoch-immunogen. So lösen parenteral applizierte pflanzliche Proteine deutliche Immunreaktionen aus, die gegen eben diese Zuckerseitenketten gerichtet sind (z.B. Wilson et al. 1998). Daher forschen bereits mehrere Arbeitsgruppen an der Identifizierung, Klonierung und Modulation der entsprechenden Glykosylierungsgene mit dem Ziel, diese ggf. „abzuschalten“. Unklar ist jedoch, welche Wirkung dies auf alle anderen pflanzlichen Proteine haben könnte. Alternativ wird untersucht, ob sich durch ein geschicktes intrazelluläres „targeting“ Probleme mit der Glykosylierung umgehen lassen.

Inwieweit das allergene Potential realisiert wird, und dann auch im Zusammenhang mit den möglichen Anwendungen von Bedeutung ist, muß zunächst von den zulassenden Behörden beantwortet werden. Für die Bewertung des unmittelbaren Umweltrisikos einer Interleukin-produzierenden Pflanze, dürfte z.B. die Frage der Glykosylierung nur von untergeordneter Bedeutung sein. Erste experimentelle Daten deuten aber darauf hin, dass die „pflanzlichen“ Zuckerseitenketten dann keine besonderen Immunreaktionen hervorrufen, wenn sie im „falschen“ Kontext präsentiert werden, also nicht Bestandteil eines ursprünglich pflanzlichen Proteins sind. Chargelegue et al. (2000) konnten erstmalig zeigen, dass die parenterale Applikation (hier: subkutan) eines in Tabak produzierten monoklonalen Antikörpers keine Immunreaktion hervorruft – selbst wenn dieser Antikörper mit Adjuvantien appliziert wird.

3. Modifizierte oder kryptische Funktion

Eine Reihe von Proteinen können, je nach „Feedback-Mechanismus“, katabolische oder anabolische Reaktion katalysieren. Andere Enzyme können neben einer Hauptfunktion auch Nebenreaktionen katalysieren, abhängig z.B. von der Substratspezifität. So katalysiert das NPT-II Protein die Phosphorylierung einer ganzen Reihe von Aminoglykosid-Antibiotika. Es ist sicherlich davon auszugehen, dass sich im Laufe der Evolution nicht unendlich viele,

¹¹ vergleiche Lerouge (W76), Bannon und Elbein (W77), Gomord (W78), Steinkellner (W79) sowie Dupree (W80), Proc Internatl Molec Farm Conf, 20.8-1.9.1999, London, Kanada

sondern nur eine begrenzte Anzahl enzymatisch aktiver Domänen –vermutlich aus gemeinsamen „erfolgreichen“ Vorläufern- entwickelt haben. Daher verwundert auch die Feststellung nicht, dass bestimmte Proteine verschiedene Funktionen haben. Die zur Vermittlung von Pilzresistenzen verwandten Hydrolasen, wie Chitinasen (z.B. aus *Trichoderma harzianum*) oder 1,3- β -Glukanasen (z.B. aus Gerste), zeigen eine, wenn auch geringe, wechselseitige Affinität für das jeweils andere Substrat. Noch interessanter ist eine komplette Bi- oder Multifunktionalität, wie sie z.B. für das Lysozym beschrieben wird. Neben der lytischen Aktivität (der Zersetzung der bakteriellen Zellwand) ist auch eine antifungale Aktivität beschrieben, die vermutlich über eine Interaktion mit der pilzlichen Plasmamembran zu deren Destabilisierung führt (Düring, pers. Mitteilung). Die vergleichende Analyse von Bau und Funktion der Proteine, detailliertere Computermodelle und ein deutlich schnellerer Informationsabgleich (Stichwort: Proteomics) wird sicherlich auch hier zu neuen Erkenntnissen und einer sichereren Vorhersage über mögliche Funktionen führen.

Die folgenden Beispiele sollen demonstrieren, dass auch dann Funktionen von Fremdproteinen wahrgenommen werden können, wenn die Pflanze selbst keine offensichtlich homologen oder analogen Proteine oder Reaktionsketten besitzt.

3.1. Lactoferrin

Lactoferrin gehört zu den Eisen-bindenden Glykoproteinen, die auch ein Bestandteil menschlicher Muttermilch sind. Größere Mengen Lactoferrin finden sich auch in den Sekreten der Schleimhäute, im Uterus und neutrophilen Zellen. Dem Lactoferrin werden unterschiedliche Funktionen zugeordnet. In *in-vitro* Experimenten fördert Lactoferrin das Zellwachstum, moduliert die Immunantwort und hat antibakterielle und antivirale Eigenschaften. Die Sequenzhomologie bei Säugern ist vergleichsweise hoch und resultiert in einem Protein mit etwa 700 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa.

Mitra und Zhang (1994) haben ein humanes Lactoferrin-Gen in Tabak-Zellkulturen zur Expression gebracht (siehe oben). Obwohl das Protein erheblich kleiner war und offensichtlich nicht korrekt prozessiert wurde, hat es seine antimikrobielle Eigenschaft nicht verloren, sondern im Gegenteil noch verstärkt (getestet gegen: *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas syringae* und *Clavibacter flaccumfaciens*). Überraschend ist, dass die Expression des Lactoferrins-Gens in Tomaten und Kartoffeln zu einem etwa 80 kDa großen Protein führt (Arakawa 1999c) - alle drei Pflanzenarten gehören der Familie der *Solanaceae* an. Darüber hinaus berichten Anzai et al. (IMFC, P2, 1999) ebenfalls über die korrekte Expression von humanem Lactoferrin in Reis. Auch die Expression im Pilz *Aspergillus nidulans* führte zur Produktion eines Proteins in der richtigen Größe.

Bisher sind keine Daten über die Auswirkungen der Expression von Lactoferrin *in vivo* bzw. im Freiland erhoben worden. Allerdings zeigt das Beispiel, dass die Expression von humanen Milchproteingenen in Pflanzen auch im Hinblick auf die „Fitness“ der Pflanze von Bedeutung sein kann (erhöhte Resistenz gegen mikrobielle Infektionen) – vorausgesetzt es existieren wachstums- oder ausbreitungslimitierende Mikroorganismen, die wirksam durch Lactoferrin kontrolliert werden können. Im Falle eines Einsatzes im Pflanzenschutz und dem damit verbundenen großflächigen Anbau, stellt sich -wie bei allen anderen konventionellen

und gentechnischen Ansätzen- natürlich auch die Frage nach Wirkungen auf Nichtzielorganismen, Ausbreitungswahrscheinlichkeit etc..

3.2. Hämoglobin

Im Jahre 1998 hat USDA-APHIS den Antrag auf Freisetzung von transgenem Mais genehmigt, der neben einer Herbizidresistenz auch ein Gen-Konstrukt für die Expression menschlicher Hämoglobin-Proteinketten (Blutbestandteil, Notfallmedizin) enthielt. Der Antrag wurde von der Firma Limagrain gestellt. Unter der APHIS-Nummer 98-117-01r findet sich eine der wenigen Bewertungen von Umweltwirkungen („Environmental Assessments“) im Zusammenhang mit der Freisetzung transgener Pflanzen in den USA („Permit for the release into the environment“).

Etwa 5000 Pflanzen wurden freigesetzt mit einer Isolationsdistanz von etwa 400 m zu anderen Maispflanzen. Weitere Maßnahmen/Auflagen zur Verhinderung einer Ausbreitung schließen die Ernte per Hand, den gesicherten Transport des geernteten Saatgutes (auch nach Frankreich) sowie ein Monitoring über zwei Jahr auf Durchwuchs („Volunteers“) ein. Zwar ist die genaue Sequenz oder Struktur des Transgens nicht bekannt (CBI), APHIS kommt jedoch zu dem Schluß, dass die Freisetzung unter den gegebenen Bedingungen erlaubt werden kann, da:

- eine Persistenz der transgenen Pflanze auszuschließen ist,
- eine Veränderung der Suszeptibilität gegenüber Krankheiten nicht zu erwarten ist,
- eine Veränderung in der landwirtschaftlichen Praxis nicht zu erwarten ist,
- horizontaler Gentransfer und die Wirkung auf Nichtzielorganismen ausgeschlossen ist,
- eine Nutzung als Nahrungs- oder Futtermittel auszuschließen ist.

Eine spezifischere Beurteilung der Wirkung des Hämoglobin Gens ist nicht Gegenstand des EA, weil es sich hier um eine kontrollierte Freisetzung handelte und das Design ein Verbleiben in der Umwelt ausschließt. Selbstverständlich ist eine illegale Aneignung oder Verwendung nicht auszuschließen, allerdings handelt es sich bei Hämoglobin auch nicht um eine hochtoxische Substanz. Das andere Hämoglobine jedoch eine Wirkung in Pflanzen haben können, zeigt die Arbeit von Holmberg et al. (1997). Die Autoren transformierten Tabak mit dem Hämoglobin-Gen aus einem gram-negativen, obligat aeroben Bakterium *Vitreoscilla spec.* Unter Sauerstoff-limitierenden Bedingungen erhöht *Vitreoscilla* die Produktion des Hämoglobin Homodimers. Holmberg und seine Kollegen konnten zeigen, dass die Expression in Tabak zu deutlichen Veränderungen an unerwarteter Stelle führt. Sie beobachteten:

- eine beschleunigte Keimung der Tabaksamen (3-4 Tage gegenüber 6-8 Tagen),
- eine höhere Wachstumsrate,
- ein um 80-100% höheres Trockengewicht nach 35 Tagen,
- eine um 3-5 Tage reduzierte vegetative Phase,
- einen um etwa 10% höheren Ertrag,
- einen um 30-40% höheren Chlorophyllgehalt,
- einen um 34% höheren Nikotingehalt,
- einen deutlich niedrigeren Anabesin-Gehalt.

Die Expression von menschlichem Hämoglobin in Tabak hatte nach Dieryck et al. (1997) keinen physiologischen Effekt. Beide Publikationen sind übrigens in dem „Environ-

mental Assessment" des USDA-APHIS nicht zitiert. Interessant ist der signifikant angestiegene Gehalt an Sekundärmetaboliten im Tabak. Die Transformation von *Datura innoxia* mit dem gleichen Konstrukt führte zu einem 6-fach höheren Scopolamin-Gehalt (Bülow et al. 1999). Offensichtlich ist Sauerstoff einer der limitierenden Faktoren bei der Produktion von Alkaloiden. Eine so starke Veränderung des Alkaloid-Gehaltes ist durchaus umweltrelevant, da Alkaloide eine wichtige Rolle in der Pathogen-Abwehr einnehmen. Nicht-symbiontische Hämoglobine (also nicht die Leg-Hämoglobine der Leguminosen) sind im Pflanzenreich weit verbreitet. Die meisten haben recht hohe Affinität zu Sauerstoff, während das *Vitreoscilla* Hämoglobin eine geringe Affinität besitzt und Sauerstoff auch leicht wieder abgibt. Mit anderen Worten, die Hämoglobine der Pflanzen und des Bakteriums haben sicherlich unterschiedliche Funktionen - die Wirkung des bakteriellen Hämoglobins in Pflanzen ist aber bis heute unbekannt. Für Pflanzen, die auf Sauerstoffmangel (z.B. bei Überflutung) sehr sensibel reagieren (z.B. Mais oder Erbsen), könnte eine Verbesserung der Sauerstoffbereitstellung durchaus einen selektiven Vorteil unter bestimmten Umweltbedingungen darstellen - bei Reis wäre dies eher nicht zu erwarten. Einen ähnlichen „Auslöser“ für eine genauere Betrachtung wäre bei Leguminosen gegeben, bei denen Hämoglobin (Leg-Hämoglobin) integraler Bestandteil einer funktionierenden Symbiose mit Rhizobien ist (N-Fixierung).

Das Beispiel illustriert, dass durchaus Funktionen in Pflanzen von Fremdproteinen wahrgenommen werden können, die der Pflanze eigentlich gänzlich unbekannt sind. Das Beispiel zeigt auch, dass eine wirksame Trennung bzw. Kennzeichnung von Pharmazeutika-produzierenden Pflanzen und Nahrungspflanzen wünschenswert ist. Nur dies erlaubt eine wirksame Kontrolle der Verbreitung (auch mögliche illegale Aktionen sind hier zu berücksichtigen).

3.3. Das 2',5'-Oligoadenylat-System

Anders als bei den beiden vorherigen Beispielen wird im Fall des 2',5'-Oligoadenylat-Systems keine eindeutige Wirkkette beschrieben und die dahinterstehende Fragestellung ist bislang rein hypothetisch. Es mag jedoch die Komplexität einer möglichen Risikoanalyse veranschaulichen, wenn in diesen Pflanzen pharmazeutisch interessante Produkte, wie das Interferon, produziert werden.

Das 2',5'-Oligoadenylat-System bei Säugern und höheren Vertebraten ist Teil des Abwehrsystems gegen Viren. Das System besteht aus zwei Komponenten. Die 2',5'-Adenylat-synthase produziert Oligoadenylate und benötigt dazu doppelsträngige RNA, wie sie in virus-infizierten Zellen oft vorkommt. Das zweite Enzym, eine Oligoadenylat-abhängige RNaseL, baut zelluläre und virale RNA vergleichsweise unspezifisch ab. In Säugern wird die Aktivität dieses Systems durch Interferon induziert. Ein entsprechendes System ist in Pflanzen bisher nicht gefunden worden. Andererseits findet man aber auch in Pflanzen Oligoadenylate (wenn auch keine 2',5') und Truve et al. (1993) konnten nur durch die Expression einer Oligoadenylat-Synthase aus Ratten in Kartoffeln eine, wenn auch partielle, Resistenz gegen PVX erzielen. Dies ließe zumindest vermuten, dass ein verwandtes System in Pflanzen existieren könnte.

Ogawa et al. (1996) und Mitra et al. (1996) konnten zeigen, dass die konstitutive Expression der 2',5'-Adenylat-synthase und der Oligoadenylat-abhängige RNaseL in Pflanzen zu

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

einer (natürlich Interferon-unabhängigen) Immunität gegenüber Infektionen mit pflanzlichen Viren führt - vermittelt durch den induzierten Zelltod der befallenen Pflanzenzelle. Dies ist allerdings eine Reaktion, die in Säugerzellen nicht beobachtet wird – das System erfüllt also den gleichen Zweck, ohne jedoch die gleiche Strategie zu nutzen. Interferon ist in Säugerzellen Aktivator des Systems und transgene Pflanzen die Interferon produzieren existieren bereits (die OECD-Datenbank dokumentiert auch eine Freisetzung, Kartoffel, 1997, Russische Föderation). Es gibt allerdings bislang keine Untersuchungen, die die Frage beantworten, ob Interferon eine entsprechende Aufgabe auch im Pflanzensystem (mit einem rudimentären 2'-5'-Adenylat-System?) wahrnehmen kann.

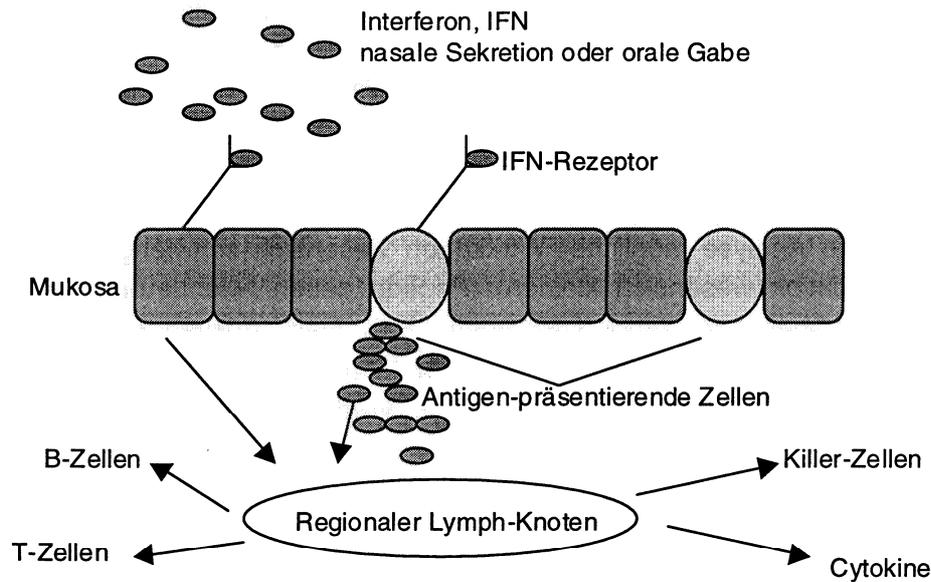
Wie eingangs bemerkt, dieses Szenario ist konstruiert und spekulativ, kann aber, ebenso wie die Beispiele vorher, deutlich machen, dass eine Funktion bestimmter Fremdproteine in Pflanzen nicht allein dadurch auszuschließen ist, dass es kein pflanzliches Äquivalent gibt. Neben der Pflanze sind natürlich auch mögliche Symbionten, Saprophyten oder Pathogene in die Bewertung mit einzubeziehen. Nach Brandle (pers. Mitteilung) sind entsprechende Untersuchungen selten und nicht systematisch durchgeführt worden. Seine Versuche zur Auswirkung von Interleukin-10 in Tabak auf einige Fraß-Insekten ergaben keine Hinweise auf akute Veränderungen des Wachstums oder der Fertilität, weder der Pflanze noch der Insekten.

3.4. Interferone und Interleukine

Die Interferone (IFNs) sind vergleichsweise große Peptide (aus den Komponenten IFN- α/β) und sehr empfindlich gegenüber Proteinasen und Peptidase des Magen- und Darmtraktes. Wie Beilharz (2000) ausführt, werden IFNs daher meist parenteral verabreicht, d.h. subkutan oder intramuskulär injiziert. Es wäre also davon auszugehen, dass die orale Verabreichung oder die unbeabsichtigte Aufnahme durch den Konsum Interferon produzierender Pflanzen kein besonders hohes Risiko darstellt. Bei parenteraler Gabe zeigen sich allerdings auch deutliche Dosis-abhängige Nebenwirkungen (z.B. Fieber). In jüngster Zeit mehren sich die Hinweise für therapeutische Effekte nach oraler Gabe von Interferonen. So zeigten schon geringe Dosen von IFN- α , - β und - γ systemische Effekte in Mäusen, Katzen, Hunden, Rindern, Schweinen und Ratten. Über positive Effekte wird auch bei der Behandlung von AIDS, Multipler Sklerose, Masern und Hepatitis berichtet. Erste klinische Tests belegen die positive Wirkung von Interferon schon in geringen Konzentrationen.

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

Abbildung 5: Möglicher Wirk-Mechanismus oral applizierter Interferone (nach Beilharz 2000)



Nach Beilharz (2000) sind die bislang parenteral applizierten Mengen unphysiologisch hoch. Zwar sind die oralen Konzentrationen zu gering als das eine direkte antivirale oder wachstumsinhibierende Wirkung angenommen werden kann, jedoch liegt die Vermutung nahe, dass die orale Aufnahme offensichtlich den natürlichen Abwehrmechanismus nachahmt (Abbildung 5). Im Zusammenhang mit der Produktion von Interferonen in Pflanzen ist davon auszugehen, dass die aufgenommene Menge durch unbeabsichtigten (und lokal begrenzten) Konsum durchaus eine Wirkung ausüben kann. Zwar werden überaus positive Wirkungen beschrieben, allerdings gilt dies für einen Patienten, nicht für den gesunden Konsumenten. Interferon-ähnliche Peptide sind auch in virus-infizierten Pflanzen detektiert worden. Zwar gibt es keine strukturelle Homologie zwischen humanem und „pflanzlichen“ Interferon, jedoch zeigen einige Arbeiten eine hemmende Wirkung des humanen Interferons auf die Vermehrung phytopathogener Viren und Homologien zu pflanzlichen „Abwehr-Proteinen“ (Orchansky et al. 1982, Vicente et al. 1987, De Zoeten et al. 1989).

Die für die Interferone getroffenen Aussagen mögen auch analog für die Interleukine gelten. Fraglich ist, ob diese Neurosekrete eine Wirkung auf die sie exprimierende Pflanze ausüben. Parker et al. (1997) berichten von Resistenz-vermittelnden Proteinen in *Arabidopsis thaliana* (RPP5), deren N-terminale Domäne hohe Homologie zu der cytoplasmatischen Domäne des menschlichen Interleukin-1 Transmembran-Rezeptors aufweist. Young (2000) stellt dazu fest, dass es sich bei dem kodierenden Gen um ein Mitglied einer ganzen Familie von Resistenzgenen handelt, die zum Teil an der Signaltransduktion beteiligt sind. Zu bewerten wäre, ob sich aus der strukturellen Analogie irgendwelche sicherheitsrelevanten Informationen ableiten lassen. Bisher gibt es dafür keine Hinweise. Struktur- bzw. Sequenz-homologien können bekannterweise zum Abschalten von Genen führen („silencing“). So beobachtet Erickson (pers. Mitteilung) bei der Produktion eines epidermalen Wachstumsfaktors in Pflanzen (EGF), dass die mRNA in ausreichender Menge nachzuweisen, die Proteinmenge aber vergleichsweise gering ist. Das mag an Problemen bei der Translationsinitiation oder an der Stabilität (kryptische „Splicing-Sites“ etc.) liegen. Erickson schließt aber auch ein „silencing“ nicht aus und begründet dies mit möglichen EGF-Motiven in der pflanzlichen DNA, die eine hohe Translationsrate ausschließen.

Das Beispiel EGF und die hohe Anzahl von Resistenzgenen (kodierend oder nicht, Young (2000) geht von Hunderten aus) mit konservierten Nukleotid-bindenden Domänen (NBS-LLR) zeigt sehr eindrucksvoll die Spannung zwischen diversifizierter Funktion und konservierter Struktur einer „erfolgreichen“ Domäne. Was für die möglichen Rezeptoren gilt, mag auch für die Peptidhormone selbst gelten. Einerseits läßt sich daraus aber nicht unmittelbar erkennen, dass die Produktion von Interleukin oder anderen neurosekretorischen Peptiden in Pflanzen auch eine Bindung an pflanzeigene Rezeptoren zur Folge hat¹², andererseits macht dies die Analyse möglicher Wirkketten wesentlich schwieriger. Gleiches mag auch für die Produktion wesentlich kleinerer Peptide gelten, wie Leu-enkephalin, einem Opiat-Analogen (Krebbers und Vanderkerckhove 1990). Nach Aussagen von Commandeur und Brandle (pers. Mitteilung) hat die Produktion von Interleukin 10 (IL-10) in Pflanzen bisher noch zu keinen phänotypischen oder offensichtlichen Veränderungen geführt.

4. Indirekte Wirkungen

Unter indirekten Wirkungen sollen hier solche verstanden werden, die sich durch eine Verschiebung des Konsums der Produkte ergeben können. Zwar ist dies nicht immer unmittelbar umweltrelevant, mittelbare und langfristige Folgen sind jedoch nicht auszuschließen und sollten daher bei einer Gesamtbewertung nicht unterschlagen werden. Im vorliegenden Beispiel geht es um die möglichen Folgen, die sich aus der Produktion von Milchproteinen in Pflanzen ergeben können.

Es gilt als weitgehend akzeptiert, dass für die Ernährung von Babies die humane Muttermilch allen anderen Milchsubstituten weit überlegen ist. Dennoch gibt es einen vergleichsweise großen Markt für diese Substitutionsprodukte. Soja-Produkte und Kuhmilch gehören zu den traditionellen Substituten, auch wenn die Formulierungen physiologisch unzureichend sind und Risiken wie Übergewicht, Milchintoleranzen und Allergien zu beobachten sind (Johansson et al. 1994 und Host 1995, zitiert in Arakawa et al. 1999c). Selbst ein Zusammenhang zwischen Kuhmilch-Konsum und Insulin-abhängiger Diabetis läßt sich aus epidemiologischen Untersuchungen ableiten. Arakawa et al. (1999c) schlagen deshalb eine Substitution durch Produkte transgener Pflanzen vor, z.B. Soja-Produkte, die durch humanes β -Casein, Lactoferrin und α -Lactalbumin angereichert sind. Es stellt sich hier die Frage nach den Wirkungen der aufgereinigten Produkte und nach Problemen beim Herstellungsprozeß, wie der korrekten Prozessierung, Phosphorylierung oder Glykosylierung und anderer, post-translationaler Modifikationen. Im Falle von Milch- und Blut-Additiven und Substitutionsprodukten sind mögliche Wirkungen anders zu bewerten als bei (akut anzuwendenden) pharmazeutischen Produkten weil:

- a) die Applikation ggf. über einen längeren Zeitraum und in größerer Menge erfolgt,
- b) die Applikation vermutlich nicht ärztlich betreut wird,
- c) für die Bestimmung einer noch akzeptablen Risikoschwelle ein gesunder Konsument als Referenz dient.

Wie für die Substitution von humaner Milch durch Kuhmilch stellt sich allerdings auch die Frage, ob und wenn ja, welchen Einfluß eine Substitution mit Soja-Produkten hat. Cox und

¹² Entsprechenden Hinweisen, die bisher nicht existieren, wäre nachzugehen. Umgekehrt hat jedoch die massenhafte Aufnahme der pflanzeigenen DNA bzw. des Rezeptors durch eine Reihe von Konsumenten keine sichtbaren Folgen gehabt.

Davies führten 1988 den Nachweis, dass eine schon in den 40er Jahren beobachtete Infertilität von Schafen durch den Genuß einer Kleesorte mit hohem Formononectin-Gehalt zurückzuführen ist, welcher im Gastrointestinaltrakt der Schafe in das Phytoöstrogen Diadzein umgewandelt wird und entsprechend wirkt. Welche Folgen wären bei einer -durch die Optimierung zu erwartenden- Ausweitung der Anwendung pflanzlicher Substitutionsprodukte zu erwarten? Diese Frage wäre sicherlich pflanzenspezifisch zu beantworten. Tikkanen et al. (1998) und Adlerkreutz und Mazur (1997) beschreiben signifikante Wirkungen auf das endokrine System bzw. den Proteinmetabolismus (Oxidation bei Lipoproteinen) durch Phytoöstrogene. Eine Untersuchung von Säuglingen, bei denen Muttermilch frühzeitig durch Soja-Produkte substituiert wurde, hat jedoch ergeben, dass keine negativen Effekte durch Phytoöstrogene wie Genistein und Diadzein hervorgerufen wurden, obwohl der Plasma-Spiegel 10^5 mal höhere als die typischen Estradiol-Werte aufwies (Setchell et al. 1997). Das Beispiel verdeutlicht jedoch, dass hier nicht nur die Produktion eines korrekt prozessierten Proteins für eine Risikoabschätzung von Bedeutung ist, sondern auch die Auswahl des Systems in dem diese Proteine gebildet werden (dies gilt auch, wenn die Produkte aufgereinigt werden - hier ist dann die Frage nach möglichen Kontaminationen zu beantworten). Dabei sind nicht nur mögliche akute Toxizitäten oder das Auftreten von Allergien und Intoleranzen zu bewerten -wie sie z.B. bei Alkaloid-produzierenden Pflanzen, wie Tabak, offensichtlich sind- sondern auch die Folgen eines langfristigen (bzw. langfristig umgestellten) Konsums.

5. Rekombination: Vakzine und virale Vektoren

Da es sich bei Vakzinen (mit Ausnahme der anti-ideotypischen Antikörper) um subgenomische, virale Sequenzen meist tier- oder humanpathogener Viren (oder Bakterien) handelt, soll hier die Frage diskutiert werden, ob, und wenn ja, welche Risiken daraus erwachsen können, falls diese Pflanzen angebaut werden. In diesem Zusammenhang erscheint eine Differenzierung wie folgt sinnvoll (siehe auch: Klassifizierung, Kapitel 4 und 5):

- transgene Pflanzen, die komplette virale Strukturgene exprimieren,
- transgene Pflanzen, die einzelne Teilsequenzen (Epitope) exprimieren,
- chimäre virale Vektoren, die Teilsequenzen in (transgenen) Pflanzen transient exprimieren.

Zunächst ist festzustellen, dass bisher keine Kenntnisse oder Publikationen existieren, die experimentell oder durch eine Arbeitshypothese begründet, mögliche Wechselwirkungen oder Risiken derartiger Produktionssysteme belegen. Die in der Folge beschriebenen Szenarien sind daher weitgehend spekulativ. Vor dem Hintergrund zweier Publikationen zum „Risiko“ des Einsatzes des (viralen) 35S-Promotors in transgenen Pflanzen (Ho et al. 1999; Hull et al. 2000) soll, der Vollständigkeit halber, hier darauf eingegangen werden.

Bisher erfolgt die Integration einer rekombinanten DNA in das pflanzliche Genom über eine illegitime Rekombination, d.h. in pflanzliche DNA-Sequenzen, die nur wenige (2-4 Nucleotide) oder gar keine Homologie zum Transgen haben. Der 35S-Promotor des zu den Caulimoviren (Pararetroviren) gehörenden Blumenkohlmosaikvirus enthält ein imperfektes Palindrom, welches einen „hot-spot“ für Rekombinationen darstellen kann. Zwar sind solche Strukturen vergleichsweise häufig in genomischer DNA zu finden, dennoch spekulieren Ho et al. (1999), dass der 35S-Promotor:

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

- a) ins Pflanzengenom integriert mit latenten (ins Pflanzengenom integrierten, aber nicht episomal infektiösen) Viren rekombinieren und neue, virulente Viren generieren oder „normale“ Gene überexprimieren kann,
- b) „konsumiert“ (also gegessen) mit Zellen des Magen-Darm-Traktes oder dort vorhandener Viren und Bakterien rekombinieren und ebenfalls neue Viren generieren oder Gene der betroffenen Zellen überexprimieren kann.

Folgt man den Schlußfolgerungen von Ho et al. (1999), stellt sich die Frage, ob die in transgenen Pflanzen oder viralen Vektoren exprimierten, subgenomischen, viralen Sequenzen des Hepatitis B-Virus oder HIV:

- a) neue Pflanzenviren oder
- b) neue human- oder tierpathogene Viren generieren können.

5.1. Virale Sequenzen im pflanzlichen Genom

In diesem Zusammenhang lohnt sich eine kurze Betrachtung der jüngsten Literatur zur Existenz (para-)retroviraler Elemente in pflanzlichen Genomen und zu Rekombinationen zwischen Viren und Viren und subgenomischen, viralen Sequenzen in transgenen Pflanzen.

Im Gegensatz zu bakteriellen oder tier- und humanpathogenen Viren ist weitgehend akzeptiert, dass Pflanzenviren nur selten in das Wirtsgenom integrieren. Bejarano et al. (1996) beschreiben jedoch erstmalig virale Sequenzen im Tabak-Genom. Durch Kreuzhybridisierung genomischer Tabak-DNA mit einer Sonde des „tomato golden mosaic virus“ (TGMV) konnten die Autoren mehrere Kopien viraler Sequenzen in Tabak nachweisen. Allerdings gehen sie davon aus, dass die Integration dieser Kopien ein einmaliges Ereignis darstellt. Virale Transkripte ließen sich in den Pflanzenzellen nicht nachweisen.

Im Gegensatz zur Annahme von Ho et al. (1999), die eine Existenz pararetroviraler Sequenzen in Pflanzen ausschließen, dokumentieren Jakowitsch et al. (1999) die Existenz pararetroviraler Sequenzen in Tabak. Auch in diesem Fall scheint das -hypothetische- Tabak-Pararetrovirus (TPV) nur einmal ins Pflanzengenom integriert zu sein. Allerdings hat die Plastizität des Tabak-Genoms zu einer ungewöhnlich hohen Kopienzahl TPV-ähnlicher Sequenzen geführt (~1000 Kopien/Genom). Die Autoren fanden weder einen Hinweis auf eine durch das episomale Genom ausgelöste Infektion noch auf TPV-Transkripte. Die Autoren spekulieren aber, dass die TPV-Sequenzen eine Infektion ggf. über eine pathogen-vermittelte Resistenz (ähnlich der transgener, virusresistenter Pflanzen) nicht erlaubt. Ähnlich begründeten auch Bejarano et al. (1996) die Tatsache, dass sich die Geminivirus-DNA (TGMV) im Tabak-Genom behaupten konnte.

Laten et al. (1998) charakterisierten Struktur und Sequenz eines *copia/Ty1*-ähnlichen Retroelementes in Sojabohnen und konnten dabei eine *env*-ähnliche Sequenz identifizieren, wie sie für Retroviren typisch ist. Die Homogenität der Restriktionsschnittstellen der integrierten Kopien des als *SIRE-1* bezeichneten Elements deuten darauf hin, dass die Integration erst in phylogenetisch jüngster Zeit erfolgt ist. Die Autoren konnten auch *gag*-, *rt*- und *env*-homologe Transkripte identifizieren und spekulieren, dass noch funktionale Kopien von *SIRE-1* existieren können. Homologie-Untersuchungen lassen die Autoren vermuten, dass das Retroelement durch Transfer von einem wirbellosen Organismus in die Sojabohne er-

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

folgt ist. Das Auftauchen verwandter Retrotransposons in phylogenetisch entfernten Organismen und die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen lassen Laten et al. (1998) vermuten, dass neben dem vermuteten „horizontalen“ Gentransfer solcher Elemente auch ein vertikaler, also über Infektionen durch Viren möglich ist.

Es sei hier bemerkt, dass die bisherigen, ausgewählten Beispiele nur Belege für die mögliche Integration (para-)retroviraler Sequenzen in pflanzliche Genome darstellen. Es gibt auch eine Reihe von Pflanzenviren, die sich über Insekten verbreiten oder sich sowohl in Pflanzen als auch in Invertebraten vermehren. Die Untersuchungen von Laten et al. (1998) lassen vermuten, dass diese Viren ggf. in das pflanzliche Genom integrieren können, wenn auch äußerst selten. Bislang gibt es keinen Hinweis auf die Replikation oder Integration von Vertebraten-Viren in Pflanzen und umgekehrt.

Auch wenn sich taxonomisch, z.B. Hantaviren (Hantaan Virus) und Tospoviren („tomato spotted wilt virus“) in die Bunyaviridae und das „lettuce necrotic yellows virus“ (Cytorhabdovirus) und das Rabies(Tollwut)-Virus (Lyssavirus) in die Rhabdoviridae, also in die gleichen Familien einordnen lassen, so ist weder für diese noch für die revers transkribierenden Viren (Gruppe VII: Caulimovirus, Badnavirus und Hepdnaviridae, z.B. Hepatitis BVirus) nachgewiesen, dass diese in Vertebraten UND Pflanzen replizieren. Es existieren auch keine Belege für die Integration von Vertebraten-Viren in pflanzliche Genome¹³. Es ist darüber hinaus nur ein einziges Virus bekannt („petunia vein-clearing virus“, PVCV), welches eine den Retroviren verwandte Integrase Sequenz besitzt. Allerdings ist die Homologie auf die Sequenz beschränkt, eine entsprechende Funktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden.

Während sich die Arbeiten zum Nachweis der Integration viraler Sequenzen in das pflanzliche Genom häufen, ist bislang nur ein Beispiel für eine Infektion durch die Expression episomaler (also in das pflanzliche Genom integrierter) Sequenzen bekannt. So identifizierten Harper et al. (1999) eine Homologie zwischen dem, zu den Badnaviren gehörenden „banana streak virus“ (BSV) und komplexen, genomischen BSV-homologen Sequenzen im Genom einiger Bananen-Varietäten. Die gleiche Arbeitsgruppe (Ndowora et al. 1999) schlägt zudem einen Mechanismus vor, der erklären kann, warum durch Kreuzungen oder Gewebekultur-Passagen BSV-Infektionen auftreten, selbst wenn die Eltern bzw. das Ausgangsmaterial symptomfrei waren. Aus der Tatsache, dass diese Viren eine hohe Homologie zueinander und zu den genomischen BSV-Sequenzen haben, folgern Ndowora et al. (1999), dass es sich um eine, durch Rekombinationsereignisse ausgelöste, episodale Infektion handelt, d.h. BSV ist als latentes Virus im pflanzlichen Genom vorhanden. Allerdings zeigen weder die Integration (es existiert keine Integrase) noch die Excision Homologien zu tier- oder humanpathogenen Retroviren (z.B. HIV).

¹³ Es ist aber durchaus möglich, auch in Pflanzen kürzere Sequenzhomologien (10-20 Nukleotide) zu Retroviren (inklusive HIV) zu finden. „Erfolgreiche“ Sequenzen werden von der Evolution eben nicht immer neu „erfunden“.

5.2. Rekombination und Rekonstitution

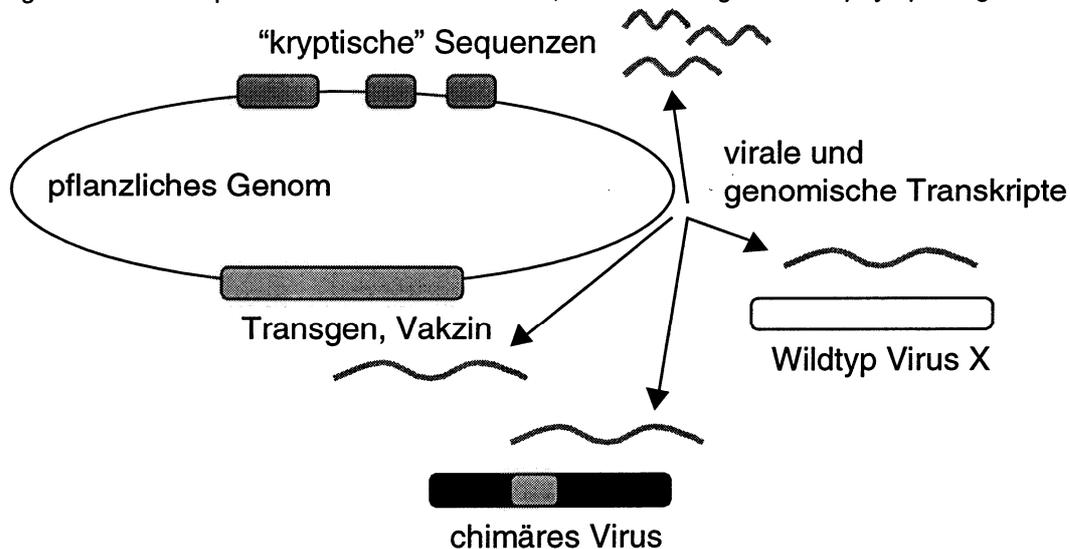
Die oben genannten Beispiele führen nun zu den folgenden Fragen:

1. Wie groß ist der Anteil viraler Sequenzen in Pflanzen?
2. Besteht die Möglichkeit der Rekonstitution von Viren?
3. Ist der Einbau viraler Epitope in die Hüllproteingene phytopathogener Viren bedeutsam?
4. Welche Konsequenzen hätte die Rekonstitution/Neukombination?

Die erste Frage läßt sich zur Zeit nicht beantworten. Der Anteil viraler Sequenzen in Pflanzen kann nach Ansicht einiger Wissenschaftler (z.B. Vaucheret, INRA, Versailles, pers. Mitteilung) bis zu 50% ausmachen. Dies mag aber von Pflanzenart zu Pflanzenart stark variieren. Virale DNA und partielle genomische Duplikationen während der phylogenetischen Entwicklung der Pflanzen (Grant et al. 2000) tragen sicherlich zu einer hohen Plastizität pflanzlicher Genome bei.

Die zweite Frage ist die, nach einer möglichen Rekombination zwischen der DNA oder RNA eines Transgens (stabil im pflanzlichen Genom oder transient in einem chimären Virus) und der DNA oder RNA „kryptischer“, also im Pflanzengenom verborgener, viraler Sequenzen oder einem die Pflanze infizierenden Wild-Typ Virus.

Abbildung 6: Nucleinsäuren, die als mögliche Rekombinations- und Rekonstitutionspartner zur Verfügung stehen: integrierte Vakzin DNA (inklusive viraler Promotoren, z.B. 35S), kryptische, virale Sequenzen mit möglicher Homologie, entsprechende Transkripte und infizierende Pflanzenviren (beabsichtigt: transiente Expression von chimären Viren; unbeabsichtigt: andere phytopathogene Viren).



Aaziz und Tepfer (1999) und eine Reihe weiterer dort zitierter Arbeiten zeigen, dass Rekombinationen zwischen dem Transkript eines viralen Transgens (hier: eine subgenomische Sequenz eines phytopathogenen Virus) und einem infizierenden Virus vorkommen kann. Darüber hinaus zeigten Teycheney et al. (2000), dass dieses Ereignis auch bei Mischinfektionen von Wild-Typ Viren mit großer Häufigkeit vorkommt. Schließlich konnten Varrelmann et al. (2000) erstmals zeigen, dass die Rekonstitution defekter Viren durch Komplementation, sowohl über die Rekombination mit einem Transgen-Transkript als auch mit einem viralen Expressionsvektor erfolgen kann.

Fraglich ist, ob diese Rekombinationen nur zwischen viralen Transkripten vorkommen oder ob jede mRNA in der infizierten Pflanze ein möglicher Rekombinationspartner ist. Geht

man davon aus, so steht natürlich auch das Transkript eines Vakzin-Gens für eine Rekombination zur Verfügung. Gleiches gilt dann natürlich auch für phytopathogene, chimäre Viren. In diesem Szenario, in der offensichtlich keine Möglichkeit zur Re- und Neukombination ausgeschlossen ist -und zwar unabhängig davon, ob die Pflanzen oder Viren gentechnisch verändert sind oder nicht- stellt sich die Frage, welche Konsequenzen damit verbunden sind?

5.3. Schlußfolgerung

Die Rekombinationen zwischen viralen und genomischen Nukleinsäuren und zwischen verschiedenen viralen Nukleinsäuren ist eine belegte Erkenntnis und nicht auf rekombinante DNA, RNA oder rekombinante Viren beschränkt. Außerdem scheinen virale Sequenzen zu einem nicht unerheblichen Prozentsatz Bestandteil pflanzlicher, nukleärer DNA zu sein. Können sie zur Rekonstitution oder Neukombination von virulenten Pflanzenviren oder tier- bzw. humanpathogenen Viren führen? Läßt sich ein „spezifisches“ Risiko identifizieren? Die konventionelle Züchtung virusresistenter Nutzpflanzen hat bereits zur Entwicklung virulenterer Virusstämme beigetragen. Wenn jedoch „bekannte“ Sequenzen verwendet werden, sei mit keinem höheren Risiko der Neukombination von virulenten Viren zu rechnen, meinen Falk und Breuning (1994). Dass der Umkehrschluß (unbekannte Sequenzen führen zu neuen, virulenteren Viren) richtig ist, dafür gibt es zur Zeit keinen stichhaltigen Hinweis. Selbst ein „worst-case-scenario“ -z.B. die Rekombination eines latenten Pararetrovirus (wie TPV) mit einem Vakzin-Gen- würde nur dann zur Rekonstitution dieses Virus führen, wenn das Vakzin-Gen eine fehlende Funktion vermittelt (wobei unklar ist, wie diese auszusehen hätte). Umgekehrt müßte ein latentes Pararetrovirus (z.B. BSV oder eine andere pflanzliche „kryptische“ DNA-Sequenz) dem Vakzin-Gen oder dem Transkript genau die Funktionen zur Verfügung stellen, die das Vakzin-Gen selbst zur Rekonstitution eines tier- oder humanpathogenen Virus braucht. Fraglich wäre dann noch, wie ein Infektionsweg konstruiert werden könnte. Dieses rekonstituierte Virus müßte zudem noch die Fähigkeit besitzen sich auch in der Pflanze systemisch auszubreiten.

Aus den bisher bekannten Arbeiten läßt sich schließen, dass die Voraussetzung für die Verbreitung des Rekombinationsproduktes offensichtlich eine weitgehende Rekonstitution einer vorher schon vorhandenen und selektierten Virulenz ist - eines bereits adaptierten und optimierten Produktes. Es ist davon auszugehen, dass die hohe Mutationsrate der Viren, ihre kurzen Replikationszyklen und die Rekombination zwischen ihnen zur schnellen Adaption und Variabilität beiträgt (Varrelmann et al. 2000). Offensichtlich läßt der Selektionsdruck unter gegebenen Umständen nur bestimmte Formen/Sequenzen/Strukturen zu. Im Hinblick auf die mögliche Entwicklung neuer Viren oder auf die „Revitalisierung“ latenter Viren läßt sich zur Zeit kein Szenario denken oder eine substantielle Arbeitshypothese entwickeln, die dieses Szenario stützen könnte. Die Tatsache, dass es sich theoretisch denken läßt, ist weder analytisch noch bei einer Bewertung hilfreich. Die Eintrittswahrscheinlichkeit konvergiert gegen Null und die Schadenshöhe erscheint nicht signifikant höher. In diesem Zusammenhang sollte auch die Frage nach den mit möglichen Alternativen (bzw. bereits angewandten Verfahren) verbundenen Risiken gestellt werden. Bio-pharmazeutische Produkte aus tierischen und menschlichen Zellkulturen stellen offensichtlich ein deutlich höheres Risiko dar. Dieses resultiert aus möglichen Kontaminationen, unzureichenden Inaktivierungsverfahren und auch durch latente Viren (siehe Diskussion zu Xenotransplantation), die in diesem Fall keine Spe-

zies-Barrieren zu überwinden haben (Damay und Larzal 2000; Institut Pasteur, Euroconference, 2.-3. März 2000, Paris, Frankreich).

Für die Abschätzung von Produktrisiken können sicherlich eben diese Erfahrungen aus klinischen Tests mit entsprechenden „konventionellen“ oder auch rekombinanten (aber nicht in Pflanzen produzierten) Vakzinen herangezogen werden. So ist das rekombinante HBsAg-Vakzin aus Hefen bereits seit 1984 zugelassen. Das ist eine Referenz für die Qualität eines möglichen Pflanzenproduktes, für eine Abschätzung möglicher Umwelteinflüsse jedoch wenig tauglich. Das rekombinante Norwalk-Virus Kapsidprotein, welches jüngst in Kartoffeln exprimiert und an Menschen getestet wurde (Tacket et al. 2000), ist ebenfalls kein gänzlich neues Produkt. Seit 1992 wird das rekombinante Vakzin in Baculovirus infizierten Insektenzellen produziert (unter Containment-Bedingungen). Es führt beim Menschen zu einer zumindest partiellen Immunität und befindet sich nach Ball et al. (1999) bereits in der klinischen Testphase.

Anmerkung zu den angesprochenen Viren

Im Gegensatz zu den meisten Pflanzenviren, deren Genom eine ssRNA (d.h. einzelsträngige RNA) ist, besitzen pflanzliche Caulimo- (z.B. „cauliflower mosaic virus“) und Badna-Viren dsDNA-Genome (d.h. doppelsträngige DNA) und nutzen eine reverse Transkriptase zur Vermehrung in der pflanzlichen Wirtszelle. Diese pflanzlichen Viren haben keine Integrase Funktion (d.h. falls eine Integration erfolgt, verläuft sie aller Wahrscheinlichkeit nach über eine illegitime Rekombination, deshalb: Pararetroviren). Mögliche Folgen einer Rekombination können sein: Mutation durch Insertion, Modifikation der Expression von, dem Integrationsort benachbarten, Genen oder die Entwicklung neuer repetitiver Sequenz-Familien (Jakowitsch et al. 1999). Ebenfalls zu den Pararetroviren gehört das Hepatitis B Virus (Hepadna-Viren), für das die Integration in das menschliche Genom und seine Assoziation mit Leber-Karzinomen bewiesen ist. Echte Retroviren sind in Pflanzen unbekannt, haben RNA-Genome und zeichnen sich durch den Besitz eines Integrase-Gens (*int*) und eines „Envelope“-Gens (*env*) aus. Bislang ist das „petunia vein-clearing virus“ das einzige Pflanzenvirus, welches eine Kernsequenz für eine Integrase besitzt¹⁴.

Auf phytopathogene Viren als Produktionssystem wird in Kapitel 4 näher eingegangen. Die Verwendung virulenter, rekombinanter Pflanzenviren fällt in Deutschland zumindest in die Sicherheitsstufe S2. Zwar wird an sicheren rekombinanten „Voll-Längenklonen“ gearbeitet, an eine Freisetzung oder an einen kommerziellen Anbau virulenter, rekombinanter Viren ist allerdings nur unter sehr restriktiven Maßnahmen zu denken, da eine Gefährdung der nach dem Gentechnikgesetz zu schützenden Güter sonst nicht auszuschließen ist – unabhängig von der Schwierigkeit dies politisch zu vermitteln.

5.4. Antikörper

Für die Produktion von Antikörpern in Pflanzen, einer späteren Aufreinigung und Verwendung zu diagnostischen Zwecken, läßt sich ein potentielles Risikoszenario nur schwer entwickeln. Die Verwendung polyklonaler Antikörper und partiell gereinigter Im-

¹⁴ Weitere wichtige Informationen zur Taxonomie und zu den Eigenschaften verschiedener Viren findet man unter www.ifgeb.uni-hannover.de/extern/ppigb/ppigb.htm oder www.virology.net.

munglobuline in medizinischen oder „aufgewerteten“ Nahrungsmitteln mag Rückschlüsse auf die Folgen eines möglichen, unbeabsichtigten Konsums durch den Menschen zulassen - für eine Risikobewertung der Freisetzung solcher Pflanzen ist dies nur wenig relevant, da Nichtzielorganismen unberücksichtigt sind. Daneben gibt es eine Reihe von Projekten, die sich mit der Antikörper-vermittelten Resistenz in Pflanzen gegen Phytopathogene, wie Viren und Nematoden beschäftigen (Baum et al. 1996, Anm. des Autors). Allerdings ist hier die Funktion der verwendeten scFv-Fragmente eine gänzlich andere und steht im Vordergrund einer Folgenabschätzung. In diesen Fällen ist an einen großflächigen Anbau gedacht. Vor allem für die Vermittlung von Virusresistenzen, wie sie zur Zeit meist durch Expression subgenomischer Pathogen-Sequenzen realisiert wird, soll die Expression von viruspezifischen scFV-Fragmenten eine „sichere“ Alternative sein.

Während für die Anwendungsseite zu erwarten ist, dass die therapeutischen oder diagnostischen Antikörper nur aufgereinigt (eine Immunaффinitätschromatographie kommt für scFv-Fragmente wohl nicht in Betracht, Fab-Fragmente lassen sich aber über z.B. Protein G-Säulen reinigen) verfügbar sind, ist vergleichsweise wenig über die Folgen einer oralen Aufnahme von Antikörpern bekannt. Das Beispiel polyklonaler Antikörper („Proventra“ bzw. „Basics Plus™“, GalaGen, Brower 1998) zeigt jedoch, dass diese Antikörper ihre Funktion im Magen-Darm-Trakt noch nicht verloren haben¹⁵. Ob das Immunsystem selbst durch die (orale) Aufnahme von Antikörpern angeregt werden kann, ist nach Wissen des Autors nicht belegt.

6. „Familiarity“: Eintrag nicht-biotischer Pharmazeutika?

Ein wichtiges Werkzeug in der Folgenabschätzung ist die Entwicklung von Modellen sowie der Rückgriff auf bereits bekannte Verfahren zur Folgenabschätzung. Da es in diesem Gutachten um die Abschätzung der möglichen Risiken aus der Freisetzung Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen geht, stellt sich die Frage, ob und wenn ja, wie entsprechende Untersuchungen zu den Folgen des Eintrags nicht-biotischer Pharmazeutika in die Umwelt für eine Risikobewertung herangezogen werden können.

Pflanzen werden seit Jahrtausenden vom Menschen für veterinär- und human-medizinische Zwecke angebaut, selektiert, gezüchtet und verarbeitet. Vor allem Produkte des Sekundärstoffwechsels, z.B. Morphin, Taxol, Acetylsalicylsäure, gehörten zu den ersten, rein dargestellten Medikamenten. Die moderne Pharmazie nutzt dabei biologische, chemische und physikalische Verfahren, um die aktiven Inhaltsstoffe zu identifizieren, aufzureinigen und zu prozessieren. Ziel ist dabei, die Nebenwirkungen zu verringern, die Wirkung zu standardisieren und natürliche Schwankungen zu minimieren, um eine höhere Anwendungssicherheit für eine größere Zahl von Patienten zu erzielen. Alkaloide, Terpenoide, Flavonoide, Glykoside - in allen Stoffgruppen finden sich Beispiele für Boten-, Lock- und Schreckstoffe, mit denen die Pflanzen mit ihrer Umwelt „kommunizieren“. Nach Kurz und Constabel (1998) führt eine Veränderung des Sekundärstoffwechsels (durch konventionelle Züchtung, z.B. Niedrig-Alkaloid Luzerne oder Null-Glucosinolat Raps, auch 00-Raps) nicht nur zu einer Änderung in

¹⁵ Das Produkt ist seit Dezember 1997 auf dem US-Markt zugelassen und enthält -allerdings keine rekombinanten- polyklonale Antikörper, Lactoferrin u.a., die an Bakterien des Gastrointestinaltraktes binden.

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

Qualität und/oder Quantität des Produktes, sondern auch zu Veränderungen der „Kommunikationsfähigkeit“, wie die Beispiele deutlich zeigen.

Nach Angaben von Ternes (pers. Mitteilung) gibt es keine Untersuchungen, die sich zum Beispiel mit der Umweltverträglichkeit des großflächigen Anbaus von Medizinalpflanzen beschäftigen. Hier könnte ja durchaus davon ausgegangen werden, dass diese Pflanzen im Anbauggebiet Exoten sind (die belebte Natur damit also keine Erfahrungen hat) oder Pflanzenreste und Inhaltstoffe in größeren Mengen freigesetzt werden¹⁶. Über die Wirkung hochwirksamer Pharmazeutika, die z.B. über Haushalts- und Krankenhausabwässer in die Umwelt gelangen, ist verhältnismäßig wenig bekannt (Daughton und Ternes 1999). Zwar besteht im Rahmen der Zulassung nach dem Arzneimittelgesetz (AMG) die Pflicht, sowohl Wirkung als auch eventuelle Nebenwirkungen zu spezifizieren, eine Beschreibung der Wirkung auf Nichtzielorganismen und mögliche andere Wirkketten ist allerdings nicht Gegenstand eines Zulassungsverfahrens.

Nach Römbke et al. (1996) stehen folgende Fragen im Zentrum einer Risikobeurteilung von pharmazeutischen Produkten:

- In welchen Mengen gelangen Pharmaka in die Umwelt?
- Welche Wirkungen können sie hervorrufen?
- Gibt es Beispiele für Umweltwirkungen von Pharmaka?
- Können die Wirkungen prognostiziert¹⁷ und beurteilt werden?

Eine entsprechende Risikoabschätzung erfolgt hier in vier Schritten:

1. Eine Gefährdungskennung; hierunter fallen Angaben zur Produktions- und Verordnungs menge, Indikation und Anwendung, Stoffmengen-Eintrag, Persistenz, stabile Metabolite, betroffene Umweltkompartimente und mögliche Expositionspfade. Erfasst wird auch, welche akuten oder subletalen Effekte (Mutagenität, Neuro- und Immuntoxizität) zu erwarten sind.
2. Expositionsanalyse; hierbei soll die mögliche wirksame Konzentration in den verschiedenen Umweltkompartimenten erfasst werden. Dabei müssen unterschiedliche Anwendungsgebiete berücksichtigt werden (zum Beispiel Landwirtschaft vs. Krankenhaus).
3. Wirkungsanalyse; bestimmt wird hier die Konzentration, bei der keine Wirkung auf die Umwelt zu erwarten ist. Hierbei werden Grenzwerte festgelegt, die aus der Extrapolation von Testdaten stammen und je nach Unsicherheit mit einem Sicherheitsfaktor verrechnet werden (dieser ist umso höher, je höher die Unsicherheit ist).
4. Risikocharakterisierung; hierbei wird die mögliche wirksame Konzentration mit der Konzentration verglichen, bei der keine Wirkung in der Umwelt zu erwarten ist.

Montforts et al. (1999) weisen in einer kritischen Analyse der gängigen Praxis -insbesondere der Expositionsanalyse- darauf hin, dass bereits in diesen Aussagen zur Risikoakzeptanz präjudiziert werden. Es läßt sich auch nicht vermeiden Grenzwerte festzulegen, die einen unmittelbaren Einfluß auf die Risikocharakterisierung haben. Auch im vorliegenden Gutachten ist bereits auf diese Problematik, d.h. die Rückkopplung von Bewertung und Analyse, hingewiesen worden (Seite 15). Die Vielzahl der möglichen Werte („trigger values“) und die

¹⁶ Dies ist ein Analogie-Schluß, der keinesfalls unterschlagen soll, dass die zur Zeit für die Produktion von Bio-Pharmazeutika verwendeten Pflanzen zum Teil eben auch Nahrungspflanzen sind!

¹⁷ Gemeint ist hier eine stoffspezifische, keine statistische Beurteilung.

nach Montforts et al. (1999) oft unlogische Reihenfolge in Entscheidungsbäumen erhöhen das Ausmaß der Unsicherheit der Expositionsanalyse und tragen eben nicht zu einer besseren Risikobewertung bei.

Auch Römbke et al. (1996) stellen fest, dass die Konzentrationsabschätzung nach „worst-case“ Modellen teils zu einer Überschätzung, jedoch nicht zu einer Unterschätzung der akuten Konzentrationen, z.B. in Oberflächengewässern, führt. In der Folge ist eine Abwägung von Nutzen und Risiken nicht mehr möglich, da die aus den „worst-case“ Szenarien ermittelten Expositionsgrenzwerte jede weitere Analyse bereits ausschließen. Als Stütze für mögliche Risikobewertungen wäre hier die Erarbeitung realistischer Expositions-Szenarien hilfreicher.

Lassen sich derartige Entscheidungsmuster und Strategien zur Folgenabschätzung im vorliegenden Fall sinnvoll nutzen? Diese Frage ist aus mehreren Gründen recht schwer zu beantworten:

- Antibiotika, Hormonpräparate, Kopfschmerzmittel und andere niedermolekulare Pharmazeutika unterscheiden sich sehr deutlich von Proteinen, Viren und Nukleinsäuren (wie sie im Zentrum der hier vorliegenden Betrachtung stehen),
- mögliche Auswirkungen des Eintrags von Pharmazeutika in die Umwelt werden meist im Zusammenhang mit der Anwendung, nicht der Produktion beurteilt,
- über die Umweltwirkung des Anbaus von Medizinalpflanzen ist so gut wie nichts bekannt,
- über die Expositionsmengen und Abbaukinetiken von Antikörpern, Vakzinen und Peptid-Hormonen im Boden oder aquatischen Systemen gibt es nur wenige Informationen,
- über die Auswirkungen des Eintrags von wenig persistenten Substanzen (z.B. Proteine und Peptide) liegen ebenfalls kaum Informationen vor,
- Angaben zu Produktionsmengen sind oft vertraulich.

Darüber hinaus haben die, eine mögliche Freisetzung und den Anbau, regulierenden Behörden Risiken für Mensch und Umwelt abzuschätzen (Rechtsgüter im Sinne der Gentechnikrechtlichen Regelungen sowie internationaler Abkommen, wie dem Cartagena-Protokoll). Es stellt sich die Frage, inwieweit hier der medizinische Nutzen des Produktes berücksichtigt werden kann und muß?

7. Zusammenfassung und Entwicklung eines Fragenkatalogs

In Pflanzen oder Pflanzenviren produzierte bio-pharmazeutische Produkte besitzen ein recht breites Wirkungsspektrum. Das allein verbietet schon eine allgemeine Aussage zu spezifischen Risiken. Zu diesem Schluß kommt auch Miele (1997), stellt aber gleichzeitig fest, dass die Produktion eines Antikörpers oder eines Cytokins in Pflanzen *a priori* kein höheres Risiko darstellt als die Expression einer Insektenresistenz. Es ist die Aufgabe des Gutachtens festzustellen, *welche spezifischen Risiken aus einer zukünftigen, auch großflächigen, Freisetzung dieser Pflanzen für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt zu identifizieren sind?* Zwar kommt das vorliegende Gutachten zu dem Schluß, das kein spezifisches Risiko vorliegt, folgt aber auch nicht der Ansicht von Miele (1997). Vielmehr zeigen die in der Folge formulierten Fragen, dass die Datenlage generalisierende Aussagen nicht zulassen.

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

Direkte Risiken durch ein Produkt

Da es sich bei der Mehrzahl der Produkte um Peptide und Proteine handelt, dürfte die Wirkung zunächst auf die Anbaufläche beschränkt sein. Eine Akkumulation ist wegen der vermutlich geringen Persistenz nicht zu erwarten. Die meisten Untersuchungen zu pharmazeutischen Produkten in der Umwelt beschränken sich auf niedermolekulare Substanzen (Hormone: z.B. Steroide; Antibiotika: z.B. Aminoglykoside) oder Mineralien oder Metalle (z.B. Oxal-Platin).

Um die mögliche *Exposition* abzuschätzen, sind folgende Fragen zu beantworten:

- Werden die Pflanzen freigesetzt bzw. im Freiland angebaut?
- Wie groß sind die zu erwartenden Freisetzungsf lächen und wie sind sie verteilt?
- Von welchen Organsimen, für/auf die eine pharmazeutische Wirkung wahrscheinlich ist, werden die Pflanzen konsumiert?
- Wird der Zugang zu den Pflanzen kontrolliert?
- Wird die Verbreitung dieser Pflanzen kontrolliert (siehe unter Kapitel 4)?
- Wenn nicht, gibt es verwandte Wild- oder Nutzpflanzen?
- Ist von einem Eintrag in die Umwelt (außerhalb der Pflanze bzw. der Freisetzungsf läche/Anbaufläche) auszugehen?
- Was ist über die Persistenz (in der „Natur“) des Produktes bekannt?

Um die mögliche *Wirkung* abzuschätzen wäre zu fragen:

- Gibt es Informationen zu kryptischen oder Mehrfachfunktionen des Produktes?
- Welche Auswirkungen hat das Produkt auf Mensch, Tier, Pflanze, Mikroorganismen?
- Wie wird das Produkt appliziert, ist eine Prozessierung notwendig?
- Ist etwas über andere Applikationsmethoden und deren Wirkung bekannt?
- Ist eine Wirkung bei oraler Aufnahme zu erwarten, wie schnell wird das Produkt abgebaut?
- Sind Veränderungen des Produktes durch das Produktionssystem wahrscheinlich, zu erwarten oder beobachtet worden?

In diesem Zusammenhang ist auch darüber nachzudenken, ob eine Klassifizierung nach möglichen Wirkungen möglich und nötig ist, wie es oben bereits angedeutet wurde. Lassen sich bestimmte Risikogruppen auf Grund von Funktion bzw. Struktur der eingebrachten Gene identifizieren? Zum Beispiel: Antikörper, Antikörper-Fragmente, Oligonucleotid-Vakzine, Komplett-Vakzine, Strukturproteine, Blutbestandteile, Peptidhormone, Enzyme etc.. Eine durch harmonisierte Kriterien und Parameter festgelegte Klassifizierung könnte entsprechende Risikoanalysen und Bewertungen erleichtern und objektivieren.

In jedem Fall wäre dazu ein neuer, interdisziplinärer Ansatz nötig, der Mediziner, Veterinärmediziner, Pharmazeuten, Toxikologen, Ökologen, Molekularbiologen, Agrarwissenschaftler und Chemiker an einen Tisch bringt (siehe dazu auch Monforts et al. 1999).

Verdeckte Risiken

Im Falle verdeckter Risiken sind entweder Exposition oder Wirkung nicht oder nur unzureichend vorherzusehen. Informationen über Wirkungsweise und Nebenwirkungen pharmazeutischer Produkte (unabhängig von ihrem Produktionsweg), lassen sich aus klinischen Studien und dem Zulassungsverfahren gewinnen.

Das Zulassungsverfahren ist jedoch:

- dem Antrag auf Freisetzung nachgelagert,
- beim Antrag auf Zulassung/In Verkehr bringen möglicherweise unzureichend – es handelt sich ja quasi um vermehrungsfähige, pharmazeutisch-medizinische Produkte,
- in seiner Analyse zunächst auf Risikoszenarien beschränkt, die aus der kontrollierten Anwendung resultieren und auf den Kosten/Nutzen für den/die Patienten fokussieren.

Verdeckte Risiken resultieren hier eventuell aus einem Mangel an Information und Wissen über die Wechselwirkungen mit der Umwelt. Die Frage der Exposition ist unter Umständen abhängig von Veränderungen der landwirtschaftlichen (Anbauverfahren) wie der medizinischen Praxis (Anwendungsverfahren). Die hier aufgeführten Beispiele haben gezeigt, dass die bisherigen Verfahren zur Folgenabschätzung durchaus in der Lage sind, Risiken vor einer Freisetzung zu identifizieren, soweit sie sich nicht von den Szenarien unterscheiden, wie sie für die transgenen Pflanzen der ersten Generation beschrieben sind. Fragen nach einer Risikobilanz (Nutzen und Risiko des Anbaus) sind unter Umständen sogar leichter zu beantworten als z.B. bei insektenresistenten Pflanzen¹⁸.

Insgesamt verlagert sich vermutlich der Schwerpunkt der Risikoanalyse und Risikobewertung. Weg von der Pflanze und dem in Frage stehenden Produkt, hin zur Analyse der „Sicherheitsmechanismen“. Die Produktion hochwirksamer Bio-Pharmazeutika in Nutz-, Wild- oder Zierpflanzen, die sich im Produktionsgebiet etablieren oder gar ausbreiten können, wird zu vermeiden oder nur unter strengsten Sicherheitsauflagen möglich sein. Gleiches gilt für transiente Expressionssysteme (z.B. phytopathogene Viren). Falls diese Viren in der Zielpflanze oder anderen Wirtspflanzen kompetitiv sind oder durch Rekombinationsereignisse mit entsprechenden Viren unter Beibehaltung der rekombinanten Sequenz kompetitiv werden, kommt ein Einsatz im Freiland wohl kaum in Betracht. Da die (unter unkontrollierten Bedingungen eher negative) Wirkung beabsichtigt ist, ist die Vermeidung oder Minimierung der Exposition anzustreben. Es ist daher zu erwarten, dass in der Risikobewertung die Evaluierung entsprechender Strategien einen vielleicht größeren Anteil einnimmt, als die Bewertung des Produktes selbst (siehe Kapitel 4).

„klassische“ Risiken

Auf die „klassischen“ Risiken, die oft in Zusammenhang mit freigesetzten LMOs diskutiert werden (Verwilderung, Invasivität durch horizontalen und vertikalen Gentransfer/Gendrift) ist hier nicht weiter eingegangen worden. Die „Gendrift“ ist eine durch experimentelle molekulargenetische Verfahren belegte Eigenschaft der DNA (Bertolla 1999; Nielsen et al. 1998) und damit *a priori* nicht als Risiko zu bewerten. Dies gilt auch für den Transfer von oral (in der Nahrung oder therapeutisch) aufgenommener DNA bzw. DNA-Fragmenten in die Zellen des Gastrointestinaltraktes und darüber hinaus (Schubbert et al. 1998) sowie in die Bakterien des Gastrointestinaltraktes (Doolittle 1998).

Darüber hinaus ist die Art der Produkte (z.B. scFv-Fragmente, virale Epitope, Peptidhormone), anders als Resistenzen gegen biotische und abiotische Stressoren, zunächst nicht geeignet, den entsprechenden Pflanzen einen selektiven Vorteil zu verschaffen - auch wenn über die Existenz und Funktion analoger Systeme (siehe 3.3.4., Interferone und Interleukine) trefflich spekuliert werden kann. Hilfreich wäre jedoch zu ermitteln, ob und in wel-

¹⁸ Abzuheben bzw. zu vergleichen wäre hier die Ökobilanz für Bt-Mais, z.B.: Auswirkung auf Nichtzielorganismen vs. Ersparnis an Insektiziden und anderen Pflanzenschutzmitteln.

GENE-FARMING: 3. FOLGENABSCHÄTZUNG - RISIKOBEWERTUNG

cher Menge entsprechende Sequenzen bereits jetzt für horizontale Gentransfers zur Verfügung stehen (Abwässer, Fäkalien etc.).

Fragen nach einer möglichen akuten Toxizität oder Allergenität oder einer Wirkung auf das endokrine System von Ziel- und Nichtzielorganismen erübrigen sich deshalb nicht, weil eine entsprechende Wirkung nicht nur wahrscheinlich, sondern beabsichtigt ist (z.B. Ricin-gekoppelte Antikörper, Neuropeptide, Opiate). Darüber hinaus steht zu vermuten, dass die Wirkungen und Nebenwirkungen der in Pflanzen produzierten Bio-Pharmazeutika auf Zielorganismen und Verwandte vergleichsweise genau charakterisiert sind. Problematisch ist jedoch, dass diese in der Regel für kontrollierte Anwendungen bestimmt werden. Dies wirft, auch und vor allem für den regulatorischen Bereich, eine ganze Reihe von Fragen auf, die unter Umständen auch für den Anbau von Medizinalpflanzen beantwortet werden müssen.

Kapitel 4: Maßnahmen zum Risiko-Management

1. Orientierung

Bei der Verwendung von Pflanzen für die kommerzielle Produktion medizinischer, veterinärmedizinischer und medizin-diagnostischer Produkte steht man sicherlich noch am Anfang einer Entwicklung. Jedoch haben erste Freisetzungen stattgefunden und eine Reihe von Produkten durchlaufen zur Zeit vorklinische und klinische Tests. Die Protagonisten rechnen mit den ersten kommerziellen Produkten innerhalb der nächsten 3-5 Jahre. Da die Diskussion um mögliche Umweltrisiken und Strategien zu deren Minimierung in den wissenschaftlichen Publikationen zur Zeit keine große Rolle spielt hat mehrere Gründe:

- Fragen der Anwendungssicherheit stehen zur Zeit im Vordergrund,
- mit einer/m großflächigen Freisetzung/Anbau ist nicht zu rechnen („speciality crops“),
- ein Anbau findet nicht im Rahmen konventioneller landwirtschaftlicher Produktion statt,
- Produktionsqualität und Reinheit sind besser unter Containment zu gewährleisten,
- pharmazeutische Produkte haben einen direkten Nutzen für die Konsumenten,
- die Minimierung der Exposition ist nötig, die Minimierung der Wirkung ist unmöglich.

Die in Kapitel 3 geführte Diskussion über mögliche Risiken sollte deutlich machen, dass es sich bei den Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen um eine neue Klasse von transgenen Pflanzen handelt. Dies gilt für die Art der generierten Produkte als auch für die angedachten Produktionsweisen. Das Umweltbundesamt hat mit der Ausschreibung dieses Gutachtens einen wichtigen Schritt unternommen und kann, durch Intensivierung der Kommunikation mit den anderen Zulassungsbehörden, Forschungsinstituten und der Industrie, frühzeitig wichtige Impulse für eine sichere Anwendung der „grünen“ Gentechnik bei der Produktion bio-pharmazeutischer Produkte geben.

Da eine Einschränkung der (Produkt-) Wirkung, wenn überhaupt, dann nur bedingt möglich ist, konzentrieren sich die hier dargestellten Management-Strategien auf die Minimierung der Exposition. Dies kann durch Organisationsmaßnahmen bei der Freisetzung realisiert werden (z.B. Restriktion auf bestimmte Flächen oder bestimmte Zeiten, Auswahl geeigneter Pflanzen und Produktionssysteme, landwirtschaftliche Verfahren) oder durch eine Reihe von "Containment"-Techniken. Denkbar sind:

- Ein *physikalisches* Containment,
- Ein *biologisches* Containment,
- Ein *prozeß-vermitteltes* Containment,
- Methoden, die eine Identifizierung und eine Überwachung/ein *Monitoring* erlauben.

Die Forschungsarbeiten und Ergebnisse über die im Folgenden berichtet wird, umfassen alle genannten Bereiche. Welche Strategien oder welche Kombination von Strategien den höchsten bzw. adäquaten Sicherheitsstandard liefern, hängt im wesentlichen von der Pflanze, den eingeführten Genen, der benötigten Produktionsmenge, dem nötigen Anbauverfahren und der Anwendung ab. Abgesehen von der möglichen Klassifizierung möglicher Produkte sind ebenfalls zu unterscheiden: Fälle, in denen größere Mengen eines Wirkstoffes benötigt werden (z.B. Vakzine, diagnostische Antikörper, Peptid-Hormone) und Fälle, in de-

nen schnell eine geringe Menge eines spezifischen Produktes benötigt wird, z.B. anti-ideotypische Antikörper (bei B-Zell-Lymphom Patienten). Letztere Produkte werden sicherlich, schon aus Gründen der Anwendungssicherheit, eher in zugangskontrollierten Gewächshäusern produziert. Viele der in Kapitel 2 beschriebenen Produkte werden zur Zeit auf andere Weise produziert, in bakteriellen oder tierischen Zellkulturen oder aus „natürlichen“ Quellen gewonnen (z.B. Schlachthausabfälle). Selbstverständlich muß die Produktion dieser Produkte in Pflanzen mindestens die gleichen Sicherheitsstandards erfüllen - oder mehr, da die Pflanzen vermehrungsfähig sind.

2. Physikalisch/Organisatorisch

2.1. Organisation

Die wohl einfachste, kostengünstigste und bei Einhaltung der Regeln auch sichere Methode ist die Vernichtung jedweden vermehrungsfähigen Materials nach einer Freisetzung. Eine Vielzahl entsprechender Freisetzungen in den USA erfolgte offensichtlich unter diesen Bedingungen (Jim White, Subhash Gupta, USDA-APHIS, pers. Mitteilung). Dies erklärt auch das Fehlen entsprechender Umweltverträglichkeitsprüfungen („Environmental Assessments“, EA) bzw. die Ausstellung „generischer“ EAs. Letztere enthalten nur Informationen über die Biologie der verwendeten Pflanze. Da die Exposition dieser transgenen Pflanze räumlich und zeitlich begrenzt ist, besteht nach dem Verständnis des USDA auch keine Notwendigkeit einer Analyse oder Bewertung eines nicht vorgesehenen (Risiko-) Szenarios. Entsprechende Maßnahmen und Auflagen umfassen die Kontrolle des Zugangs, die Isolation der Blüten (falls die generative Phase überhaupt erreicht wird) und die Ernte erfolgt von Hand. Je nach klimatischen Bedingungen erfolgt die Suche nach durchwachsenden Nachkommen („Volunteers“) und deren Vernichtung noch in der gleichen Vegetationsperiode oder in der anschließenden.

Dieses Verfahren ist effizient und ermöglicht auch eine rasche Bearbeitung entsprechender Anträge - eine Sicherheit ist jedoch nur bei strikter Einhaltung (und Überwachung) der Auflagen gewährleistet. Diese Strategie ist auch nur auf überschaubaren Parzellen (weniger als 1000 m²) möglich. Juristisch sicherlich einwandfrei, werden die Folgen einer illegalen oder unbeabsichtigten Ausbreitung nicht berücksichtigt (kein „fail-safe“ Verfahren). Die Notwendigkeit diese Möglichkeit hinreichend zu berücksichtigen bzw. der dafür als notwendig erachtete Aufwand mag sicherlich vom inhärenten Risiko des Produktes abhängen (z.B. Hämoglobin vs. Ricin). Die Berücksichtigung eines möglichen Versagens der Organisationsmaßnahmen schließt die Erstellung „generischer“ EA sicherlich aus.

2.2. Auswahl der Pflanzen

Der unbeabsichtigte Konsum von bio-pharmazeutischen Produkten oder eine mögliche Verwechslung ließe sich, neben anderen Verfahren, durch die Auswahl einer geeigneten Produktionsplattform minimieren, d.h. einer Pflanze, die weder als Nahrungs-, Futter-, Zier- oder Medizinalpflanze in Frage kommt oder verwendet wird. Natürlich hängt dies weitgehend von den klimatischen und biotischen Umweltbedingungen ab und auch von technischen Fra-

gen. Ideal wäre ein Exot mit bekannter Genetik und keinen kreuzbaren Verwandten im Freisetzungs-/Anbaugebiet. Ein Beispiel führt Jim Brandle (Southern Crop Protection and Food Research Centre, Kanada) an. Er verwendet Tabak in bestimmten Regionen Kanadas, da hier keine kreuzbaren Verwandten identifiziert wurden und die klimatischen Bedingungen eine Überwinterung nahezu ausschließen. Grundsätzlich kämen auch obligate oder strenge Selbstbefruchter in Frage, wie Erbsen oder bestimmte Gerstensorten (Horvarth et al. 2000; Altpeter, IPK Gatersleben, pers. Mitteilung). Alternativ kommen Pflanzen in Frage, die das Produkt, auch wegen ihrer hohen Biomasse-Produktion, schnell und in hoher Konzentration anreichern (z.B. einige Wurzel- und Knollenfrüchte oder Wasserpflanzen, siehe unten).

2.3. Geographisch, Minimaldistanzen

Für fremdbefruchtende Pflanzen wäre die gesonderte Ausweisung entsprechender Flächen und die Einhaltung von großzügig bemessenen Distanzen erforderlich. Anders als bei den transgenen, landwirtschaftlich genutzten Nutzpflanzen ist jedoch ein Grenzwert für „Kontaminationen“ eindeutig abzulehnen. Das heißt auch, dass die bisher üblichen Distanzen, z.B. für Raps, unzureichend sind. Nach Kinderlerer (pers. Mitteilung) haben die kanadischen Zulassungsbehörden für eine transgene Rapsorte eine Distanz von 500 km zu anderen Rapsanbauflächen gefordert. Nach unbestätigten Angaben wurde für Mais die bisher übliche Isolationsdistanz verdoppelt - offensichtlich gibt es aber für diese Maßnahme keine wissenschaftliche Begründung (Sicherheitspuffer?). In Frage kommen auch bestimmte Isolationslagen oder Sicherheitsgürtel. Allerdings wären in diesen Fällen eine ganze Reihe sicherheitsrelevanter Daten abzufragen, die eine Beurteilung der Effizienz dieser Maßnahmen erlaubt.

2.4. (geschlossene) aquatische Systeme

Wesentlich sinnvoller erscheint da die Verwendung von geschlossenen Systemen, wie Gewächshäusern, hydroponischen Kulturen oder aquatischen Produktionssystemen. Eine Möglichkeit wäre z.B. die Verwendung von Wasserpflanzen als Produktionssystem, wie sie von Erickson (Wasserlinse, *Lemna*, W54, IMFC) beschrieben wird. Entsprechende Systeme eignen sich vermutlich, auch auf Grund ihrer hohen Biomasse-Produktion, zur Herstellung komplexer Proteine (scFv-Fragmente oder Immuntoxine)¹⁹. Nach Erickson sind bereits eine Reihe heterologer Proteine in *Lemna* produziert worden. Je nach regulatorischen Restriktionen kann die Produktion in offenen aquatischen Systemen, in geschlossenen aquatischen Systemen oder in Fermentern erfolgen. Für die Produktion wäre eine Sekretion vorteilhaft, allerdings kommen für die Produktion pharmazeutisch wirksamer Produkte sicherlich nur geschlossenen Systeme in Frage. In Deutschland gibt es dazu einige öffentlich geförderte Projekte (Universität Bonn, RWTH Aachen, Fraunhofer Institut, Aachen). Private Initiativen/Projekte zur Produktion von Immuntoxinen und diagnostischen Antikörpern (insbesondere für die Krebsdiagnostik und Krebstherapie) in transgenen Pflanzen sind in den nächsten 2-3 Jahren sicherlich zu erwarten. Ungelöst sind bislang Fragen zur Abwasserbehandlung. Allerdings ließe sich hier auf Strategien und Erfahrungen zurückgreifen, wie sie bei der konventionellen Produktion (also in Fermentern) bereits durchgeführt bzw. gemacht wurden.

¹⁹ zu weiteren Details siehe deutsches Patent, Voeste, Dirk, Dr. DE 196 29 402, 5.2.1998

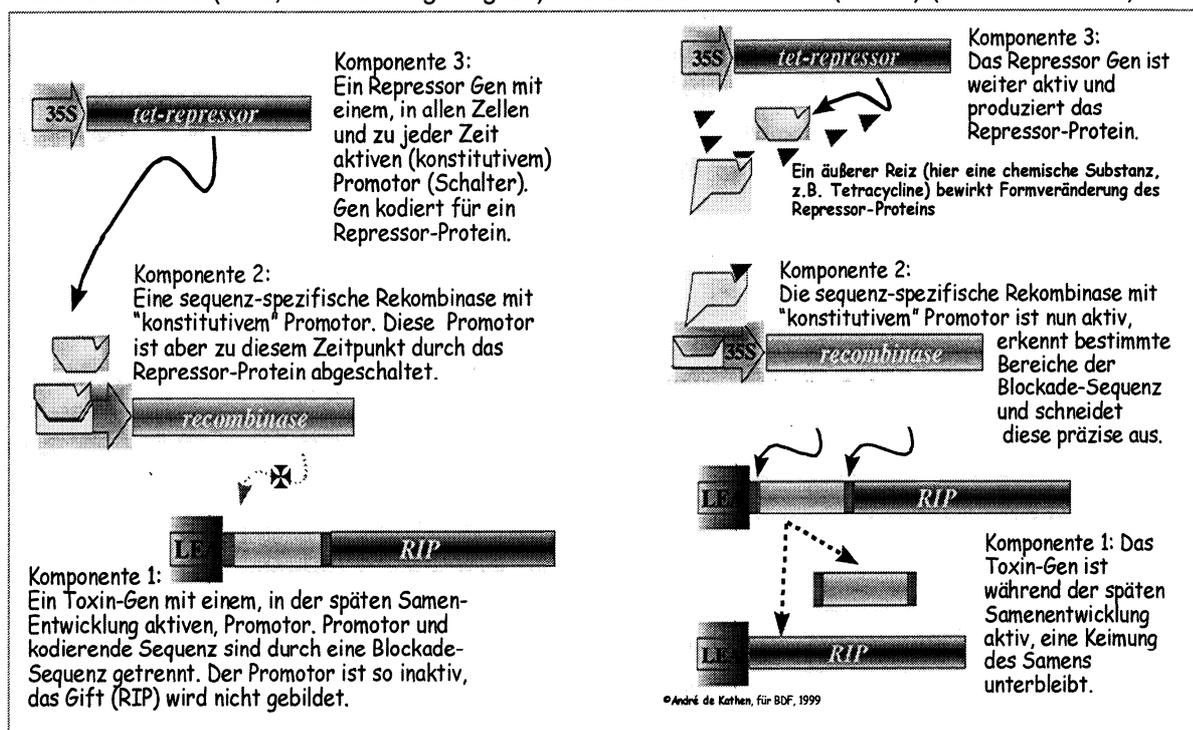
3. Biologisch

Unter dem Begriff „biologisches Containment“ werden hier Methoden und Verfahren zusammengefaßt, die entweder die Ausbreitung des Transgens, der transgenen Pflanze oder die Expression des Transgens (lokal, temporal) minimieren oder spezifizieren.

3.1. Minimierung von Ausbreitung und „gene-flow“

Vergleichsweise einfach läßt sich die Ausbreitung eines Transgens durch die Produktion der Bio-Pharmazeutika in selbstbefruchtenden Pflanzen minimieren (z.B. Erbsen). Ähnlich wirksam ist die Verwendung männlich steriler (konventionell oder gentechnisch hergestellter) Pflanzen. Gentechnisch ist dies zum Beispiel über die Expression Tapetum-spezifischer RNAsen realisiert worden, allerdings sind auch andere Verfahren denkbar. Werden „eßbare“ Vakzine in Früchten erzeugt, empfiehlt sich die Nutzung samenloser Varietäten/Mutanten (z.B. Tomate, Arntzen, pers. Mitteilung) - eine Ausbreitung über Samen (nach Ausscheidung) kann so verhindert werden (Ficcadenti et al. 1999).

Abbildung 7: Schematische Funktionsweise der Terminator-Technologie - dargestellt ist der inaktive Zustand (links, Vermehrung möglich) und der aktive Zustand (rechts) (de Kathen 1999)



In diesem Zusammenhang gewinnt auch die Nutzung der sogenannten Terminator-Technik wieder an Bedeutung. Während die Verwendung der „Terminator“-, GURT- oder „Traitor“-Technologie bei Nutzpflanzen eine Reihe sozioökonomischer Fragen aufwirft, erscheint sie bei der Produktion von Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen ein sinnvolles Mittel zu sein, jedwede Ausbreitung zu unterbinden (Abbildung 7). Das Saatgut wird so behandelt, das nur keimunfähige Samen entstehen. Sollte dieses Verfahren Praxisreife erlangen, sind Nachbau oder die Verwendung in der weitergehenden Züchtung ausgeschlossen.

3.2. gezielte Expression

Daniell et al. (1998) haben eine EPSP-Synthase aus Petunien (RoundUp[®]-insensitiv) stabil in das plastidäre Genom von Tabak eingebaut. Durch die meist maternale Vererbung des plastidären Genoms kann die Verbreitung des Transgens über Pollenflug weitgehend verhindert werden. Die Expression in Chloroplasten wird auch von einigen anderen Arbeitsgruppen verfolgt. Neben Sicherheitsgründen spielen dabei auch Fragen der Expressionshöhe und -stabilität eine große Rolle. Selbst hohe Kopienzahlen führen, anders als bei kern-kodierten Genen (siehe dazu de Neve et al. 1999, zur Überexpression von kern-kodierten Antikörpergenen), nicht zum Abschalten („silencing“) des Transgens. Staub et al. (2000, humanes Somatotropin) und McBride et al. (1995, Bt-Toxin), konnten vergleichsweise hohe Konzentrationen des heterologen Proteins/Peptids erzielen. Mit mehr als 7% des GLP erreichte man nicht nur ein kommerziell interessantes Expressionsniveau - dies ist auch ein Beitrag zur Risikominimierung, da mit steigendem Ertrag der Flächenbedarf sinkt. Darüber hinaus konnten Staub et al. (2000) zeigen, dass die Produktion eines korrekten Proteins, inklusive der Bildung von Disulfid-Brücken, in Chloroplasten möglich ist (bisher ist kein Plastid-kodiertes Protein mit Disulfid-Brücken bekannt).

Neben der Regulation der intrazellulären Verteilung eines heterologen Proteins, dies schließt auch die Sekretion in den Interzellularraum sowie die Akkumulation in Ölkörpern (Oleosin-Fusionen) ein, ist auch eine lokal oder temporal begrenzte Expression möglich. Die Entdeckung gewebe- und/oder entwicklungspezifischer Promotoren hat zu dieser Entwicklung entscheidend beigetragen. So können Bio-Pharmaka in Speicherorganen produziert werden (z.B. Getreide, wie Gerste, und Leguminosen, Horvath et al. 2000; Bohnen, Erbsen, Pickardt, pers. Mitteilung; Kartoffeln, Domansky et al. 1995) oder auch nur in Pollen - dies beschränkte die Expression auf bestimmte Organe und/oder bestimmte Entwicklungsphasen und würde mögliche Interaktionen des Produktes mit der Umwelt einschränken. Die Expression in bestimmten Pflanzenorganen, z.B. Pollen, Samen, Früchten oder Speicherorganen würde die Bewertung des möglichen Umwelt-Risikos erleichtern, da sich damit auch das Spektrum möglicher Konsumenten einschränken ließe. Theoretisch denkbar sind auch Defekt-Konstrukte regulatorischer Sequenzen, die nur in einem bestimmten transgenen Kreuzungsprodukt komplementiert werden.

3.3. Biologisches Containment bei transienter Expression durch Pflanzenviren

Auch wenn die Verwendung von phytopathogenen Pflanzenviren im Freiland zur Produktion von Bio-Pharmazeutika zur Zeit noch außerhalb der Diskussion steht, lassen sich auch hier Strategien entwickeln, die eine Ausbreitung verhindern können. Im Rahmen der BMBF-Ausschreibung „Sicherheitsforschung und Monitoring“ ist das Thema „Begrenzung der Ausbreitungsfähigkeit von GVO“ mit dem Hinweis auf die mögliche Verwendung von GVOs (=LMOs) als Bio-Reaktoren enthalten. Dazu hat sich auch ein Forschungsverbund gebildet, der neben der Entwicklung von Chloroplasten-Transformationssystemen und eines Systems zur induzierbaren männlichen Sterilität auch an der Entwicklung von Verfahren arbeitet, die eine sichere Anwendung viraler Expressionssysteme erlauben (Schiemann, BBA, und Commandeur, RWTH Aachen, pers. Mitteilung). In Analogie zu der unter 3.2. beschriebenen Komplementationsstrategie läßt sich hier ähnliches denken.

GENE-FARMING: 4. RISIKO-MANAGEMENT

So ließen sich z.B. rekombinante, defekte Viren konstruieren, die sich nur in einer transgenen, den Defekt komplementierenden Wirtspflanze vermehren können. Zu analysieren wäre, ob und wenn ja, mit welcher Frequenz eine Aquisition der komplementierenden Eigenschaft (Sequenz) über Rekombination möglich ist. Stehen induzierbare Promotoren zur Verfügung, ließe sich das virale Genom unter die Kontrolle eines solchen Promotors stellen. Die transgene Zielpflanze würde dann einen Transkriptionsaktivator produzieren - dies könnte ein Peptid oder ein spezifisches Stoffwechselprodukt sein.

Zu klären ist in beiden Fällen jedoch, ob die Funktionsblockade ausreichend ist und ob eine Komplementation in der transgenen Pflanze oder bei Misch-Infektionen mit Virus-Wildtypen auszuschließen ist. Auf jeden Fall sind beide Ansätze geeignet, die Sicherheit der Verwendung viraler Voll-Längenkclone drastisch zu erhöhen.

Weiterhin ließe sich die Sicherheit dadurch erhöhen, dass man Viren verwendet, für die eine Verbreitung nur über bestimmte Vektoren erfolgt -die dann zu kontrollieren wären- oder solche, die sich insgesamt nur schwer von Pflanze zu Pflanze übertragen lassen. Dalsgaard et al. (1998) führten mit dem Epitop des Nerz-Enteritis Virus in das Hüllproteingen des CPMV (Como-Virus) eine neue proteolytische Schnittstelle ein. Elektronenoptisch ergab sich keine Veränderung, erst bei SDS-PAGE wurde diese zusätzliche Schnittstelle erkannt. Zu denken wäre nun daran, ob nicht die gezielte Einführung bestimmter Peptidsequenzen z.B. eine Vektor-vermittelte Ausbreitung verhindern kann oder die Virulenz und Kompetitivität drastisch reduziert. Ließe sich also die Produktion des bio-pharmazeutischen Produktes an einen „attenuierten“ Vektor koppeln? Auch hier muß dann aber eine mögliche Komplementation verhindert werden.

4. Prozeß-vermittelt

Die Nutzung induzierbarer Promotoren erlaubt auch, die Expression während der Wachstumsphase im Freiland ganz zu unterbinden. Das jedenfalls berichtet Cramer (CropTech Corp., pers. Mitteilung). CropTech nutzt ein „post-harvest“ System (Nachernte-Verfahren), d.h. die Pflanzen wachsen unter Freilandbedingungen heran, dass die Produktion des Bio-Pharmazeutikums kodierende Gen ist allerdings nicht aktiv. Nach der Ernte wird die Genaktivität im noch frischen Pflanzenmaterial induziert, wobei das Produkt innerhalb der folgenden 24-48 Stunden akkumuliert und in der Folge isoliert werden kann. Die Ernte erfolgt vor der Blüte und die Vitalität der Tabakpflanzen erlaubt 3-5 Ernten während der vegetativen Phase.

Die Samenproduktion selbst kann leicht im Gewächshaus unter kontrollierten Bedingungen erfolgen. Ist die Produktion von Samen bzw. der Übergang in die generative Wachstumsphase allerdings nicht genetisch unterbunden, sind entsprechende Überwachungsmaßnahmen (siehe unter 2.) natürlich unumgänglich.

5. Nachweis und Monitoring

5.1. Information

Nicht vergessen werden sollte im Rahmen eines Sicherheitsmanagements der Faktor Information, der schon im Zusammenhang mit dem Einsatz geeigneter Markergene angesprochen wurde. Nicht nur im Zusammenhang mit Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen schreitet eine Entwicklung voran, die die Vielfalt transgener Nutzpflanzen durch eine Vielfalt von Funktionen ersetzt. Abgesehen von den sozio-ökonomischen und ökologischen Folgen einer weiteren Reduktion der Agrobiodiversität ist eine klare und detaillierte Kennzeichnung notwendig. Eine einfache Kennzeichnung „gefährlich“ oder „toxisch“ ist dann nicht ausreichend, wenn daraus keine möglichen Gegenmaßnahmen abgeleitet werden können. Es ist sicherlich nicht damit zu rechnen, dass in der überschaubaren Zukunft Medikamente in Tomaten oder Bananen in den Apotheken ausliegen. Werden allerdings keine hochaufgereinigten Produkte produziert, ist bei der Anwendung auf mögliche Allergien oder Intoleranzen zu achten²⁰. Ggf. ist das Produktionssystem anzugeben.

5.2. Markergene

In einer Reihe möglicher Management-Strategien spielt die Überwachung eine große Rolle. Da in einer ganzen Reihe von Fällen offensichtlich auf gängige Modellpflanzen und Nahrungs- oder Futtermittelpflanzen zurückgegriffen wird/wurde, sind Verfahren notwendig, die eine einfache Identifizierung ermöglichen bzw. die eine Verwechslung oder einen ungewollten Konsum unmöglich machen. Es muß sich dabei um stabile, phänotypisch sichtbare Markierungen handeln. Abhängig von der betroffenen Pflanze könnte dies über gezielte, auch gentechnisch vermittelte, Änderungen in der Farbe, dem Geruch oder Geschmack erreicht werden. Solche dominanten phänotypischen Marker (z.B. das *gfp*-Gen, Gene der Anthocyan-Synthese) wären, so die stabile Expression garantiert werden kann, auch ein geeignetes Mittel, um eine unbeabsichtigte oder illegale Ausbreitung zu verfolgen. Bisher ist eine solche Strategie nicht dokumentiert.

5.3. Methoden zur Identifizierung von Mikro-Veränderungen

Es ist zu erwarten, dass bio-pharmazeutische Produkte sich einem strengen Zulassungsverfahren unterwerfen müssen und in klinischen Tests Wirkungen und Nebenwirkungen analysiert werden. Darüber hinaus wird auch die Anwendung selbst auf eine definierte Personengruppe, meist unter ärztlicher Aufsicht, beschränkt bleiben. Dies gilt wohlgemerkt für pharmazeutisch-medizinische Produkte, nicht für „Nutraceuticals“.

Neben den „konventionellen“ Verfahren zur Erfassung von Wirkung und Nebenwirkung, die ggf. auch für eine Folgenanalyse bei Freisetzungen herangezogen werden können, sind in den letzten Jahren eine ganze Reihe von Verfahren entwickelt worden, die selbst kleinste Veränderungen in der Nukleinsäuresequenz, der Peptid- und Proteinstruktur und Verteilung sowie der Metabolite erlauben. Zwei-dimensionale Elektrophorese Verfahren er-

²⁰ So konnten in Mäusen keine IgGs gegen den in Tabak produzierten Antikörper nachgewiesen werden -siehe Chargeleague et al. 2000, Seite 38- wohl aber gab es Kreuzreaktionen mit Tabakproteinen, die als Verunreinigung mit appliziert wurden.

lauben die Auftrennung und Auflösung von mehr als 10.000 distinkten Proteinen und Peptiden, wobei bis zu 2.000 auch in Mengen detektiert werden, die ggf. eine Sequenzierung zulassen (Persidis 1998).

DNA-Chips erlauben die Sequenzierung und Detektion einzelner Nukleotid-Polymorphismen (Gilles et al. 1999) sowie die vergleichende Expressionsanalyse. Oligo-Nukleotid- und cDNA-Microarrays erreichen dabei Dichten von z.T. über 100.000 Sequenzen („features“) pro cm². Auch wenn zur Zeit mit deutlich geringeren Dichten gearbeitet wird, so ist dies auch ein Problem der Datenverarbeitung und eines sinnvollen experimentellen Designs (Lemieux et al. 1998).

Matrix-unterstützte Laser Desorption-Ionisation Massenspektroskopie (MALDI-MS) erlaubt die Identifikation von Peptiden und die Detektion und Charakterisierung post-translationaler Modifikationen an Gewebestücken und sogar an einzelnen Zellen (Li et al. 2000). Auch einzelne Nukleotid-Polymorphismen sind nachweisbar (Griffin und Smith 2000).

Es sollte daher möglich sein, auch Mikro-Veränderungen in der Nukleinsäure- und Proteinzusammensetzung von LMOs nachzuweisen. Dies gilt auch für die Detektion pflanzlicher Stoffwechselmetabolite. Als besonders interessant und attraktiv hat sich dabei die Kombination einer Kern-magnetischen/Kernspin Resonanz (NMR) Spektroskopie mit chromatographischen Separationsverfahren erwiesen. In ihrer vergleichenden Analyse (¹H-NMR bei 400 MHz) verschiedener transgener mit einer nicht-transgenen Tomaten-Linie konnten Noteborn et al. (2000) zwar nur wenige -mit der Aktivität des Transgens korrelierenden- Veränderungen feststellen, die Methode kann jedoch 2.500-3.000 Amplituden auflösen, die sich im Konzentrationsbereich mg/kg Frischgewicht bewegen. Konzentrationsunterschiede von weniger als 20% waren noch detektierbar. Möglich ist auch die Verfolgung von Metaboliten durch Verwendung von radioaktiven Isotopen (Roscher et al. 2000). Dies setzt aber eben den funktionierenden Stoffwechsel voraus und ist daher für Reihenuntersuchungen mit hohem Durchsatz wohl eher ungeeignet.

5.4. Informationsmanagement und Rückkopplung

Mit dem methodischen Rüstzeug in der Hand stellt sich aber sofort die Frage nach den Konsequenzen. Was bedeutet ein 1,2-2 mal höherer Gehalt an Zitronensäure oder Glutaminsäure? Welche Schlußfolgerung zieht man aus dem Auftreten eines oder zweier unbekannter „spots“ auf einem zweidimensionalen Proteingel oder aus einer neuen mRNA auf einem DNA-Chip? Wie interpretiert man den Austausch einer Aminosäure, wenn sich an der Funktion und den immunbiochemischen Eigenschaften eines Peptids oder Proteins nichts verändert hat? Welche Daten sind relevant und informativ und wer entscheidet auf welcher Grundlage über Referenzen und/oder Grenzwerte? Wie werden die Kosten verteilt?

Spätestens hier wird deutlich, dass sich diese Fragen nicht auf Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen oder transgene Pflanzen beschränken lassen. Um so detaillierter die Analyse-Methoden werden, um so wahrscheinlicher wird zwangsläufig die Feststellung von Unterschieden. Ziel der Risikoanalyse kann es aber allein nicht sein Daten zu sammeln und Unterschiede festzustellen. Die Daten müssen informativ und für eine Bewertung ausreichen und relevant sein und idealerweise auch Anleitung für mögliche Management-Strategien lie-

GENE-FARMING: 4. RISIKO-MANAGEMENT

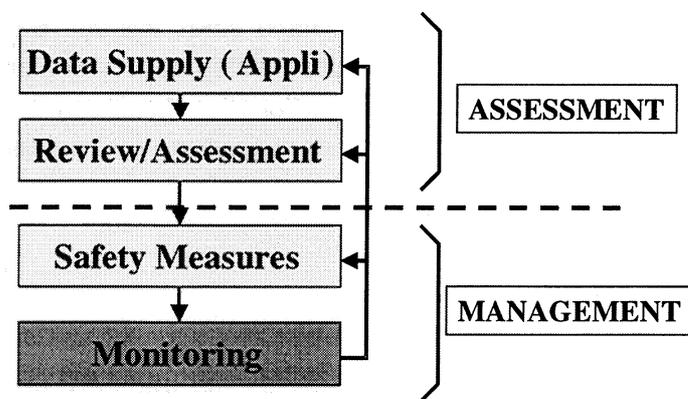
fern. So ist die Feststellung eines Unterschiedes zwischen einer transgenen Linie und ihrer Parental-Linie für eine Risikobewertung nur wenig hilfreich, wenn nicht:

- a) die sicherheitsrelevante Bedeutung dieses Unterschieds klar ist,
- b) die „natürliche“ Varianz ermittelt wurde.

Schon mehrfach hat das Fehlen von Referenzen bzw. der Mangel an vergleichenden Untersuchungen zu, im Nachhinein, überraschenden Ergebnissen geführt und deutlich gemacht, dass eine hohe Risikoakzeptanz (oder –ignoranz?) nicht unbedingt ein geringes Risiko impliziert (Ames et al. 1990a/b; Ames und Gold 1997; mehrere Ausgaben des Lancet 1999, Anonymous).

Es ist daher durchaus ein Vorteil, z.B. des Familiaritäts-Prinzips (zumindest von seiner Konzeption), dass die Berücksichtigung von Daten und Informationen aus verwandten

Abbildung 8: Rückkopplung von Risikobewertung und Risikomanagement und Monitoring (BioFACT)



Bereichen für eine Folgenabschätzung, insbesondere bei ungenügender Datenlage, nutzbar gemacht werden kann. Für die Bewertung Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen sollten daher Informationen aus der Anwendung pharmazeutischer Produkte, der Umweltwirkung pharmazeutischer Produkte, dem Anbau von Medizinalpflanzen und auch den verschiedenen Anbauverfahren herangezogen werden, soweit die Informationen auch für eine Risikobewertung nutzbar sind.

Mit anderen Worten, ein Auswahlkriterium ist der Wert, den die Information zur Klärung einer Frage beiträgt. Wie die Abbildung 8 zeigt, ist dazu eine Rückkopplung der verschiedenen Ebenen, von der Analyse, über die Bewertung, mögliche Management-Maßnahmen und ein sinnvolles Monitoring zu organisieren.

Kapitel 5: Forschungsbedarf

Die in den Kapiteln 2 und 3 beschriebenen Sachverhalte lassen es kaum zu, einen spezifischen Forschungsbedarf für Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen zu definieren. Dazu sind die möglichen Produkte zu divers. Andererseits kristallisieren sich einige spezifische Umstände heraus, die mit der Produktion von bio-pharmazeutischen Produkten in Pflanzen verbunden sind: spezifische Wirkung, neue Anbauverfahren, Management-Strategien, Verantwortlichkeiten bei Regulation und Überwachung. Forschungsprojekte und Programme, die Methoden zur Minimierung der Ausbreitung und der Exposition der transgenen Pflanzen, ihrer DNA oder des rekombinanten Produktes entwickeln sollen, laufen zur Zeit an (siehe z.B. BMBF-Programm). Bisher sind jedoch keine (experimentellen oder theoretischen) Konzepte, Programme oder Projekte identifiziert worden, die sich direkt mit der Umweltfolgenabschätzung der Freisetzung Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen beschäftigen.

Neben dem im Einzelfall zu prüfenden und zu bewertendem Risiko eines Anbaus Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen (Wirkung und Exposition, entsprechende Forschungsprojekte) stellt sich die Frage nach möglichen neuen konzeptionellen Ansätzen und Bewertungskriterien, die sowohl der Natur der Produkte als auch dem System der regulierenden Behörden und Institutionen gerecht werden.

1. Entwicklung von Analyse- und Bewertungskonzepten

Risikoanalysen können auf verschiedenen Ebenen, mit unterschiedlicher Intensität und Dauer und unterschiedlichem Kostenaufwand betrieben werden. Es wäre wünschenswert, wenn im Zusammenhang mit der Produktion von Bio-Pharmazeutika in Pflanzen Kriterien entwickelt werden können, die eine in ihrer Intensität abgestufte Risikoanalyse erlauben (Organisation der Rückkopplung von Bewertung und Analyse). Da bei der Produktion von Bio-Pharmazeutika in transgenen Pflanzen eine Verwechslung mit Nahrungs- oder Futterpflanzen auszuschließen ist und sowohl die Freisetzung als auch der Anbau und die Anwendung der Produkte unter kontrollierten Bedingungen stattfindet, dürfte eine intensive Risikoanalyse und -bewertung vor allem im Rahmen der Zulassung erfolgen. Wichtig wäre, schon im Vorfeld eines Freisetzungsantrages auf die Ergebnisse aus Tierexperimenten, vorklinischen und klinischen Studien zurückgreifen zu können.

Dabei wird die Produktion von Immuntoxinen oder Neurosekreten sicherlich eine andere Bewertung erfahren als die Produktion von Lactoferrin oder Immunglobulinen. Zu klären wäre, ob sich die Bio-Pharmazeutika dann im Hinblick auf ihre mögliche Umweltwirkung klassifizieren lassen und ob entsprechende Ergebnisse aus klinischen Studien eine Relevanz für die Identifizierung und Klassifizierung von möglichen Umweltwirkungen haben (Wirkung, Nebenwirkung, Persistenz).

Bedarf besteht hier an:

- > der Entwicklung eines geeigneten Kommunikationsmanagements,
- > der Evaluierung der Ergebnisse (Übersetzung im Hinblick auf die Umweltwirkung),
- > der Identifikation von Kriterien zur abgestuften Analyse möglicher Umweltwirkungen.

GENE-FARMING: 5. FORSCHUNGSBEDARF

Hierbei ist natürlich zu berücksichtigen, dass sich die Art und der Informationsgehalt der zu erhebenden Daten im Rahmen der Risikoanalyse für die Anwendung pharmazeutischer Produkte anders darstellt als für deren Freisetzung bzw. Anbau. Abgesehen von der Risikoanalyse (und der Identifikation geeigneter Auslöser) sind deshalb auch Ansätze zu ihrer Bewertung zu überprüfen. Eine **Risikobewertung** kann offensichtlich nur im Hinblick auf einen oder mehrere Bezugspunkte erfolgen.

Zu klären wäre beispielsweise, ob die Produktion von diagnostischen Antikörpern oder Impfstoffen in Pflanzen und deren mögliche Verbringung in die Umwelt mit Erfahrungen/Ergebnissen in anderen Bereichen (Krankenhaus- und Schlachtereiabwässer/-abfälle, Tier- und Nahrungsmittelproduktion etc.) vergleichbar ist oder ob und wie diese für eine Risikobewertung nutzbar sind. Möglich wäre auch eine Klassifizierung Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen nach Art der eingebrachten Gene (**Risikogruppen**):

1. Strukturproteine, wie Kollagen,
2. Antikörper, Fab- und scFv-Fragmente,
3. Blut- und Milchbestandteile mit z.T. noch unklaren Funktionen (Lactoferrin, Hämoglobin),
4. Antigene (Komplett-Vakzine oder verkürzte antigene Determinanten: Epitope),
5. Enzyme (z.B. Glucocerebrosidase),
6. Peptide und Proteine mit bekannter toxischer Wirkung bzw. Wirkungen auf das endokrine System, das Immunsystem oder andere wichtige Funktionen (Ricin, Interferon, Insulin, Hirudin).

Für alle Klassen lassen sich selbstverständlich Unterklassen bilden. So erscheint die Produktion eines viralen Minimal-Epitops unproblematischer als die Produktion Virus-ähnlicher Partikel. Analog gilt dies natürlich auch für Enzyme oder Peptidhormone. Eine weitere Klassifizierung mag sich auch aus der vorhandenen und abzufragenden Erfahrung bei der „konventionellen“ Produktion dieser (auch rekombinanten) Produkte ergeben. Fraglich ist auch, wie und in welchem Umfang möglicher Nutzen für die menschliche Gesundheit in eine Gesamtbewertung einfließt. Auch in diesem Fall wäre auf die Ergebnisse klinischer Studien bzw. des Zulassungsverfahrens zurückzugreifen.

Abgesehen von den Schwierigkeiten bei der Beurteilung der Wirkung auf Nichtzielorganismen, die im Rahmen eines Zulassungsverfahrens in der Regel unterbleibt, ist unter Umständen auch die weitere Verwertung der Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen zu untersuchen. Weitgehend ignoriert -und auch nicht Aufgabe des hier vorliegenden Gutachtens- wurde bisher die Frage nach spezifischen Risiken im Rahmen der Verarbeitung Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen. Anders als bei tierischen und menschlichen Zellkulturen ist bei pflanzlichem Material zunächst nicht mit kontaminierenden human- oder tierpathogenen Viren, Mycoplasmen, Hefen, Bakterien oder Pilzen zu rechnen. Sicherheitsmaßnahmen, wie sie zum Beispiel von Frommer et al. (1993 und 1989) zusammengefaßt und kommentiert wurden, mögen daher zunächst keine Anwendung finden. Darüber hinaus hat die Verarbeitung von Pflanzenmaterial eine durchaus sichere Geschichte.

Andererseits hat auch die Verwendung (pflanzlicher) **Abfallprodukte** aus biologischen/biotechnologischen Prozessen eine lange Tradition (z.B. Brauereiabfälle als Futtermittel oder Substrate für die Champignon-Zucht). Ähnliche Überlegungen sind für die Behandlung von Abwässern anzustellen (The Safety in Biotechnology Working Party of the Eu-

ropean Federation of Biotechnology 2000). Dabei ist zu beachten, dass die entsprechenden Verfahren effizient und vergleichsweise leicht zu validieren sind (z.B. Hitzebehandlung). In Zusammenhang mit möglicher Weiterverwendung des abgestorbenen Pflanzenmaterials (z.B. Stroh) und eines möglichen horizontalen Gentransfers wären z.B. die transgene, herbizidresistente Pflanzen anders zu beurteilen als die transgene, Vakzin-kodierende Pflanze.

2. Identifizierung möglicher Forschungsprojekte

Aus dem oben genannten Überlegungen lassen sich sicherlich eine ganze Reihe von möglichen **Forschungsprojekten** ableiten, die auf die in Kapitel 2 angeführten Risiko-Szenarien abheben. Andererseits wird eine Bewertung möglicher Risiken dadurch erschwert, dass zur Zeit nur wenige Referenzen existieren, an denen sich ein mögliches Risiko identifizieren und quantifizieren ließe. Dies gilt vor allem für die Frage nach möglichen Wirkungen auf Nichtzielorganismen. Aus diesem Grund sind für die Bewertung möglicher Risiken auch Forschungsprojekte interessant, die sich eben nicht konkret mit Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen auseinandersetzen. Mögliche Risiken und Referenzen in anderen Bereichen sind nicht deshalb einer vergleichenden Bewertung zugänglich, weil sie prinzipiell nicht existieren, sondern weil solche Untersuchungen nicht erfolgt sind. Die folgenden Fragen mögen dazu einen Eindruck vermitteln:

- Lassen sich Vakzine, Peptidhormone und Antikörper in Krankenhaus- und Schlachtereiabwässern nachweisen?
- Ist eine Wirkung festzustellen?
- Sind Methoden bekannt, die ggf. deren Eintrag und/oder Wirkung minimieren?
- Lösen phytopathogene Viren in der Nahrung Rekombinationsereignisse aus?
- Entstehen hier durch Rekombination und Komplementierung neue Viren?
- Welche Bedeutung hat z.B. die phylogenetische Verwandtschaft von Tosspoviren mit Hantaviren oder die Verwandtschaft des Blumenkohlmosaikvirus mit dem Hepatitis B Virus?
- Lassen sich realistische Szenarien oder Modelle für die Entstehung neuer Viren entwickeln?
- Lassen sich daraus Rückschlüsse für die Bewertung von rekombinanten, HIV-Epitope tragende Pflanzenviren ziehen?
- Welches Wirtsspektrum haben Neuropeptide und Immuntoxine?
- Gibt es Indikatororganismen?
- Welche Abbaukinetiken haben komplexe Proteine im Freiland?

Dies ist sicherlich nur eine Auswahl – die Beantwortung dieser Fragen hat aber den Vorteil, dass dazu nicht auf rekombinante Produkte zurückgegriffen werden muß und diese Experimente keiner Zulassung/Genehmigung bedürfen.

Weiterhin von großer Bedeutung ist die Entwicklung von Methoden zur Identifizierung von nicht vorherzusehenden Veränderungen in LMOs – die größten Risiken sind dort zu erwarten, wo keines erwartet wird. Einige Beispiele sind in Kapitel 4, Punkt 5 dargestellt worden. Wichtig ist dabei jedoch das experimentelle Design solcher Ansätze, auch um informative Ergebnisse im Hinblick auf die Definition von Referenzen oder „base-lines“ zu erzielen. Hier sollte z.B. untersucht werden, inwieweit klimatische Veränderungen oder Variationen in der landwirtschaftlichen Praxis zu Veränderungen beitragen. Zu untersuchen wäre dann auch, ob und wie die erhaltenen Daten mit Ergebnissen epidemiologischer Untersuchungen

korreliert sind. Wichtig sind jedoch weiterhin auch Forschungsprojekte, die sich mit einer sicheren Anwendung gentechnischer Verfahren auseinandersetzen, wie dies im Rahmen des o.g. BMBF-Programms geschieht. Allerdings bleibt abzuwarten, inwieweit die Ergebnisse zu einem Verständnis und zu einer Abschätzung möglicher Umweltrisiken bei großflächigen Freisetzungen beitragen können.

3. Empfehlung

Die Ergebnisse des Gutachtens zeigen deutlich, dass die Folgen möglicher Freisetzungen/Anbau transgener, Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen bislang nicht ausreichend thematisiert worden sind. Es konnten keine Publikationen, Forschungsprojekte oder -programme identifiziert werden, die sich wissenschaftlich/experimentell mit dieser Thematik auseinandersetzt. Auch im Bereich der OECD sind im Zusammenhang mit „molecular farming“ zunächst Fragen der sozio-ökonomischen Folgen und der öffentlichen Akzeptanz diskutiert worden (2 OECD-Workshops zum Thema, Balasz und Scheper, pers. Mitteilung und Proceedings). Die Interviews mit Wissenschaftlern, Firmenvertretern und Vertretern regulierender Behörden in den USA und Kanada zeigen jedoch, dass die Sensibilität für dieses Thema zunimmt und das auch -zumindest für die regulatorische Seite- Handlungsbedarf existiert.

Der Autor empfiehlt daher die Organisation eines Fachgesprächs mit Vertretern verschiedener Disziplinen (Pharmakologie, Toxikologie, Veterinär- und Humanmedizin, Ökologie, Molekularbiologie, Biochemie) unter Einbeziehung von Vertretern aus Wissenschaft und Industrie, die an der Thematik arbeiten. Mögliche Themen und Ziele eines solchen Fachgesprächs könnten sein:

- Identifizierung und Bewertung möglicher Umweltwirkungen (generell und exemplarisch, an ausgewählten Beispielen),
- Diskussion zur Praktikabilität und Ausgestaltung einer abgestuften Risikoanalyse (Entwicklung von Kriterien für Auslösung und Design einer Umweltfolgenabschätzung),
- Organisation der Kommunikation zwischen den Zulassungsbehörden für Freisetzung und Anwendung (z.B. UBA, RKI, BBA, BfArm, EMEA, BgVV...),
- Bewertung von Maßnahmen zur Minimierung der Exposition und Ausbreitung, ggf. Entwicklung eines entsprechenden Maßnahmenkatalogs ("state-of-the-art") zur Minimierung der Exposition, zur Kennzeichnung und zur Segregation,
- Identifikation von Parametern/Kriterien zur vergleichenden Bewertung von Umweltrisiken,
- Entwicklung informativer Forschungsprojekte zur möglichen Umweltwirkung
- Bewertung des Informationsgehaltes von „worst-case“ Szenarien,
- Entwicklung einer informativen und harmonisierten Datenerfassung und Datenverarbeitung (Folgerungen aus dem Cartagena-Protokoll),
- Ermittlung des Sachstandes (siehe obiger Fragenkatalog).

Diese Fragen sind zum Teil im Rahmen dieses Gutachtens beantwortet bzw. behandelt worden und können ggf. als Basis für ein Fachgespräch herangezogen werden. Dringend zu behandeln und zu thematisieren ist auch die Frage nach der Produktion von **Nutraceuticals** in transgenen Pflanzen (McLellan 2000; Meisel 1999)!

Kapitel 6: Zusammenfassung

6.1. Einführung und Aufgabenstellung

Seit der Produktion der ersten transgenen Pflanzen Mitte der 80er Jahre ist der Markt für transgene Nutzpflanzen, vor allem in den letzten fünf Jahren, beachtlich gewachsen. Der Marktwert transgener Nutzpflanzen, die in den Jahren 1999 und 2000 weltweit auf etwa 40 Millionen Hektar angebaut werden, erreicht mittlerweile ein Volumen von weit über zwei Milliarden ECU. Andererseits lassen sich diese Zahlen zu jeweils mehr als 95% auf 3 Länder (Argentinien, USA, Kanada), 3 Nutzpflanzen (Baumwolle, Mais, Sojabohne) und 2 Eigenschaften (Herbizid- und Insektenresistenz) zurückführen.

Damit ist natürlich das Potential der Gentechnik nicht erschöpft. Bei den Pflanzen der „ersten Generation“ steht die Verbesserung der agronomischen Eigenschaften im Vordergrund, sogenannter „input traits“. Angestrebt wird die Verbesserung von Ertrag und Ertragsstabilität durch Einbau von Resistenzen gegen biotische (z.B. Bakterien, Pilze, Viren, Insekten und Nematoden) und abiotische (z.B. Salz, Trockenheit) Stressoren. Darüber hinaus existieren bereits Protokolle zur gentechnischen Veränderung für mehr als 60 Pflanzenarten, darunter alle wichtigen Getreide, Leguminosen und auch Wurzel- und Knollenfrüchte, Gemüse und sogar Baumarten. Eine ganze Reihe dieser Pflanzen und Eigenschaften sind in den etwa 6.000 experimentellen Freisetzungen bereits getestet worden.

Weitgehend unbeachtet blieb dabei das Potential transgener Pflanzen als Produktionsstätten für (industrielle) Rohstoffe (Polymere, Öle und Fette, Kohlenhydrate), Enzyme und schließlich auch medizinisch-pharmazeutische Produkte. Bei diesen transgenen Pflanzen der „zweiten und dritten Generation“ steht die Entwicklung und Verbesserung sogenannter „output traits“ im Mittelpunkt. Obwohl bereits seit 1991 Bio-Pharmazeutika und Bio-Diagnostika produzierende, transgene Pflanzen im Freiland angebaut werden, meist als „genefarming“ bezeichnet, liegen nur wenige Informationen zu den eingebrachten Genen vor. Dies ist im wesentlichen darauf zurückzuführen, dass bisher noch keine lizenzierten oder kommerzialisierten Bio-Pharmazeutika aus Pflanzen auf dem Markt sind. Es fehlen auch experimentelle Daten zu möglichen spezifischen Umweltrisiken, da die bisherigen Freisetzungen, soweit bekannt, unter kontrollierten (containment) Bedingungen stattgefunden haben. Vor diesem Hintergrund war es die Aufgabe des vorliegenden Gutachtens:

1. den Stand der Wissenschaft zu dokumentieren,
2. die daraus resultierenden spezifischen Risiken zu identifizieren und zu bewerten,
3. mögliche Maßnahmen zur Minimierung dieser Risiken abzuleiten,
4. mögliche Lücken in der Sicherheitsforschung zu identifizieren.

Da die meisten Datenbanken (APHIS, OECD) nur unzureichende Informationen zur Freisetzung Bio-Pharmazeutika produzierender, transgener Pflanzen bereitstellen konnten und auch die angesprochenen Firmen natürlich eine sehr zurückhaltende Informationspolitik verfolgen, basiert ein großer Teil des Gutachtens zum *Stand der aktuellen wissenschaftlichen Entwicklung (Pflanzenarten/Entwicklungsstand/Arbeitsgruppen/Wirkung)* auf einer umfangreichen Literaturrecherche in 5 verschiedenen Datenbanken und Interviews mit etwa 20 führenden Wissenschaftlern weltweit.

Die Frage nach *spezifischen Risiken, die aus einer zukünftigen, auch großflächigen, Freisetzung dieser Pflanzen für Mensch, Tier, Pflanze und Umwelt zu identifizieren sind*, ist bislang weder experimentell noch theoretisch hinreichend adressiert worden. Hier lassen sich aber konzeptionell drei Risikogruppen unterscheiden:

1. Risiken durch das Produkt,
2. Risiken für das Produkt, bedingt durch Wechselwirkungen mit der Umwelt und durch das Produktionssystem,
3. Risiken für die Umwelt, bedingt durch Produktion/Anbau, Prozessierung, Anwendung oder Beseitigung.

Während die erste Gruppe eher durch die entsprechenden Zulassungsbehörden zu regeln ist (z.B. EMEA), steht vor allem die Analyse und Bewertung der Gruppen zwei und drei im Zentrum des Gutachtens. Da bislang keine experimentellen Daten existieren, sollten die folgenden Fragen den Zugang zu einer umfassenden Risikobetrachtung erleichtern:

- Ist eine Analyse spezifischer direkter Folgen bei Freisetzung möglich?
- Lassen sich sicherheitsrelevante Einflüsse *durch* die belebte/unbelebte Umwelt beschreiben und analysieren?
- Sind daraus resultierende spezifische Risiken *für* Mensch, Tier und Umwelt ableitbar?
- Lassen sich mögliche Szenarien außerhalb der direkten Ursache/Wirkung-Beziehung zumindest beschreiben oder gar bewerten?
- Lassen sich Risikogruppen identifizieren und kategorisieren (z.B. nach Wirkung/Funktion oder Struktur)?

Ausgehend von den identifizierten oder entwickelten Szenarien galt es auch festzustellen, *welche Maßnahmen zu entwickeln und abzuleiten sind, um eine sichere Handhabung zu gewährleisten*. Zwar läßt sich dies nur von Fall zu Fall definieren, andererseits existieren bereits eine ganze Reihe möglicher Management-Strategien, deren Bedeutung im Zusammenhang mit „gene-farming“ diskutiert wurde:

- *physikalisches* Containment, d.h. die physische Begrenzung von Freisetzung/Anbau, Produktion, Transport, Prozessierung und Entsorgung,
- *biologisches* Containment, d.h. die Minimierung der möglichen unbeabsichtigten Ausbreitung und Exposition der transgenen Pflanzen,
- *prozeß-vermitteltes* Containment, d.h. Produktionsstrategien, die eine Exposition des transgenen Produktes minimieren,
- Management, d.h. Maßnahmen und Methoden zur Überwachung und Identifizierung.

Schließlich sollte das vorliegende Gutachten die Frage beantworten, *welche Forschungslücken, in bezug auf die Sicherheitsforschung, identifiziert werden können und welche Vorschläge für eine weitere Forschung gemacht werden können?*

6.2. Stand der Wissenschaft

Eine Recherche in den Datenbanken von USDA-APHIS (USA) und der OECD über Freisetzungen Bio-Pharmazeutika produzierender, transgener Pflanzen konnte nur einen ersten, sehr groben Eindruck zum Stand der Wissenschaft vermitteln. Aus den Datenbanken lassen sich -zumindest für den Zeitraum bis 1998- folgende Schlüsse ziehen:

GENE-FARMING: 6. ZUSAMMENFASSUNG

- rekombinante Antikörper sind ein sehr wichtiges erstes Produkt aus Pflanzen (von 1993-1998 sind in den USA 43 Anträge gestellt worden, einer wurde abgelehnt, bis auf sechs Anträge wurden alle von der Firma Agracetus gestellt; Holzmann 1994),
- es wurden überwiegend Nutzpflanzen eingesetzt, die auch in der Nahrungs- und Futtermittelproduktion verwandt werden,
- die meisten Freisetzungen fanden in den USA statt,
- nur etwa 10% der Freisetzungen wurden von öffentlichen Forschungsinstitutionen durchgeführt,
- für 75% der Freisetzungen sind die sicherheitsrelevanten (= interessanten) Informationen als vertraulich gekennzeichnet,
- der Begriff „pharmaceuticals“ wird sehr weit und fehlerhaft verwendet.

Für Europa lassen sich im gleichen Zeitraum (bis 1998) nur wenige Freisetzungen ermitteln, die hauptsächlich in Frankreich und Spanien von BiocemSA bzw. Meristem Therapeutics (Limagrain Group) durchgeführt wurden.

Aufschlußreicher war die Analyse der wissenschaftlichen Literatur der Jahre 1994 bis 2000, die sich mit der Produktion bio-pharmazeutischer Produkte in Pflanzen beschäftigen. Die Auswahl der in der Tabelle 6 dargestellten Arbeiten zeigt die Diversität im Hinblick auf die verwendeten Pflanzen (Kartoffel, Spinat, Gurke, Kuherbse, Mais, Tabak, Luzerne, Reis, Gerste, Weizen, Raps, Zuckerrübe, Tomate und Sojabohne) und Produktionssysteme. Die stabile Transformation mittels *Agrobacterium* oder Partikelbeschuss sowie die Methode der Infektion von nicht-transgenen Pflanzen mittels phytopathogener, chimärer Viren (CPMV, TMV, TBSV, AIMV) wurden für die stabile oder transiente Expression Bio-Pharmazeutika kodierender Gene genutzt.

Produziert wurden eine ganze Reihe von Vakzinen gegen mindestens 15 verschiedene tier- oder humanpathogene Viren sowie eine Auswahl von Antikörpern (monoklonale, anti-ideotypische bzw. scFv) zu diagnostischen und immuntherapeutischen Zwecken oder gar als Kontrazeptivum.

Darüber hinaus wurden in Pflanzen auch therapeutisch einsetzbare Enzyme (z.B. Glucocerebrosidase, eines der teuersten Medikamente überhaupt, zur Behandlung der Gaucher Krankheit), Blut- und Milchbestandteile (Lactoferrin, Serumalbumin, Casein) und eine Reihe von Peptidhormonen produziert (z.B. Interleukine, Interferone, Wachstumshormone, Opiate).

Während zu Beginn der Entwicklung noch vergleichsweise niedrige Konzentrationen heterologer Proteine und Peptide erzielt wurden (0,01-0,1% des Gesamtproteingehaltes), werden nun Konzentrationen bis zu 10% erreicht. Damit ist die Gewinnung von Kilogramm-Mengen eines Antikörpers pro Hektar ein realistisches Szenario geworden. Dies ist von besonderer Bedeutung, da ökonomische und marktpolitische Faktoren eine immer größere Rolle für die Beantwortung der Frage spielen, welche Produkte in den nächsten Jahren zu erwarten sind.

GENE-FARMING: 6. ZUSAMMENFASSUNG

Tabelle 6: Arbeiten zur Produktion bio-pharmazeutischer Produkte in transgenen Pflanzen

Jahr/Autor	Krankheit/Erreger	eingef. Sequenz	transform. Pflanze/(Vektor)	Kategorie
Modelska et al. 1994	Tollwut/Rabies Virus	24 kDa-Glykoprotein	Tabak, Spinat (TMV, AIMV)	Vakzin, V
Dalsgaard et al. 1997	Enteritis, Nerz/MEV	VP2 Kapsid-Protein	Kuherbse (CPMV, CVP)	Vakzin, V
Carillo et al. 1998	MKS/FMDV	VP1 Kapsid-Protein	<i>A. thaliana</i> (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, V
Tuboly et al. 2000	Diarrhöe, Schwein/TGEV	spike Protein	Luzerne, Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, V
Castanon et al. 1999	Hämorr.Fieber/HDV	VP60 Kapsid-Prot.	Kartoffel (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, V
Eudes et al. 1999*	Diarrhöe, Rind/BVDV	E2 Glykoprotein	Gerste (Plasmid, PB)	Vakzin, V
Rymerson et al. 1999*	PRR-Syndrom/PRRSV	ORF5	Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, V
Allina et al. 1999*	or. Papillomatose/COPV	COPV L1	Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, V
Turpen et al. 1995	Malaria/Plasm. malariae	P.m. Epitop	Tabak (TMV)	Vakzin, H
Brennan et al. 1999a	Lungenentzündung/ <i>P.aer.</i>	Peptid 10, 18	Kuherbse (CPMV, CVP)	Vakzin, H
Brennan et al. 1999b	opportun. Inf./ <i>S.aureus</i>	FnBP D2 Domäne	Kuherbse (CPMV, CVP)	Vakzin, H
Arakawa et al. 1999b	Cholera/ <i>Vibrio cholerae</i>	CT-B Toxin	Kartoffel (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, H
Mason et al. 1998	Diarrhöe/ <i>E.coli</i> ETEC	Lt-B Toxin	Kartoffel (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, H
Tacket et al. 2000	Diarrhöe/Norwalk-Virus	NV Kapsid-Protein	Kartoffel (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, H
Walmsley et al. 2000	Hepatitis B/HB Virus	OF-Antigen	Kartoffel, Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, H
McCormick et al. 1999	B-Zell Lymphom	anti-ideotyp. Antiköörp.	Tabak (TMV)	Vakzin, H
Tackaberry et al. 1999	Zytomegalie/hCMV	Glykoprotein B	Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	Vakzin, H
Yusibov et al. 1997	AIDS/HIV	VP3, p24	Tabak, Gurke (TMV, Agro.,TBSV)	Vakzin, H
Koo et al. 1999	Encephalomyelitis/MHV	S-Protein Epitop	Tabak (TMV)	Vakzin, H
Ma&Jevnikar 1999	Transplantabstoßung	MHC-II	Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	AIR-Vakzin, H
Langridge et al. 1999*	Diabetes/GAD	GAD, Insulin CT-B	Kartoffel (<i>Agrobacterium</i>)	AIR-Vakzin, H
Zeitlin et al. 1998	<i>Herpes genitalis</i> /HSV-2	MAK	Sojabohne (Plasmid, PB)	plmmun, H
Stoger et al. 2000	Krebs/CEA	humanes scFv	Reis, Weizen (Plasmid, PB)	Diagnostik, H
Briggs et al. 1999*	<i>Herpes simplex</i> /HS1/2	MAK	Mais (Plasmid, PB)	plmmun, H
Ma et al. 1998	Karies/ <i>S.mutans</i>	MAK	Tabak (<i>Agrobacterium</i>)	plmmun, H
Vaquero et al. 1999	Krebs/CEA	MAK	Tabak (TMV)	Diagnostik, H
Briggs et al. 1999*	-./humane Spermien	MAK	Mais (stabil PB)	Kontrazeptiv.
Menassa et al. 1999*	IBD/-.	Interleukin IL-10	Tabak	Peptidhormon
Staub et al. 2000	Wachstumsstörung/-.	hSomatotropin	Tabak	Peptidhormon
Chong et al. 1999	Eisenbindung/-.	hLactoferrin	Kartoffel, Tomate, Reis	VAP-Milch
Arakawa et al. 1999	-./-.	h β -Casein	Kartoffel, Tomate	VAP-Milch
Takase et al. 1998	-./Regulation, Lactose	h α -Lactalbumin	Tabak	VAP-Milch
Diercyk et al. 1997	Blutersatz/Notfall	h Hämoglobin	Tabak, Mais	VAP-Blut
Sijmons et al. 1990	Blutersatz/Notfall	h Serumalbumin	Kartoffel, Tabak	VAP-Blut
Matsumura et al 1999*	-./-.	h Interferon α 2b/ α 8	Kartoffel	Peptidhormon
Panahi et al. 1999*	-./-.	IGF-1	n.b.	Peptidhormon
Sehnke et al. 1999	-./-.	Pre-Pro-Ricin	Tabak	Zellgift
Erickson et al. 1999*	-./-.	Schwein pEGF	Tabak	Peptidhormon
Cramer et al. 1996	Gaucher Krankheit/GCB	hGlukocerebrosidase	Tabak	Enzym
Cramer et al. 1996	-./-.	hProtein C, Blut	Tabak	Koagulation
Hogge et al. 1999*	-./-.	Hirudin, Blut	Raps	Koagulation

AIR: Autoimmunreaktion; VAP: Value added protein; plmmun: passive Immunisierung; H: Humanmedizin; V: Veterinärmedizin; h: humanes; MAK: monoklonaler Antikörper; Virusbezeichnungen: siehe Abkürzungsverzeichnis; *: Beitrag während der „International Molecular Farming Conference“, London, Kanada, 29. August - 1. September 1999

6.3. Mögliche spezifische Risiken

Zunächst erscheint der unkontrollierte Anbau von (transgenen) Bio-Pharmazeutika produzierenden Pflanzen -falls er überhaupt erfolgt- durchaus mit spezifischen Risiken verbunden zu sein. Erstens existieren nur wenige oder gar keine Daten zur Umweltwirkung des (großflächigen) Anbaus von Medizinalpflanzen, zweitens werden bisher überwiegend „klassische“ Nutzpflanzen verwendet, die als „Medizinalpflanzen“ unbekannt sind, drittens beschränkt sich die Analyse möglicher Wirkungen und Nebenwirkungen bio-pharmazeutischer Produkte auf definierte Applikationsformen und eine entsprechend indizierte Personengruppe (oder Tiergruppe) und viertens kommt mit der beabsichtigten therapeutisch-medizinischen Wirkung des Produktes ein Faktor hinzu, der bei einer Risikobewertung wohl zu berücksichtigen wäre. Darüber hinaus ist eine Vielzahl von Pflanzenarten, viralen Expressionssystemen und Produkten zu analysieren und zu bewerten. Obwohl eine Reihe von Freisetzen, hauptsächlich in den USA, transgener Pflanzen und rekombinanter Viren dokumentiert sind, ist die Anzahl der „Environmental Assessments“ verschwindend gering und der Zugang recht schwierig.

Konzeptionell lassen sich Risiken durch das Produkt, Risiken für das Produkt und Risiken für die Umwelt differenzieren. Die Analyse möglicher *Risiken durch das Produkt* kann dabei auf die Informationen und experimentellen Daten zurückgreifen, die bei der Entwicklung des Produktes erhoben wurden. In aller Regel sind die bio-pharmazeutischen Produkte ja nicht neu. Neu ist im wesentlichen das Produktionssystem. Dies ist ein kritischer Punkt, da bei einem Anbau weder die Art der Applikation kontrollierbar ist, noch die „Konsumenten“ beschränkt werden können (die Anwendung erfolgt quasi ohne ärztliche Kontrolle und ohne Rezept).

Risiken für das Produkt entstehen zum einen durch Wechselwirkungen der produzierenden Pflanze mit der belebten und unbelebten Umwelt. Hier ist zu fragen, ob biotische und/oder abiotische Faktoren oder das Anbauverfahren auf die Expressionsstabilität Einfluß nehmen oder ob Modifikationen denkbar sind. Von Bedeutung ist dies, falls die Pflanze als solche zu einem Medizinprodukt oder Medikament wird (dies wäre von der Zulassungsbehörde für Medikamente zu bewerten) oder wenn die Umweltfaktoren während des Anbaus zu signifikanten Veränderungen des Produktes führen, dann wäre eine Folgenabschätzung nicht nur für das Produkt, sondern auch für mögliche Varianten erforderlich (dies wäre von der Genehmigungsbehörde für Freisetzen zu bewerten). Ein weiteres Risiko für das Produkt ist die Auswahl des Produktionssystems. Pflanzen verwenden andere Glykosylierungsmuster für Proteine und differieren auch in der Nutzung bestimmter Basentriplets, die für die Aminosäureabfolge (die Primärstruktur des Proteins) entscheidend sein kann. Hier kann es zum Kettenabbruch kommen, zum Einbau zusätzlicher Protease-Schnittstellen oder zu Veränderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur (z.B. Disulfidbrücken).

Risiken für die Umwelt setzen voraus, dass für die Pflanzen eine Exposition wahrscheinlich ist. Angesichts der dokumentierten Wirkungen pharmazeutischer Produkte kommt daher neben der Bewertung von „Wirkungsrisiken“ auch der Bewertung von „Expositionsrisiken“ (bzw. Mechanismen, die diese minimieren sollen) eine besondere Bedeutung zu. Aus diesem Grund ließ sich auch die oben beschriebene Konzeption in der Risikoanalyse und Risikobewertung nicht durchhalten. Im Vorgriff auf eine mögliche Klassifizierung der bio-

GENE-FARMING: 6. ZUSAMMENFASSUNG

pharmazeutischen Produkte nach Funktion und Struktur wurden daher folgende Risikoszenarien eingehender betrachtet:

- veränderte Proteinstruktur,
- modifizierte und kryptische Funktionen,
- indirekte Wirkungen,
- Re- und Neukombination von Nukleinsäuren.

Veränderungen der Proteinstruktur und Proteinfunktion resultieren aus Transkriptions- und Translationsfehlern bei Expression in heterologen Systemen, aus Fehlern bei der Proteinfaltung und aus abweichenden Glykosylierungsmustern. Für alle Faktoren sind Beispiele genannt. Sie lassen sich in die ersten beiden Gruppen des oben genannten Konzeptes einordnen (Risiko durch und für das Produkt). Ob und wie diese Faktoren für eine Bewertung möglicher Umweltrisiken von Relevanz sind, läßt sich bisher nicht belegen, zumal davon auszugehen ist, dass nur solche Fälle für eine Freisetzung/einen Anbau in Frage kommen, für welche eine spätere Anwendung gesichert ist. Fraglich ist, ob dieses Kriterium ausreicht. Mit anderen Worten, ist eine unter dem Gesichtspunkt einer Anwendung erlaubte „Fehlertoleranz“ hinreichend, um auch mögliche Umweltwirkungen auszuschließen?

Im Hinblick auf mögliche Umweltwirkungen ist die Suche nach *kryptischen, modifizierten oder unerwarteten Funktionen* wesentlich interessanter. Auch hier belegen einige Beispiele, dass die eingebrachten Gene durchaus auch Funktionen im heterologen System übernehmen oder realisieren können, die bisher nicht oder nur unzureichend betrachtet worden sind. So ist zunächst nicht davon auszugehen, dass die Expression von Neuropeptiden oder die bestimmter Enzyme des menschlichen Pathogen-Abwehrsystems eine Wirkung in der Pflanze selbst vermitteln. Dafür gibt es allerdings auch Gegenbeispiele, wie die Interferon-vermittelte Virusresistenz, die Lactoferrin-vermittelte Toleranz gegen mikrobielle Infektionen sowie der Pathogen-induzierte Zelltod durch Expression des menschlichen 2'-5'-Adenylat-Systems. Mit anderen Worten, die Analyse und Bewertung möglicher Umweltrisiken beschränkt sich nicht allein auf die Identifizierung von Risiken für Nichtzielorganismen, sondern muß ggf. auch nach „Fitness“-relevanten Eigenschaften suchen, die durch die Produktion von Bio-Pharmazeutika möglicherweise vermittelt werden.

Mit *indirekten Wirkungen* sind solche gemeint, die aus der Produktion und Anwendung dieser transgenen Pflanzen resultieren, ohne sich direkt auf das Produkt zu beziehen. Auch dies ist in erster Linie für eine Bewertung möglicher Umweltrisiken nicht relevant. Für eine Gesamtbewertung des Risikos für die im Gentechnikgesetz beschriebenen Rechtsgüter allerdings schon, einschließlich der Vorteile, die aus einer kostengünstigen und raschen Produktion von Bio-Pharmazeutika für die tierische und menschliche Gesundheit erwachsen können. Hier sind auch die Risiken für die Gesundheit der Menschen zu bewerten, die z.B. an der „konventionellen“ Produktion von Vakzinen arbeiten, also menschliche Zellkulturen nutzen. Hinzu kommen Risiken, die aus veränderten Eßgewohnheiten, medizinischen Behandlungen oder veränderter landwirtschaftlicher Praxis resultieren.

Eine Verbindung mit der Diskussion -mittlerweile schon als „klassisch“ zu bezeichnende Risiken- über Viren, ergibt sich aus der Verwendung phytopathogener Viren sowie aus der Produktion von Vakzinen in transgenen Pflanzen. Hier stellt sich die Frage, ob die Expression subgenomischer Sequenzen human- oder tierpathogener Viren in Pflanzen oder phytopathogenen, chimären Viren -durch Re- und/oder Neukombination- zu neuen und mög-

licherweise virulenteren Viren führt. Nach dem Stand der Wissenschaft ist die Rekombination eines latenten Pararetrovirus, z.B. mit einem Vakzin-Gen, denkbar. Allerdings würde dies nur dann zur Rekonstitution des latenten Virus führen, wenn das Vakzin-Gen eine fehlende Funktion vermittelt. Umgekehrt müßte ein latentes Pararetrovirus dem Vakzin-Gen oder dem Transkript genau die Funktionen zur Verfügung stellen, die das Vakzin-Gen selbst zur Rekonstitution eines tier- oder humanpathogenen Virus braucht. Offen ist dann die Frage einer systemischen Ausbreitung in der Pflanze sowie die eines Infektionsweges zu Mensch und/oder Tier. Es ist davon auszugehen, dass die hohe Mutationsrate der Viren, ihre kurzen Replikationszyklen und die Rekombination zwischen ihnen zur schnellen Adaption und Variabilität beiträgt. Offensichtlich läßt der Selektionsdruck unter gegebenen Umständen nur bestimmte Formen/Sequenzen/Strukturen zu. Im Hinblick auf die mögliche Entwicklung neuer Viren oder auf die „Revitalisierung“ latenter Viren existiert bisher kein sinnvolles Szenario oder eine logische Kette von Ereignissen, welche die Existenz eines Risikos belegen oder rechtfertigen könnte.

Da offensichtlich nur wenige oder gar keine Arbeiten zur Analyse und Bewertung der Risiken des Anbaus transgener, Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen existieren, wurde überprüft, ob aus den Untersuchungen zum Eintrag nicht-biotischer Pharmazeutika Schlußfolgerungen gezogen oder Anleitungen gewonnen werden können. Offensichtlich existieren jedoch keine Arbeiten, die sich mit den Umweltwirkungen des großflächigen Anbaus von Medizinalpflanzen beschäftigen. Interessant sind jedoch eine Reihe von Studien zur Wirkung und zur Persistenz pharmazeutischer Produkte, die durch Krankenhaus- oder Schlachthausabwässer sowie durch die Ausbringung von Gülle und Mist in die Umwelt gelangen, vor allem in aquatische Systeme. Zwar ließen sich daraus Hinweise für eine Analyse und Bewertung biotischer Pharmazeutika gewinnen, andererseits handelt es sich um völlig andere Stoffklassen, nämlich Proteine und Peptide. Weder zur Eintragsmenge (z.B. aus Pflanzen in den Boden), noch zur Persistenz (im Boden und aquatischen Systemen) gibt es verlässliche Zahlen oder Schätzungen. Diese liegen allerdings auch nur eingeschränkt für die „konventionell“ erzeugten Produkte vor - hier sind allerdings mit der Produktion in tierischen und menschlichen Zellkulturen auch ganz andere Risikoszenarien denkbar.

Abschließend bemühte sich das Gutachten um eine Strukturierung der identifizierten möglichen Risiken - unter der Voraussetzung, dass transgene, Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen überhaupt großflächig und weitgehend unkontrolliert angebaut werden. Ein, nach Ansicht aller befragten Experten, eher unwahrscheinliches Szenario. Eine Klassifizierung bio-pharmazeutischer Produkte ist danach durchaus möglich und stellt eine vorausseilende Rückkopplung von Bewertung und Analyse dar, wie sie für nahezu alle Folgenabschätzungen faktisch angewandt werden. In Übereinstimmung mit der Bewertung des Effektes nicht-biotischer Pharmazeutika (dazu gehören Steroide, Aminoglykoside oder Mineralien) läßt sich auch für Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen ein Fragenkatalog zu Exposition und Wirkung erstellen. Dieser wäre sicherlich für eine Strukturierung und Harmonisierung der Risikoanalyse und Risikobewertung recht hilfreich.

6.4. Risiko-Management

Wegen der immanenten Wirkung pharmazeutischer Produkte verschiebt sich vermutlich der Schwerpunkt einer Folgenabschätzung von einer Bewertung des Produktes (Wir-

kungsanalyse) mehr zur Analyse der Stabilität und Wirksamkeit von Strategien zur Minimierung oder Vermeidung der Exposition (Expositionsanalyse). Folgerichtig beschränkt sich die Dokumentation von Strategien zum Risikomanagement im wesentlichen auf Maßnahmen zur Minimierung der Exposition. Dies kann durch organisatorische Maßnahmen bei der Freisetzung realisiert werden oder durch eine Reihe von "Containment"-Techniken. Denkbar sind ein *physikalisches* Containment, ein *biologisches* Containment, ein *prozeß-vermitteltes* Containment sowie Methoden, die eine Identifizierung und eine Überwachung/ein *Monitoring* erlauben. Die Tabelle 7 faßt einige der möglichen Management-Strategien zusammen.

Tabelle 7: Kategorisierung und Beschreibung von möglichen Maßnahmen zu Minimierung der Umwelt-Exposition bio-pharmazeutischer Produkte transgener Pflanzen

Kategorie	Methodik
Organisation	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Restriktion auf bestimmte Flächen oder bestimmte Zeiten, ➤ Auswahl geeigneter Pflanzen und Produktionssysteme, ➤ landwirtschaftliche Verfahren, ➤ größere Minimalabstände zu anderen Pflanzen, ➤ kontrollierte Zugänge.
Biologisch	Minimierung der Ausbreitung: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Terminator-Technologie, ➤ Parthenokarpie, ➤ männliche Sterilität, ➤ Expression in bestimmten Organen, Organellen, zu bestimmten Zeiten. bei Viren: <ul style="list-style-type: none"> ➤ Verwendung von Defektkonstrukten, ➤ gezielte Einschränkung des Wirtsspektrums.
Prozeß-vermittelt	Induzierbare Promotoren, die eine Expression unter Freilandbedingungen ausschließen.
Nachweis und Monitoring	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Information über Produktion und Prozessierung, ➤ Verwendung von dominanten Markergenen, ➤ Entwicklung von hochauflösenden Nachweisverfahren, ➤ Entwicklung eines hocheffizienten Informationsmanagements.

Natürlich unterscheiden sich die einzelnen Verfahren und Methoden durch die vermittelte Sicherheit, ihre Durchführbarkeit, ihren Erfahrungshorizont und den mit ihrer Anwendung bzw. Entwicklung verbundenen Kosten. Selbstverständlich sind Kombinationen möglich und muß im Einzelfall entschieden werden, welches Verfahren -oder welche Kombination- dem erwarteten oder identifizierten Risiko (unter Berücksichtigung des möglichen Nutzens für Umwelt und Gesundheit) entspricht.

6.5. **Schlußfolgerung und Forschungsbedarf**

Auf den ersten Blick scheint eine besondere Analyse und Bewertung möglicher Risiken bei der Produktion von Bio-Pharmazeutika in transgenen Pflanzen durchaus gerechtfertigt. Folgende Gründe sprechen dafür:

- rekombinante pharmazeutische Produkte in Pflanzen sind ein junges Forschungsfeld, die Erfahrung ist gering,
- pharmazeutische Produkte beabsichtigen eine Wirkung auf Mensch,
- einige Produktionssysteme nutzen Nahrungs- oder andere Nutzpflanzen,
- für die Bewertung möglicher Wirkungen und Nebenwirkungen dient der kranke Patient als Referenz; dies gilt nicht für die Bewertung von Risiken die aus dem Anbau resultieren können,

- Bio-Pharmazeutika produzierende Pflanzen sind „vermehrungsfähig“.

Auf den zweiten Blick wird deutlich, dass die Produktion pharmazeutisch wirksamer Substanzen in Pflanzen insgesamt in der Regel nicht von einer Folgenabschätzung oder Umweltverträglichkeitsprüfung begleitet wird. So hat die Produktion von Medikamenten, Düften, Farben und Geschmacksstoffen in Pflanzen und die Modifikation entsprechender Sekundärstoffwechselwege durch Züchtung und Mutation eine lange Geschichte, Umweltfolgenabschätzungen sind jedoch rar. Löst man eine Risikobetrachtung von den politischen und regulatorischen Vorgaben, so ist schwerlich zu vermitteln, warum eine in ihrem Alkaloidgehalt modifizierte Tabakpflanze (durch Züchtung und Selektion, d.h. weitgehend unkontrolliert) ohne Umweltfolgenanalyse freigesetzt werden kann, während die transgene, Kollagen produzierende Pflanze einer besonderen Betrachtung bedarf. Mit anderen Worten, es gibt nur sehr wenige Referenzen oder Angelpunkte, die für eine Bewertung eines identifizierten Risikofaktors herangezogen werden können.

Im Hinblick auf mögliche Forschungsprojekte und -programme sollte deshalb nicht allein auf transgene Pflanze abgehoben werden. Da es ebenso an Referenzen mangelt, die eine Bewertung erleichtern oder gar erst ermöglichen, können eine ganze Reihe von Fragen auch in „nicht-transgenen“ Szenarien beantwortet werden - so z.B. lassen sich Vakzine, Peptidhormone und Antikörper in Krankenhaus- und Schlachtereiabwässern nachweisen und ist eine Umweltwirkung festzustellen? Oder, welche Bedeutung hat z.B. die phylogenetische Verwandtschaft von Tospoviren mit Hantaviren oder die Verwandtschaft des Blumenkohlmosaikvirus mit dem Hepatitis B Virus? Ein entscheidendes Förderkriterium muß sein, ob die entsprechenden Projekte informative Daten liefern, dass heißt Daten, die für eine Risikoanalyse und eine Risikobewertung auch relevant sind.

Mögliche spezifische Risiken resultieren auch nicht allein aus dem Anbau transgener, Bio-Pharmazeutika produzierender Pflanzen. Mit der (Wieder-)entdeckung präventiver medizinischer Maßnahmen, dem zunehmenden Wissen über die Langzeitwirkungen bestimmter Bestandteile unserer Nahrung (epidemiologische Analysen verknüpft mit der weiteren Aufklärung physiologischer Wirkketten) und dem Bedürfnis nach aufgewerteten Nahrungsmitteln (Stichworte: „Nutraceuticals“ und „Functional Food“) wird auch der Bereich der Manipulation des Sekundärstoffwechsels in Zukunft von großem Interesse sein. Zu vermuten ist eine Verlagerung der Produktion von Additiven (z.B. Vitaminpräparate) in pflanzlichen Zell- und Organkulturen hin zu einer Modifikation der Pflanze selbst („Golden Rice“ ist nur ein Anfang). Der Autor empfiehlt daher die Organisation eines Fachgesprächs mit Vertretern verschiedener Disziplinen (Pharmakologie, Toxikologie, Veterinär- und Humanmedizin, Ökologie, Molekularbiologie, Biochemie) unter Einbeziehung von Vertretern aus Wissenschaft, Industrie und Nicht-Regierungsorganisationen, die sich mit den formulierten Fragestellungen, aber eben auch mit den dargestellten Randgebieten, (insbesondere „nutraceuticals“ und „functional food“) eingehend auseinandersetzen. Das vorliegende Gutachten könnte dazu eine Grundlage liefern.

Kapitel 7: Executive Summary

7.1. Introduction and Objective

Since the mid 80ies, when the first transgenic plant was produced, the market for transgenic crops has grown remarkably, especially in the last five years. The market volume for transgenic crops, grown on almost 40 million ha, exceeded 2 billion US\$ in the year 1999 and 2000. On the other hand, with respect to these numbers, USA, Argentina and Canada account for more than 95% of the area, cotton, maize and soybean account for more than 95% of the crops and insect- and virus-resistance account for more than 95% of the traits.

However, this does not reflect the potential of plant genetic engineering. The transgenic crops of the so-called "first generation" have improved agronomic traits, or "input traits". Higher yield and better yield-stability was envisaged by introducing resistances against biotic (e.g. bacteria, fungi, viruses, insects and nematodes) and abiotic (e.g. salt, drought) stressors. Now, transformation protocols have been developed for more than 60 plant species, among them all important cereals, legumes and also root and tuber crops, vegetables and, indeed, trees. Many of these plants and traits have been tested in more than 6.000 experimental releases.

Largely ignored, or yet not recognised, is the potential of transgenic crops as production plant -or bioreactor- for industrial raw materials (polymers, oil, carbohydrates), enzymes (industrial and medicinal purposes) and medical and pharmaceutical products. These transgenic "second and third generation" plants, focus on improving or generating so-called "output traits". Since 1991, transgenic plants producing bio-pharmaceuticals and bio-diagnostics have been released into the environment, often described as "gene-farming". Until now, there is no licensed, transgenic, plant-derived product on the market and therefore, there is also only limited information available on the introduced genes and no experimental data on potential, specific environmental risks. With this background, the current report aims at:

1. documenting the "state-of-the-art",
2. identifying and evaluating resulting potential and specific risks,
3. deriving potential measures for minimising those risks,
4. identifying possible gaps in (bio-)safety research.

The search in release databases (including those of APHIS and OECD) does only provide very few details on field releases of transgenic, bio-pharmaceuticals producing plants. Since products are not commercialised, corporates follow a very restricted information policy. Therefore, most of the information provided in the "state-of-the-art" report is based on a substantial literature survey in 5 different databases and interviews with about 20 leading scientists in this area. The question on specific risks, resulting from a potential future large-scale release of these crops for humans, animals, plants and environment, hasn't been addressed sufficiently, neither experimentally nor theoretically. This might be due to the fact, that it is still in question if these uncontrolled releases ever happen. However, the report identified, conceptionally, three groups of risks:

1. risks inherited by the product,

GENE-FARMING: 7. EXECUTIVE SUMMARY

2. risks for the product, resulting from interaction with the environment,
3. risks for the environment, resulting from production, processing, application or disposal.

Whereas the first issue has to be dealt with by the respective drug approving agencies (in Europe: EMEA), analysing the second and third group is within the focus of environmental risk assessment. Since data and information is limited, answering the following questions were thought to facilitate initial steps towards assessing potential risks:

- Is it possible to predict and identify specific, direct impacts of the product upon field release?
- Is it possible to identify and analyse environmental factors, relevant for the safety assessment?
- From there, can we deduce specific risks for humans, animals and the environment?
- Is it possible to describe or even evaluate scenarios, beyond the direct cause-effect relationship?
- Is it possible to identify and categorise potential risks (e.g. according to function or structure)?

Proceeding from the identified or developed scenarios, the second task was to determine potential measures, enabling the safe use and release of these transgenic crops. Although, this has to be defined case-by-case, there are a number of management strategies available, which have been discussed in the context of "gene-farming":

- physical containment, i.e. the physical restriction of release, transport, processing and disposal,
- biological containment, i.e. minimising unintentional release and exposure by biological measures (including recombinant approaches),
- process-mediated containment, i.e. production strategies, minimising exposure,
- management, i.e. measures/procedures facilitating surveillance and identification.

Finally, the current report had to identify research gaps, with special emphasis on safety issues, and had to formulate prime targets for respective research.

7.2. State-of-the-Art

The search in the USDA-APHIS and OECD-databases on releases of transgenic crops producing bio-pharmaceuticals only provided a first, very rough impression on the "state-of-the-art" of research and development in this field. This is mainly due to the fact, that details on the genetic modification are very difficult to get. However, the following conclusions can be drawn from this search:

- recombinant antibodies are the most important products of "gene-farming" (from 1993-1998, 43 applications are documented for the USA, one was rejected and all except six, were submitted by Agracetus),
- crop plants were used, which are also used for food and feed,
- most releases took place in the USA,
- only about 10% of the applications were filed by public research institutions,
- for 75% of the applications, details on the construct used are classified as confidential business information,
- there is a substantial misuse of the term "pharmaceuticals".

GENE-FARMING: 7. EXECUTIVE SUMMARY

Table 8: Selected reports on the production of bio-pharmaceuticals in transgenic plants

Year/Author	Disease/Cause	introduc. sequence	transgenic species/(vector)	category
Modelska et al. 1994	Rabies/Virus	24 kDa-glykoprotein	tobacco, spinach (TMV, AIMV)	vaccine, V
Dalsgaard et al. 1997	Enteritis, Mink/MEV	VP2 capsid protein	cowpea (CPMV, CVP)	vaccine, V
Carillo et al. 1998	MKS/FMDV	VP1 capsid protein	<i>A. thaliana</i> (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, V
Tuboly et al. 2000	diarrhea, pigs/TGEV	spike protein	lucerne, tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, V
Castanon et al. 1999	haemorr. fever/HDV	VP60 capsid prot.	potato (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, V
Eudes et al. 1999*	diarrhea, cow/BVDV	E2 glykoprotein	barley (plasmid, PB)	vaccine, V
Rymerson et al. 1999*	PRR-syndrome/PRRSV	ORF5	tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, V
Allina et al. 1999*	or. papillomatosis COPV	COPV L1	tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, V
Turpen et al. 1995	malaria/ <i>Plasm. malariae</i>	P.m. epitope	tobacco (TMV)	vaccine, H
Brennan et al. 1999a	pneumonia/ <i>P. aeruginosa</i>	peptid 10, 18	cowpea (CPMV, CVP)	vaccine, H
Brennan et al. 1999b	opportun. inf./ <i>S. aureus</i>	FnBP D2 domain	cowpea (CPMV, CVP)	vaccine, H
Arakawa et al. 1999b	cholera/ <i>Vibrio cholerae</i>	CT-B toxin	potato (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, H
Mason et al. 1998	diarrhea/ <i>E.coli</i> ETEC	Lt-B toxin	potato (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, H
Tacket et al. 2000	diarrhea/Norwalk-Virus	NV capsid protein	potato (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, H
Walmsley et al. 2000	hepatitis B/HB Virus	OF-antigen	potato, tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, H
McCormick et al. 1999	B-cell lymphom	anti-ideotyp. antibody	tobacco (TMV)	vaccine, H
Tackaberry et al. 1999	cytomegalie/hCMV	glykoprotein B	tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	vaccine, H
Yusibov et al. 1997	AIDS/HIV	VP3, p24	tobac., cucum.(TMV, <i>Agro</i> ,TBSV)	vaccine, H
Koo et al. 1999	encephalomyelitis/MHV	S-protein epitope	tobacco (TMV)	vaccine, H
Ma&Jevnikar 1999	transplant rejection	MHC-II	tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	air-vaccine, H
Langridge et al. 1999*	diabetes/GAD	GAD, insulin CT-B	potato (<i>Agrobacterium</i>)	air-vaccine, H
Zeitlin et al. 1998	herpes genitalis/HSV-2	MAB	soybean (plasmid, PB)	plmmun, H
Stoger et al. 2000	cancer/CEA	human scFv	rice, wheat (plasmid, PB)	diagnostic, H
Briggs et al. 1999*	herpes simplex/HS1/2	MAB	maize (plasmid, PB)	plmmun, H
Ma et al. 1998	caries/ <i>S.mutans</i>	MAB	tobacco (<i>Agrobacterium</i>)	plmmun, H
Vaquero et al. 1999	cancer/CEA	MAB	tobacco (TMV)	diagnostic, H
Briggs et al. 1999*	-./human sperms	MAB	maize (stabil PB)	contrazeptive
Menassa et al. 1999*	IBD/-.-	interleukine IL-10	tobacco	hormone
Staub et al. 2000	growth disorder/-.-	h somatotropin	tobacco	hormone
Chong et al. 1999	iron-binding/-.-	h lactoferrin	potato, tomato, rice	VAP-milk
Arakawa et al. 1999	-./-.-	h β -casein	potato, tomato	VAP-milk
Takase et al. 1998	-./regulation, lactose	h α -lactalbumin	tobacco	VAP-milk
Dieryck et al. 1997	blood subst./emergency	h hemoglobin	tobacco, maize	VAP-blood
Sijmons et al. 1990	blood subst./emergency	h serumalbumin	potato, tobacco	VAP-blood
Matsumura et al 1999*	-./-.-	h interferone α 2b/ α 8	potato	hormone
Panahi et al. 1999*	-./-.-	IGF-1	n.b.	hormone
Sehnke et al. 1999	-./-.-	pre-pro-ricin	tobacco	cell-toxin
Erickson et al. 1999*	-./-.-	swine pEGF	tobacco	hormone
Cramer et al. 1996	Gaucher disease/GCB	h glukocerebrosidase	tobacco	enzyme
Cramer et al. 1996	-./-.-	h protein C	tobacco	coagulation
Hogge et al. 1999*	-./-.-	hirudin	rapeseed/canola	coagulation

air: autoimmune-response; VAP: Value added protein; plmmun: passive immunisation; H: human medicine; V: veterinary medicine; h: human; MAB: monoclonal antibody; Viruses, see abbreviations; *: contribution at the "International Molecular Farming Conference", London, Canada, 29. August - 1. September 1999

GENE-FARMING: 7. EXECUTIVE SUMMARY

For Europe, there is only a limited number of reports (until 1998) on field releases of bio-pharmaceutical producing plants, mainly or exclusively carried out in Spain and France by BiocenSA or Meristem Therapeutics (belonging to the Limagrain Group).

A literature survey (1994 to 2000) was more informative with respect to the production of bio-pharmaceuticals in plants. The selection of products and publications, summarised in table 8, clearly demonstrates the diversity of plants used (potato, spinach, cucumber, cow-pea, maize, tobacco, lucerne, rice, barley, wheat, rapeseed, sugarbeet, tomato and soybean) and production systems developed. Stable transformation of plants using *Agrobacterium* or particle bombardment or infection of non-transgenic host-plants by phytopathogenic, chimeric viruses (CPMV, TMV, TBSV, AIMV), both strategies were used for the stable or transient expression of genes encoding bio-pharmaceuticals.

A number of vaccines has been generated against, at least, 15 different animal- or human-pathogenic viruses as well as a selection of antibodies (monoclonal, anti-ideotypic and also single-chain fragments) for diagnostic and immunetherapeutic purposes, even as contraceptives. In addition, therapeutic enzymes (e.g. human glucocerebrosidase, one of the most expensive drugs, for treatment of the Gaucher-disease), blood- and milk-proteins (human lactoferrin, serumalbumin, casein) and a number of peptide hormones (e.g. interleukines and interferones, growth factors) have been produced in transgenic plants.

Whereas at the beginning, the yield of heterologous proteins from transgenic plants was comparably low (0.01-0.1% of the total soluble protein), concentrations of up to 10% are now achieved. Therefore, the production of kg-amounts of a specific antibody per hectare has become a realistic scenario. This is important, because economic issues tend to play a more and more important role in answering the question, which bio-pharmaceutical products can be expected to be produced in transgenic plants in the coming years.

7.3. Possible specific risks

For the time being, the uncontrolled release of (transgenic) plants producing bio-pharmaceuticals -if this ever happens- appears to be related with specific risks. First, because there is only a limited amount (if at all) of data available on the potential environmental impact of large-scale releases of medicinal plants, from which experience could be drawn. Second, because classical food and feed crops are mainly used, which are hardly known as "medicinal plants". Third, the analysis of potential effects and side-effects is restricted to a defined mode of application and a specified group of humans or animals. And fourth, with the intended therapeutic and medicinal effect of respective products, an additional factor is introduced, and may need to be considered, in the overall risk assessment procedure. Moreover, there is a multitude of plant species, viral expression systems and products to be analysed and evaluated. Finally, although a number of permits for release into the environment have been granted, especially in the USA, the number of "environmental assessments" and access to details is limited.

As a concept, risks inherited by the product, risks for the product and risks for the environment can be discriminated. The analysis of *risks inherited by the product* can profit from informations and experimental data, acquired during the development of the product. As

GENE-FARMING: 7. EXECUTIVE SUMMARY

a rule, many of the bio-pharmaceutical products in question are not new. The production system is new. This is a critical issue, since neither the application form nor the group of "consumers" is controlled, if these transgenic plants are commercially released.

Risks for the product are likely, because of the interaction of the transgenic plant with its biotic and abiotic environment. The question is, do biotic and/or abiotic factors influence the expression-stability of the introduced genes or do we have to expect modifications. This is important, provided the plant itself becomes a medical product or drug (this is an issue to be dealt with by the approving authority) or, if these environmental factors induce significant modifications of the product during planting, then there is a need to analyse not only the product itself but also its modified derivatives (this is an issue to be dealt with by the authority, regulating the release). An additional risk for the product is related to the production system itself. Proteins produced in plants appear to have specific glycosylation-patterns, differences in codon-usage may cause ribosome stalling or may significantly influence the aminoacid-sequence (the primary structure of proteins), resulting in additional proteolytic sites or modifications of the secondary and tertiary structure (e.g. di-sulfide bonds).

Risks for the environment by transgenic plants are only possible, if they are likely to be exposed to the environment. Reflecting the intended effect of pharmaceutical products, and besides the evaluation of the "effect-risk", analysing the "exposure-risk" -and measures for minimising it- gain importance. For that reason, it was impossible to follow the categorisation of risks described above. Already considering a possible classification of bio-pharmaceutical products according to structure and function, the following risk-groups have been considered in more detail:

- > modified protein structures,
- > modified and/or cryptic functions,
- > indirect effects,
- > recombination of nucleic acids.

Modifications of protein structure and protein function result from translational and/or transcriptional errors in heterologous expression systems, from errors during protein folding or altered glycosylation- and processing-patterns. For all these modifications, the current report has identified and described examples. These examples fall into the first two categories of the previous concept: risks for and by the product. If and how these factors are of any relevance for an environmental assessment, is not yet known. Since it can be assumed, that only those products will be produced under field conditions, for which a medicinal application is envisaged, modified products are rather unlikely to reach the field. It remains unclear, if this criterion is sufficient. In other words, can we exclude any unwanted environmental effect in the field, if the "margin of failure" is determined by the quality needs.

With respect to possible environmental effects, the search for cryptic and unexpected functions is more rewarding. Also here, the current report provides a number of examples, demonstrating the fact, that the products encoded by the introduced genes can function in a heterologous system, sometimes in a way not seriously considered or analysed. *A priori*, one may not expect that the expression of human hormones or enzymes involved in the pathogen-defense system of mammals, do have -or can realise- a function in plants. But there are examples, like the interferone-mediated virus-resistance, the lactoferrin-mediated tolerance against microbial infections or the pathogen-induced cell death in plant cells,

GENE-FARMING: 7. EXECUTIVE SUMMARY

expressing the human 2'-5'-adenylate-system. In other words, the analysis and evaluation of potential environmental risks is not restricted to the identification of risks for non-target organisms, but must even look for possible "fitness" relevant traits, realised by the expression of bio-pharmaceuticals.

Indirect effects on human health and environment result from the production and application of bio-pharmaceuticals from transgenic plants, but are not directly related to the product itself. This may not be a prime target for the evaluation of environmental risks. But for a complete risk assessment, considering the public goods described in the German Genetic Engineering Act, one may need to address the potential improvement of human and animal health (this includes the health for the worker, considering the fact, that the production of vaccines in human cell cultures represents a risk) and impacts resulting from changes in habit, medicinal applications or agricultural production.

A link to the discussion on almost "classical" risks related to transgenic plants, emerges from the use of phytopathogenic, chimeric viruses and from the production of vaccines in transgenic plants. The question is: is the expression of subgenomic sequences of pathogenic human or animal viruses in plants or phytopathogenic, recombinant viruses likely to result - via recombination- in new, potentially more virulent, viruses. It is "state-of-the-art", that the recombination between, for example, a latent para-retrovirus and a vaccine-encoding gene is theoretically possible - although it hasn't been directly observed yet. But, this will only lead to the reconstitution of the latent para-retrovirus, if the vaccine-encoding sequence provides exactly the feature needed. In turn, a latent para-retrovirus has to provide exactly the feature needed by a vaccine-transcript to become a reconstituted or new virus, able to systematically infect the plant - and then, there is still the open question of transmission and systemic spread of this virus. It can be assumed, from all the scientific evidence available, that a high mutation rate, short replication cycles and numerous recombination events contribute to the adaptability and variability of viruses in general. Obviously, selection pressure allows only a very limited number of structures and sequences. With respect to the development of new viruses or the "revitalisation" of latent viral sequences, there is no reasonable scenario or logical chain yet visible, supporting or justifying this concern.

Since there are only few or even no research results available, facilitating the analysis and assessment of risks resulting from the release of transgenic plants producing bio-pharmaceuticals, it has been analysed, if we can draw conclusions or can develop guidelines from the influx of "non-biotic" pharmaceuticals into the environment. Obviously, there are no publications, dealing with the impact on environment of the large-scale release of medicinal plants. However, there are a number of studies on the effect and persistence of pharmaceuticals, released into the environment - by waste water from hospitals, sewage from slaughterhouses and manure as organic fertiliser. Although, this experience may provide some hints in assessing the risks resulting from bio-pharmaceuticals, these represent a different class of chemicals, namely proteins and peptides. Reliable data neither exist for the influx volume (e.g. from plants into soil) nor for their persistence in soil or aquatic systems. Respective experience could be deduced from the "conventional" production systems - however, the use of animal and human cell cultures includes completely different risk-scenarios as well.

Finally, the current study intended to develop a structure, incorporating the identified potential risks - under the assumption, that transgenic plants, producing bio-pharmaceuticals are indeed released on a large scale and under more or less uncontrolled and unrestricted conditions. However, this scenario is, according to all experts consulted, very unlikely. Nevertheless, a classification of bio-pharmaceutical products should be possible and represents an advanced feedback mechanism of assessment and analysis, as it is typical for almost all assessment strategies. In accordance with the assessment of "non-biotic" pharmaceuticals (this includes low-molecular weight chemicals and minerals like steroids, aminoglycosides, platinum-salts), a guiding catalogue of questions on exposure and effect of bio-pharmaceuticals produced in plants can be developed. This would be an important and helpful contribution to structure and harmonise respective risk analysis and risk assessment.

7.4. Risk management

Because of the immanent effect of pharmaceutical products, there is a shift in the focus of impact assessment, away from assessing the product's effect (impact or effect analysis/assessment), more towards an analysis and assessment of the stability and efficiency of strategies to minimise the exposure of the product (exposure analysis/assessment). Consequently, the documentation of risk management strategies concentrate on measures, minimising environmental exposure. This can be done by organisational measures or by a number of "containment" techniques. These can be physical, biological or process-mediated containment measures and procedures and methods for reliable identification, surveillance and monitoring. Table 9 summarises several possible management-strategies, addressed in the current report:

Table 9: Categorisation and description of possible measures for minimising the environmental exposure of transgenic plants, producing bio-pharmaceuticals

Category	Method
Organisation	<ul style="list-style-type: none"> ➤ release restricted in time, location and scale, ➤ selection of appropriate plants and/or production systems, ➤ agricultural procedures, ➤ larger minimal distances to other crops, ➤ controlled and restricted access.
Biology	minimise (transgene) spread: <ul style="list-style-type: none"> ➤ terminator-technology, ➤ parthenokarpic plants, ➤ male sterility, ➤ expression in specific organs, organelles, times. with viruses: <ul style="list-style-type: none"> ➤ use of modified, defect constructs, ➤ specific restriction of the host range.
Process	inducible promoters, excluding any expression of the transgene under field conditions
Identification and Monitoring	<ul style="list-style-type: none"> ➤ information on production and processing, ➤ use of dominant marker genes, ➤ development of high-resolution detection systems, ➤ development of highly efficient information management.

For obvious reasons, the single measures and methods differ with respect to the safety level provided, the applicability and practicability, the experience acquired and the costs involved. Combinatorial solutions are possible and it has to be decided case-by-case,

which procedure or combination of procedures, are appropriate with respect to the expected and/or identified risk (considering the potential benefit for human health and environment).

7.5. Conclusion and recommendation

At first site, a special analysis and assessment of potential risks, associated with the production of bio-pharmaceuticals in plants, appears to be justified. The following reasons account for that:

- producing recombinant pharmaceuticals in plants is a new research field, experience is marginal,
- pharmaceutical products intend to have an impact on human beings (and/or animals),
- production systems are currently based on food and feed crops,
- for the assessment of possible effects and side-effects of medical care products, the ill patient serves as a reference; this does not apply for the assessment of effects resulting from the release of these products,
- pharmaceutical proteins or peptides produced in plants can propagate.

Secondly, it appears, that the production of pharmaceuticals in plants in general, are generally not subject of an environmental impact assessment. The production of drugs, flavours, colours and fragrances in plants and the modification of respective secondary metabolism pathways by breeding, mutation and selection has a long history, however, environmental assessments in this field are rare.

If one separates scientific risk assessment from its political and regulatory framework, it is very difficult to explain and transport, that releasing a tobacco plant with modified alkaloid content does not require a qualified environmental assessment. Releasing a tobacco plant, producing human collagen, however, does require a specific assessment. In other words, there is only a very limited number of references, experiences or base-lines, which could be used to assess an identified risk factor.

Consequently, possible research projects and programmes should not only address transgenic plants. A second approach has to address "non-transgenic" scenarios, also to provide the missing base-line information and references, facilitating the assessment of risks. For example, is it possible to detect vaccines, peptide-hormones or antibodies in sewage water of hospitals and slaughterhouses and can we detect impacts on human health and environment? What can we learn from the phylogenetic relation of Tosspoviruses and Hanta-viruses, what consequences can be deduce from the relation of cauliflower mosaic virus and hepatitis B virus? The option and aim of pyramiding relevant, important and informative data must be the most important criterion for evaluating respective research proposals. Only these data contribute to and facilitate risk analysis and risk assessment.

In addition, potential risks do not only result from bio-pharmaceuticals produced in transgenic plants. The (re-)discovery of preventive measures in medicine and the increasing knowledge about long-term effects of specific ingredients in our diet (combining epidemiologic analysis and further know-how on physiological cause-effect chains) and the increasing demand for value-added food (keywords: nutraceuticals and functional food), will promote the manipulation of secondary metabolite pathways in the future.

GENE-FARMING: 7. EXECUTIVE SUMMARY

It can be expected, that there will be a shift, away from the production of food additives (e.g. vitamin formulations), more towards a manipulation of the plant itself - in this respect, "Golden Rice" is just the beginning. Therefore, the author strongly emphasizes the organisation of an experts-meeting with representatives from various disciplines (pharmacology, toxicology, veterinary and human medicine, ecology, molecular biology, biochemistry, microbiology, zoology and botany), including representatives from public and private research and development, government and non-governmental institutions. This meeting should not only address the production of bio-pharmaceuticals or biologics in transgenic plants but should specifically refer also to the related fields, namely nutraceuticals and functional food. The current report is thought to provide a basis for discussion.

ANNEX 1: Literatur

1. Aaziz R und Tepfer M (1999) Recombination in RNA viruses and in virus-resistant transgenic plants. *J of General Virology* 80: 1339-1346
2. Abelson PH und Hines PJ (1999) The Plant Revolution. *Science* 285: 367-368
3. Adlercreutz H und Mazur W (1997) Phyto-estrogens and western diseases. *Ann Med* 29: 95-120
4. Ames et al., (1990a) Dietary pesticides (99.9% all natural). *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7777-7781
5. Ames et al., (1990b) Nature's chemicals and synthetic chemicals: comparative toxicology. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7782-7786)
6. Ames BN und Gold LS (1997) Environmental pollution, pesticides, and the prevention of cancer: Misconceptions. *FASEB J* 11: 1041-1052
7. Anonymous: Health risks of genetically modified foods [editorial] [see comments]. *Lancet*. 353(9167):1811, 1999 May 29. Comment in: *Lancet* 1999 Jul 3;354(9172):69, Comment in: *Lancet* 1999 Jul 3;354(9172):69-70, Comment in: *Lancet* 1999 July;354(9172):70, Comment in: *Lancet* 1999 Jul 3;354(9172):70-1, Comment in: *Lancet* 1999 Aug 21;354(9179):684, Comment in: *Lancet* 1999 Nov 13;354(9191):1729
8. Arakawa T et al., (1999a) Food plant-delivered cholera toxin B subunit for vaccination and immunotolerization. In: Shahidi et al., [Hrsg.] Chemicals via higher plant bioengineering, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, *Adv in Exp Medic & Biol* 464: 127-147
9. Arakawa T et al., (1999b) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnol* 16 (3): 292-297 (siehe auch erratum in *NatBiotech* 16(5):478)
10. Arakawa T et al., (1999c) Improvements in human health through production of human milk proteins in transgenic food plants. In: Shahidi et al., [Hrsg.] Chemicals via higher plant bioengineering, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, *Adv in Exp Medic & Biol* 464: 149-160
11. Artsaenko et al., (1998) Potato tubers as a biofactory for recombinant antibodies. *Molecular Breeding* 4: 313-319
12. Ball JM et al., (1999) Recombinant Norwalk virus-like particles given orally to volunteers: phase 1 study. *Gastroenterology* 117: 40-48
13. Barak Z et al., (1996) On the mechanism of leftward frameshifting at several hungry codons. *J Mol Biol* 256: 676-684

ANNEX 1: LITERATUR

14. Baum TJ et al., (1996) Expression in tobacco of a functional monoclonal antibody specific to stylet secretions of the root-knot nematode. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 9(5): 382-387
15. Beilharz MW (2000) Therapeutic potential for orally administered type 1 interferons. *PSTT* 3/6: 193-197
16. Bejarano ER et al., (1996) Integration of multiple repeats of geminiviral DNA into the nuclear genome of tobacco during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 759-764
17. Bertolla F (1999) Horizontal gene transfer in the environment: natural transformation as a putative process for gene transfer between transgenic plants and microorganisms. *Res. Microbiol.* 150: 375-384
18. Bosce Z et al., (2000) Altering milk quality by transgenesis. Proceedings: OECD-workshop on Molecular Farming, 3.- 6. September 2000, La Grande Motte, Frankreich
19. Bosch et al (1994) A trout growth hormone is expressed, correctly folded and partially glycosylated in the leaves but not the seeds of transgenic plants. *Transgenic Research* 3: 304-310
20. Boston RS et al. (1996) Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molec Biol* 32: 191-222
21. Brower V (1998) Nutraceuticals: Poised for a healthy slice of the healthcare market ? *Nature Biotechnol* 16: 728-731
22. Brennan et al. (1999a) *Pseudomonas aeruginosa* outer-membrane protein F epitopes are highly immunogenic in mice when expressed on a plant virus. *Microbiol* 145: 211-220
23. Brennan et al. (1999b) Chimeric plant virus particles administered nasally or orally induce systemic and mucosal immune response in mice. *J Virol* 73: 930-938
24. Bülow L et al., (1999) The metabolic effect of native and transgenic hemoglobins on plants. *TIBTECH* 17: 21-24
25. Carrillo C et al., (1998) Protective immune response to foot-and-mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *J of Virology* 72 (2): 1688-1690
26. Casadevall A (1998) Antibody-mediated protection against intracellular pathogens. *Trends in Microbiol.* 6 (3):102-107
27. Castanon S et al., (1999) Immunization with potato plants expressing VP60 protein protects against rabbit hemorrhagic disease virus. *J of Virology* 73 (5): 4452-4455
28. Chargelegue D et al., (2000) A murine monoclonal antibody produced in transgenic plants with plant-specific glycans is not immunogenic in mice. *Transgenic Research* 9: 187-194

ANNEX 1: LITERATUR

29. Chong DKX et al., (1997) Expression of the human milk protein β -casein in transgenic potato plants. *Transgenic Research* 6: 289-296
30. Clarke AR und Waltho JP (1997) Protein folding pathways and intermediates. *Curr Opin Biotechnol* 8: 400-410
31. Cox RI und Davies HL (1988) Modification of pasture oestrogens in the gastrointestinal tract of ruminants. *Proc Nutr Soc Aust* 13: 61-68
32. Cramer CL et al., (1996) Bioproduction of human enzymes in transgenic tobacco. *Ann NY Acad Sci* 792: 63-72
33. Cramer CL et al., (1999) Transgenic plants for therapeutic proteins: linking upstream and downstream strategies. *Curr Topics in Microbiol & Immunol* 240: 95-118
34. Curtiss RI und Cardineau CA (1990) Oral immunisation by transgenic plants. *World Patent Application, WO 90/02484*
35. Czihal A et al., (1999) Gene farming in plants: Expression of a heatstable *Bacillus* amylase in transgenic legume seeds. *Journal of Plant Physiology. Aug., 1999; 155 (2): 183-189.*
36. Dalsgaard K et al., (1997) Plant-derived vaccine protects target animals against a viral disease. *Nature Biotechnology* 15(3): 248-252
37. Daniell H et al., (1998) Containment of herbicide resistance through genetic engineering of the chloroplast genome. *Nature Biotechnology* 16: 345-348
38. Daughton CG und Ternes T (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change ? *Environment Health Perspectives* 107 (suppl 6): 907-938
39. Daszak P et al., (2000) Emerging infectious diseases of wildlife – threats to biodiversity and human health. *Science* 287: 437-449
40. De Jaeger G et al., (2000) The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant Mol Biol* 43: 419-428
41. DellaPenna D (1999) Nutritional Genomics: Manipulating plant micronutrients to improve human health. *Science* 285: 375-379
42. Demain AL (1999) Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 52: 455-463
43. DeNeve M et al., (1999) Gene silencing results in instability of antibody production in transgenic plants. *Mol Gen Genet* 260 (6): 582-592
44. DeZoeten GA et al., (1989) The expression, localisation, and effect of human interferon in plants. *Virology* 172: 213-220

ANNEX 1: LITERATUR

45. Dieryck W et al. (1997) Human hemoglobin from transgenic tobacco. *Nature* 386: 29-30
46. Dixon RA und Arntzen CJ (1997) Transgenic plant technology is entering the era of metabolic engineering. *TIBTECH* 15: 441-444
47. Dixon RA (1999) Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Curr Opin Biotechnol*: 10: 192-197
48. Domansky et al., (1995) Organ-specific expression of hepatitis B surface antigen in potato. *Biotechnol Lett* 17 (8) 863-866
49. Doolittle WF (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics* 14: 307-311
50. Dumai N und Larzul D (2000) Pharmaceuticals and viral safety: a global view. *PSTT* 3/7: 220-221
51. Düring K et al., (1990) Synthesis and self assembly of a functional monoclonal antibody in transgenic *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol.Biol.* 15: 281-293
52. Ewen, SWB und Pusztai A (1999) Effects of diets containing genetically modified potatoes expressing *Galanthus nivalis* lectin on rat small intestine. *The Lancet* 354: 1353-1354
53. Falk BW und Breuning G (1994) Will transgenic crops generate new viruses and new diseases. *Science* 263: 1395-1396
54. Ficcadenti N et al., (1999) Genetic engineering of parthenocarpic fruit development in tomato. *Molecular Breeding* 5: 463-470
55. Fiedler U et al., (1997) Optimisation of scFv antibody production in transgenic plants. *Immunotechnology* 3: 205-216
56. Fischer R et al., (1999a) Towards molecular farming in the future: Transient protein expression in plants. *Biotech Appl Biochem* 30 (2): 113-116
57. Fischer R et al., (1999b) Towards molecular farming in the future: Moving from diagnostic protein and antibody production in microbes to plants. *Biotech Appl Biochem* 30 (2): 101-108
58. Fischer R et al., (1999c) Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biological Chemistry* 380 (7-8): 825-839
59. Fraley et al., (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 4803-4807
60. Franconi R et al., (1999) Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* 4(3-4): 189-201

ANNEX 1: LITERATUR

61. Franken E et al., (1997) Recombinant proteins from transgenic plants. *Curr Opin in Biotechnol* 8(4): 411-416
62. Frommer W et al. (1989) Safe Biotechnology (3). Safety precautions for handling microorganisms employed in process biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 30: 541-522
63. Frommer W et al. (1993) Safe Biotechnology (5). Recommendations for safe work with animal and human cell cultures concerning potential human pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 39: 141-147
64. Gilles PN et al., (1999) Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. *Nature Biotechnology* 17: 365-370
65. Goddijn OJM, Pen J (1995) Plants as bioreactors. *TIBTECH* 13 (9): 379-387
66. Gomez N et al., (1998) Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 249 (2): 352-358
67. Grant D et al., (2000) Genome organization in dicots: genome duplication in *Arabidopsis* and synteny between soybean and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(8): 4168-4173
68. Griffin TJ und Smith LM (2000) Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *TIBTECH* 18: 77-84
69. Guda C et al., (2000) Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplasts. *Plant Cell Reports* 19:257-262
70. Harper G et al., (1999) Integration of banana streak Badnavirus into the *Musa* Genome: molecular and cytogenetic evidence. *Virology* 255: 207-213
71. Hasler C (1997) Narrowing the gap between foods and drugs. *Cereal Foods World* 42 (6): 462-463
72. Haq et al., (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 268: 714-716
73. Herbers K et al., (1996) Apoplastic expression of the xylanase and beta-(1-3,1-4)-glucanase domains of the xynD gene from *Ruminococcus flavenfaciens* leads to functional polypeptides in transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding* 2 (1): 81-87
74. Herbers K und Sonnewald U (1999) Production of new/modified proteins in transgenic plants. *Curr Opin in Biotechnol* 10(2): 163-168
75. Heyer AG et al., (1999) Production of modified polymeric carbohydrates. *Curr Opin in Biotechnol* 10: 169-174
76. Hiatt A (1990) Antibodies produced in plants. *Nature* 344: 469-470

ANNEX 1: LITERATUR

77. Hirschberg J (1999) Production of high-value compounds: carotinoids and vitamin E. *Curr Opin in Biotechnol* 10: 186-191
78. Ho M-W et al., (1999) Cauliflower mosaic virus promotor - a recipe for disaster. *Microbial Ecol Health Disease* 11 (4):
79. Ho M-W et al. (1998) Gene technology and gene ecology of infectious diseases. *Microbial Ecol Health Disease* 10: 33-59.
80. Holmberg N et al., (1997) Transgenic tobacco expressing Vitreoscilla hemoglobin exhibits enhanced growth and altered metabolite production. *Nature Biotechnology* 15(3): 244-247
81. Holzmann D (1994) Agracetus grows monoclonals in soybeans and corn plants. *Genetic Engineering News* 14 (16):1, 34
82. Hood EE et al., (1999) Molecular farming of industrial proteins from transgenic maize. In: Shahidi et al., [Hrsg.] Chemicals via higher plant bioengineering, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, *Adv in Exp Medic & Biol* 464: 127-147
83. Hood EE and Jilka JM (1999) Plant-based production of xenogenic proteins. *Current Opinion in Biotechnology* 10 (4): 382-386
84. Horsch R et al., (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231
85. Horvath H et al., (2000) The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1914-1919
86. Hull R et al., (2000) Genetically modified plants and the 35S promotor: assessig the risks and enhancing the debate. *Microbial Ecol Health Disease* 12: 1-5
87. Humphreys JM und Chapple C (2000) Molecular 'pharming' with plant P450s. *Trends in Plant Science* 5/7: 271-272
88. Jakowitsch J et al., (1999) Integrated pararetroviral sequences define a unique class of dispersed repetitive DNA in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(23): 13241-13246
89. James C (2000) Global status of commercialised transgenic crops:1999. *ISAAA Briefs No. 17, ISAAA, Ithaca; NY. 65 Seiten*
90. Jang M et al., (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220
91. Jensen-Gath L et al., (1998) Inheritance of a codon-optimized transgene expressing heat stable (1,3-1,4)-beta-glucanase in scutellum and aleurone of germinating barley. *Hereditas* 129 (3): 215-225
92. Kapusta J et al., (1999) A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *FASEB J* 13 (13): 1796-99

ANNEX 1: LITERATUR

93. Kishore GM und Shewmaker C (1999) Biotechnology: enhancing human nutrition in developing and developed worlds. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5968-5972
94. Köhne S et al., (1998) The heat-treatment induced reduction of the *pat* gene encoded herbicide resistance in *Nicotiana tabacum* is influenced by the transgene sequence. *J Plant Physiol* 153: 631-642
95. Kolodziejczyk PP, Shahidi F (1999) Novel chemicals from plants via bioengineering. An overview. In: Shahidi et al., [Hrsg.] *Chemicals via higher plant bioengineering*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, *Adv in Exp Medic & Biol* 464: 1-4
96. Koo M et al., (1999) Protective Immunity against murine hepatitis virus (MHV) induced by intranasal or subcutaneous administration of hybrids of tobacco mosaic virus that carries an MHV epitope. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7774-7779
97. Krebbers E und Vanderkerckhove J (1990) Production of peptides in plant seeds. *TIBTECH* 8: 1-5
98. Kurland C und Gallant J (1996) Errors of heterologous protein expression. *Current Opinion in Biotechnology* 7: 489-493
99. Laten HM et al., (1998) *SIRE-1*, a *copia/Ty1*-like retroelement from soybean, encodes a retroviral envelope-like protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6897-6902
100. Lemieux B et al., (1998) Overview of DNA chip technology. *Molecular Breeding* 4: 277-289
101. Li L et al., (2000) Single-cell MALDI: a new tool for direct peptide profiling. *TIBTECH* 18: 151-160
102. Losey JE et al. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* 399: 214
103. Ma JKC et al., (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* 268: 716-719
104. Ma JKC et al., (1998) Characterization of a recombinant plant monoclonal secretory antibody and preventive immunotherapy in humans. *Natural Medicines* 4(5): 601-606
105. Ma S und Jevnikar AM (1999) Autoantigens produced in plants for oral tolerance therapy of autoimmune diseases. In: Shahidi et al., [Hrsg.] *Chemicals via higher plant bioengineering*, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, *Adv in Exp Medic & Biol* 464: 179-194
106. Ma JK und Vine ND (1999) Plant expression systems for the production of vaccines. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 236:275-92
107. Ma JK (1999) The caries vaccine: a growing prospect. *Dent Update* 26(9): 374-380
108. Mahon BP et al., (1998) Approaches to new vaccines. *Critical Reviews in Biotechnology* 18(4): 257-82

ANNEX 1: LITERATUR

109. Marrone CM (1999) Safety issues with herbal products. *Annals of Pharmacotherapy* 33 (12): 1359-1362
110. Mason HS et al., (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 11747-11749
111. Mason HS und Arntzen CJ (1995) Transgenic plants as vaccine production systems. *TIBTECH* 13: 388-392
112. Mason HS et al., (1996) Expression of Norwalk Virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5335-5340
113. Mason HS et al., (1998) Edible vaccine protects mice against Escherichia coli heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 16(13):1336-43
114. McCormick et al., (1999) Rapid production of specific vaccines for lymphoma by expression of the tumorderived single-chain Fv epitope in tobacco plants. *Proc Nat Acad Sci USA* 96:703-708
115. McLellan MR (2000) Time to address functional foods and nutraceuticals *Food Technology* 54(3): 150
116. Meisel H (1999) Bioactive substances of food origin - A challenge for food and nutrition science. *Nahrung* 43(3): 147
117. Miele L (1997) Plants as bioreactors for biopharmaceuticals: regulatory considerations. *TIBTECH* 15 (2): 45-50.
118. Mitra A und Zhang Z (1994) Expression of human lactoferrin cDNA in tobacco cells produces antibacterial protein(s). *Plant.Physiol.* 106: 977-981
119. Mitra A et al., (1996) A mammalian 2-5A system functions as an antiviral pathway in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (13): 6780-6785
120. Modelska A et al., (1998) Immunization against rabies with plant-derived antigen. *Proc Nat Acad Sci USA* 95 (5): 2481-2485
121. Montforts MHMM (1999) The exposure assessment for veterinary medicinal products. *The Science of the Total Environment* 225: 119-133
122. Mor TS et al., (1998) Perspective: edible vaccines - a concept coming of age. *Trends in Microbiology* 6(11): 449-53
123. Mukerji P (1997) Transgenic nutritionals: Today's lessons and future directions. *Cereal Foods World* 42(6): 463-464
124. Murphy DJ (1999) Production of novel oils in plants. *Current Opinion in Biotechnology* 10: 175-180

ANNEX 1: LITERATUR

125. Murphy DJ (1996) Engineering oil production in rapeseed and other oil crops. *TIBTECH* 14: 206-213
126. Nielsen KM et al., (1998) Horizontal gene transfer from transgenic plants to terrestrial bacteria - a rare event ? *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 79-103
127. Ndwora T et al., (1999) Evidence that Badnavirus infection in Musa can originate from integrated pararetroviral sequences. *Virology* 255: 214-220
128. Noteborn HP et al., (2000) Chemical fingerprinting for the evaluation of unintended secondary metabolic changes in transgenic food crops. *J of Biotechnol* 77 (1):103-114
129. Ochansky P, et al. (1982) Human interferons protect plants from virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 79: 2278-2282
130. Ogawa T et al. (1996) Virus-induced cell death in plants expressing the mammalian 2',5' oligoadenylate system. *Nature Biotechnology* 14: 1566-1569
131. Parekh R et al., (1995) Multicopy overexpression of bovine pancreatic trypsin inhibitor saturates the protein folding and secretory capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Protein Expr Purif* 6: 537-545
132. Parker J (1989) Errors and alternatives in reading the universal genetic code. *Microbiol Review* 53: 273-298
133. Parker JE et al., (1997) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene RPP5 shares similarity to the toll and interleukin-1 receptors with N and L6. *The Plant Cell* 9: 879-894
134. Pen J et al., (1993) Protein production in transgenic crops: analysis of plant molecular farming. In: *Transgenic plants fundamentals and applications / New York : M. Dekker, c1993. 1993. S. 239-241*
135. Persidis A (1998) Proteomics. *Nature Biotechnology* 16: 393-394
136. Poirier Y (1999) Production of new polymeric compounds in plants. *Curr Opin in Biotechnol* 10: 181-185
137. Reichert JM (2000) New biopharmaceuticals in the USA: trends in development and marketing approvals 1995-1999. *TIBTECH* 18: 364-369
138. Richter L und Kipp PB (1999) Transgenic plants as edible vaccines. *Current Topics in Microbiology & Immunology* 240: 159-176
139. Römbke J et al. (1996) Umweltprobleme durch Arzneimittel - Literaturstudie. *Umweltbundesamt, ISSN 0722-186X, Texte 60/96; Umweltbundesamt Berlin, 341 Seiten*
140. Roscher A et al., (2000) Strategies for metabolic flux analysis in plants using isotope labelling. *Journal of Biotechnology* 77(1): 81-102

ANNEX 1: LITERATUR

141. Safety in Biotechnology Working Party of the European Federation of Biotechnology (2000) Safety Biotechnology 10: DNA content of biotechnical process waste. *TIBTECH* 18: 141-146
142. Salmon V et al., (1998) Production of human lactoferrin in transgenic tobacco plants. *Protein Expression and Purification* 13/1: 127-135
143. Schots A et al., (1992) "Plantibodies": A flexible approach to design resistance against pathogens. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 98 (SUPPL. 2): 183-191
144. Schubbert R et al., (1998) On the fate of orally ingested foreign DNA in mice: chromosomal association and placental transmission to the fetus. *Mol Gen Genet* 259: 569-576
145. Sehnke PC und Ferl RJ (1999) Processing of Preproricin in transgenic tobacco. *Prot Expr and Purif* 15: 188-195
146. Setchell KDR et al. (1997) Exposure of infants to phyto-estrogens from soy-based infant formula. *Lancet* 350: 23-27
147. Sévenier et al., (1998) High level fructan accumulation in transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology* 16: 843-846
148. Sijmons et al., (1990) Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *BioTechnology* 8: 217-221
149. Staub JM et al., (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nature Biotechnology* 18: 333-338
150. Stoger E et al., (2000) Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Mol Biology* 42: 583-590
151. Straus DB et al., (1988) Escherichia coli heat shock mutants are defective in proteolysis. *Genes & Develop* 2: 1851-1858
152. Tackaberry ES et al., (1999) Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine* 17(23-24): 3020-9
153. Tacket CO et al., (1998) Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Natur Medic* 4: 607-609
154. Tacket CO und Mason HS (1999) A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* 1(10): 777-783
155. Tacket CO et al., (2000) Human immune response to a novel Norwalk Virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J. of Infect.Diseases* 182: 302-305
156. Takase K und Hagiwara K (1998) Expression of human alpha-lactalbumin in transgenic tobacco. *J Biochem.* 123: 440-444

ANNEX 1: LITERATUR

157. Terashima M et al., (1999) Production of functional human alpha 1-antitrypsin by plant cell culture. *Applied Microbiology & Biotechnology* 52(4): 516-23
158. Techyney P-Y et al., (2000) Potential risks associated with the recombination in transgenic plants expressing cucumber mosaic virus sequences. *Proc 6th Internat Biosafety Symp on The Biosafety of Genetically Modified Organisms: 97-103, Juli 2000, Saskatoon, Kanada*
159. Thanavala Y et al., (1995) Immunogenicity of transgenic plant-derived hepatitis B surface antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 3358-3361
160. The Safety in Biotechnology Working Party of the European Federation of Biotechnology (2000) Safe Biotechnology 10: DNA content of biotechnical process waste. *TIBTECH* 18: 141-146
161. Theisen M (1999) Production of recombinant blood factors in transgenic plants. In: Shahidi et al., [Hrsg.] Chemicals via higher plant bioengineering, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, *Adv in Exp Medic & Biol* 464: 211-220
162. Tian XC und Yang XJ (1998) Life on the Bio-pharm: therapeutic proteins from transgenic organisms. *MolecMedicToday*, 10: 424-425
163. Tikkanen MJ et al., (1998) Effect of soybean phytoestrogens intake on low-density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3106-3110
164. Truve E et al. (1993) Transgenic potato plants expressing mammalian 2',5' oligoadenylate synthetase are protected from potato virus X infection under field conditions. *Bio/Technology* 11: 1048-1052
165. Tsuda S et al., (1998) Application of the human hepatitis B virus core antigen from transgenic tobacco plants for serological diagnosis. *Vox Sanguinis* 74(3): 148-155
166. Tuboly T et al., (2000) Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis spike protein expressed in plants. *Vaccine* 3(18): 2023-2028
167. Vaquero C et al., (1999) Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11128-11133
168. Varrelmann M et al., (2000) Transgenic or plant expression vector-mediated recombination of *Plum Pox Virus*. *J of Virology* 74(16): 7462-7469
169. Verch T et al. (1998) Expression and assembly of a full-length monoclonal antibody in plants using a plant virus vector. *J Immunol Methods* 220: 69-75
170. Vicente M et al., (1987) Inhibitory effect of plant viruses by human gamma interferon. *J of Phytopatol* 119: 25-29
171. Vierstra RD (1996) Proteolysis in plants: mechanisms and functions. *Plant Molecular Biology* 32: 275-302

ANNEX 1: LITERATUR

172. Walmsley AM und Arntzen CJ (2000) Plants for delivery of edible vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 11: 126-129
173. Weber N et al., (1997) Metabolism of dietary selenic acid: a dead-end metabolite of desaturation/chain elongation reactions. *Nutr Research* 17:89-97
174. Willmitzer L (1999) Plant biotechnology: output traits - the second generation of plant biotechnology products is gaining momentum. *Curr Opin in Biotechnol* 10: 161-162
175. Wilson IB et al., (1998) Core alpha 1,3-fucose is a key part in the epitope recognised by antibodies reacting against plant N-linked oligosaccharides and is present in a wide variety of plant extracts. *Glycobiology* 8: 651-661
176. Wu KM et al., (2000) Regulatory science: a special update from the United States Food and Drug Administration: Preclinical issues and status of investigation of botanical drug products in the United States. *Toxicology Letters* 111(3): 199-202
177. Wynn RL et al., (1999) Tobacco plantibodies for caries prevention. *General Dentistry* 47 (5): 450-453
178. Young ND (2000) The genetic architecture of resistance. *Curr Opin in Plant Biol* 3:285-290
179. Yusibov V et al., (1997) Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies and HIV-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5784-5788
180. Yusibov V et al., (1999) Plant viral vectors based on tobamoviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 240: 81-94
181. Zeisel SH (1999) Health - regulation of "nutraceuticals". *Science* 285 (5435): 1853
182. Zeitlin L et al., (1998) A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnology* 16: 1361-1364
183. Zhang G et al., (2000) In planta expression of HIV-1 p24 protein using an RNA plant virus-based expression vector. *Mol Biotechnol* 14(28): 99-107
184. Zimmermann et al., (1998) Intracellular expression of TMV-specific single chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding* 4: 369-379

ANNEX 2: Interview-Partner und Kontaktadressen

Name	Kontakt
Altpeter, Fredy	IPK Gatersleben Germany Tel 039482-5363 Fax 039482-5139 email altpeter@ipk-gatersleben.de
Amman, Klaus	Professor und Direktor Botanischer Garten, Uni Bern Altenbergrain 21 CH-3013 Bern Schweiz Tel 0041-31-631-4937 Fax 0041-31-631-4993 email klaus.amman@ips.unibe.ch
Arntzen, Charles	President Emeritus and Project Leader Boyce Thompson Institute for Plant Research, Cornell University Tower Road, Ithaca, New York 14850, USA Tel 001-607-254-1301 Fax 001-607-254-2958 email cja7@cornell.edu
Auberson, Lilian	Agency BATS Clarastrasse 13 Tel 0041- 61-690-93-14/10 Fax 0041-61-690-93-15 email auberson@bats.ch Web www.bats.ch , www.bioweb.ch
Barber, Simon	Director Plant Biotechnology Unit, EuropaBio 6, Av. de l'Armée - Legerlaan 6 1040 Brüssel Belgien Tel 0032-2-735-03-13 Fax 0032-2-735-49-60 email mail@europa-bio.be Web www.europa-bio.be
Bartsch, Detlef	RWTH Aachen Biologie I Worringerweg 1 52074 Aachen Tel 0241-8066-76 Fax 0241-8888-182 email bartsch@rwth-aachen.de
Brandle, James	Southern Crop Protection and Food Research Centre, Agriculture & Agri-Food Canada, London, ON Canada Tel 001-519-457-1470 Fax: 001-519-457-3997 email brandleje@em.agr.ca
Carter, Bruce	Senior Staff Veterinarian Center for Veterinary Biologics, CVB-USDA Licensing and Policy Development Tel 001-515-232-5785 Ext. 149 Fax 001-515-232-7120 email Bruce.A.Carter@usda.gov
Commandeur, Uli	RWTH Aachen Biologie 1 Worringerweg 1 52074 Aachen Tel 0241-807280 email ucom@bio1.rwth-aachen.de

ANNEX 2: INTERVIEW-PARTNER, ADRESSEN

Cramer, Carole, L.	Professor, Fralin Biotech Center, Virginia Tech Blacksburg, VA 24061-0346 Co-founder & CSO, CropTech Corp, 1800 Kraft Dr Blacksburg, VA 24061 email ccramer@vt.edu
Daughton, Charles	Environmental Sciences Division, National Exposure Research Laboratory, U.S. EPA 944 East Harmon Ave Las Vegas, NV 89119, USA Tel 001-702 -798-2142 christian.daughton@epa.gov
Erickson, Larry R.	Department of Plant Agriculture, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada N1G 2W1 Tel 519-824-4120 Ext. 3398 Fax 519-763-8933 email lerickso@crop.uoguelph.ca
Frederick, Robert	Environmental Protection Agency USA email frederick.bob@epamail.epa.gov
Gupta, Subhash	USDA Animal and Plant Health Inspection Service USA Tel 001-301-734-5940 Fax 001-301-734-8669 email subhash.c.gupta@usda.gov
Hood, Elizabeth	Vice President, Technology Cell Biology Group, Prodigene Inc. 101 Gateway Blvd. Suite 100 College Station, TX 77845, USA Tel 001-979-690-8537 Fax 001-979-690-9527 email eehood@prodigene.com
King, Doug	Information Systems for Biotechnology, Virginia Tech 120 Engel Hall, Blacksburg VA 24061-0308, USA Tel 001-540-231-3747 Fax 001-540-231-2614 email isb@vt.edu web www.isb.vt.edu
Reichert, Janice	Tufts Center for the Study of Drug Development 192 South Street, Suite 550, Boston, MA 02111, USA Tel 001-617-636-2182 Fax 001-617-636-2425 email janice.reichert@tufts.edu web www.tufts.edu/med/research/csdd
Ridgway, Anthony	Manager, Biotherapeutics Division Bureau of Biologics and Radiopharmaceuticals Kanada email Anthony_Ridgway@hc-sc.gc.ca
Schiemann, Joachim	BBA Braunschweig Messeweg 11/12, D- 38104 Braunschweig Tel 0531-299-3800 Fax 0531-299-3013 email j.schiemann@bba.de
Stirn, Susanne	BIOGUM, Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg Ohnhorststr. 18, D-22609 Hamburg Tel 040-42816-514 Fax 040-42816-254 email stirn@botanik.uni-hamburg.de
Ternes, Thomas	ESWE-Institut fuer Wasserforschung und Wassertechnologie Soehleinstrasse 158, D-65201 Wiesbaden Tel 0611-7804-343 Fax 0611-7804-375 email thomas.ternes@stadtwerke-wiesbaden.de
White, James	United States Department for Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service USA email james.l.white@usda.gov

