



Vereinfachung der Sicherheitsbewertung durch gezielte Genomveränderung und Reduzierung der Exposition

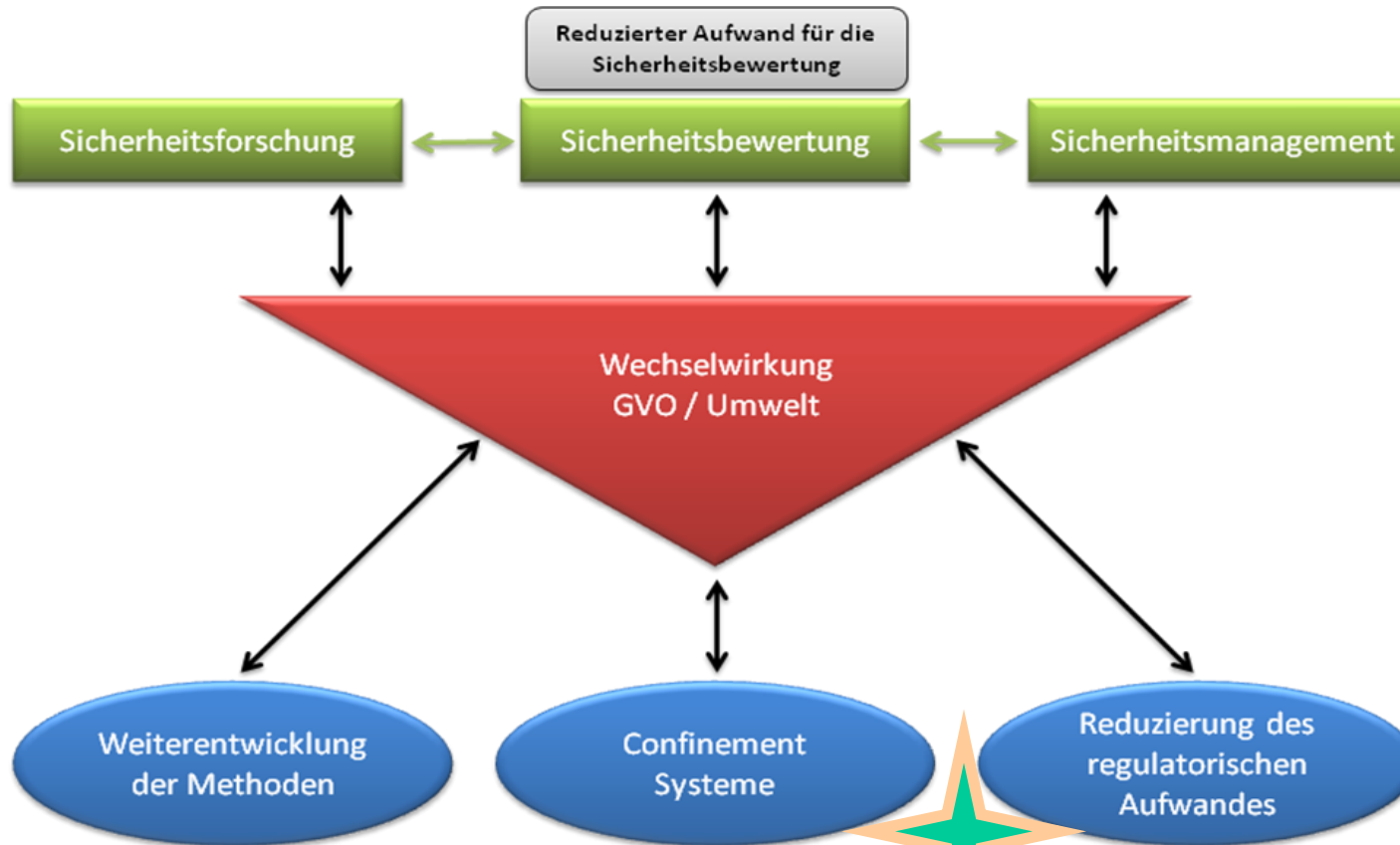
Joachim Schiemann

Julius Kühn-Institut, Bundesforschungsinstitut für
Kulturpflanzen (JKI)

Institut für Sicherheit in der Gentechnik bei Pflanzen



2 wesentliche Bestandteile der Sicherheitsforschung



Erfahrungen aus der Sicherheitsbewertung (EFSA)

Hoher Bewertungsaufwand für Antragsteller und Bewerter durch:

- sequenzunspezifische Integration
- nicht bedarfsgerechte Expression
- Integration überflüssiger DNA-Sequenzen
- keine Anpassung an pflanzliche Regulationsmechanismen
- ungewollte Exposition und Etablierung



Vorlage: Yann Devos, EFSA

Lösungsansätze

- sequenzspezifische Integration
- bedarfsgerechte Expression
- Vermeidung überflüssiger DNA-Sequenzen
- verbesserte Anpassung an pflanzliche Regulationsmechanismen
- Vermeidung von ungewollter Exposition und Etablierung

Erfahrungen aus der Sicherheitsbewertung (EFSA)

Opinion of the Scientific Panel on Genetically Modified Organisms on Guidance for the risk assessment of genetically modified plants used for non-food or non-feed purposes

Opinion adopted on 22 April 2009
EFSA Journal 2009; 1164: 1-42

GM plants for non-food/non-feed purposes:

- Medicinal or industrial products (molecular farming)
- Energy production, phytoremediation, landscape improvement, ornamentals



Vorlage: Yann Devos, EFSA



Erfahrungen aus der Sicherheitsbewertung (EFSA)

Applicants should describe

- the **acceptable level of exposure** due to admixture or gene flow or due to the production of a (potentially toxic or otherwise bioactive) compound
- the **confinement requirements** and further control measures where necessary to reduce exposure of humans or animals and the environment
- the **details and rationale for the proposed physical and biological confinement strategy**, specifying its effectiveness

Risk assessment is to be performed with and without taking the confinement strategy into account.



Vorlage: Yann Devos, EFSA



Schlussfolgerung

Confinementsysteme sind notwendig, wenn schädliche Auswirkungen auf (Menschen/Tiere) und/oder das Ökosystem zu erwarten sind durch Auskreuzung, Auswilderung oder Wirkung auf NTO.

Confinementsysteme können erforderlich sein, um Produktionssysteme und Warenströme abzugrenzen.

Diese Systeme sollten auch durch öffentliche Forschung entwickelt und beurteilt werden.

BMBF-geförderte Projekte

- **Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen**
Verbund-Koordinator: Prof. Dr. Reinhard Hehl; 6 Teilprojekte
- **Entwicklung und Überprüfung von Confinement-Strategien für Raps**
Verbund-Koordinator: Prof. Dr. Wilhelm Claupein; 4 Teilprojekte
- **Entwicklung und Prüfung von Plastidentransformation als Confinement-System bei Raps und Mais unter Berücksichtigung der bei Modellpflanzen gewonnenen Erkenntnisse**
Verbund-Koordinator: Prof. Dr. Dario Leister; 3 Teilprojekte
- **Gentechnische Ansätze zur Begrenzung der Ausbreitungsfähigkeit von Kartoffelknollen**
Koordinator: Dr. Frederik Börnke; Einzelprojekt

Dank an Projektkoordinatoren:





BMBF-geförderte Projekte (1)

Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen



Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen

Begrenzung der Ausbreitungsfähigkeit gentechnisch veränderter Pflanzen

1. Prof. Dr. Ralph Bock, Max Planck Institut für Molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam-Golm
2. Dr. Dirk Becker, Universität Hamburg
3. Dr. Alexandra Hüsken, Julius Kühn-Institut, Braunschweig
4. Priv. Doz. Dr. Matthias Fladung, Johann Heinrich von Thünen-Institut, Institut für Forstgenetik, Großhansdorf

Unter Sicherheitsaspekten optimierte gentechnische Veränderungen von Pflanzen

1. Prof. Dr. Holger Puchta, Universität Karlsruhe
2. Prof. Dr. Reinhard Hehl, Technische Universität Braunschweig (Koordinator)



Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen

Problem: Ausbreitungsfähigkeit gentechnisch veränderter Pflanzen

Lösungsvorschläge:

„Transplastome Pflanzen“ - Dr. Stefanie Ruf

„Männliche Sterilitätssysteme“ - Dr. Hans Hönicka

„Confinement durch cytoplasmatische Sterilität“ - Dr. Heidrun Bückmann

„Gentechnisch veränderte Pflanzen ohne genveränderten Pollen“ - Axel Hinze, Dr. Hans Hönicka

Ausgewählte Ergebnisse:



Wie "dicht" ist das System "Transplastome Pflanzen" unter Stressbedingungen?

- Plastiden werden in den meisten Nutzpflanzen mütterlich vererbt
- Mütterliche Vererbung schließt die plästidären Gene von einer Vererbung über Pollen aus
- Mechanismen, wie plastidenkodierte Gene dennoch über Pollen vererbt werden können:
 - durch eine geringe väterliche Vererbung von Plastiden
 - durch Gentransfer vom Plastidengenom in das Kerngenom

Durchführung genetischer Screens in Tabak zur Bestimmung der Frequenz von

- **väterliche Plastidenvererbung**
- **Gentransfer eines plastidären Gens in den Zellkern**
- **funktionelle Aktivierung eines transferierten plastidären Gens**

Verwendete Stressbedingungen:

UV-Licht/Starklicht



Hitze



Trockenheit



Kälte

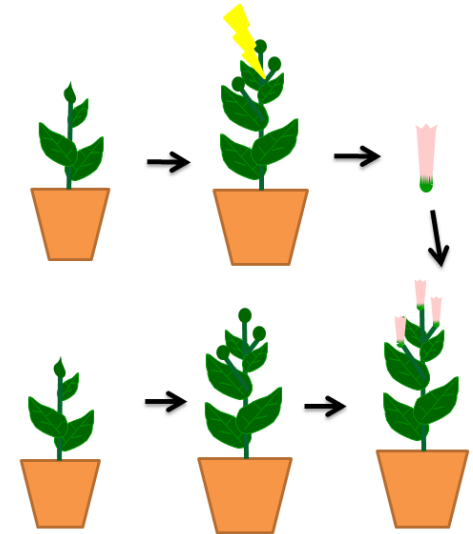


Das Testsystem zur Bestimmung der väterlichen Plastidenvererbung unter Stressbedingungen

Transplastomische Vaterpflanzen werden während der Pollenentwicklung dem Stress ausgesetzt.

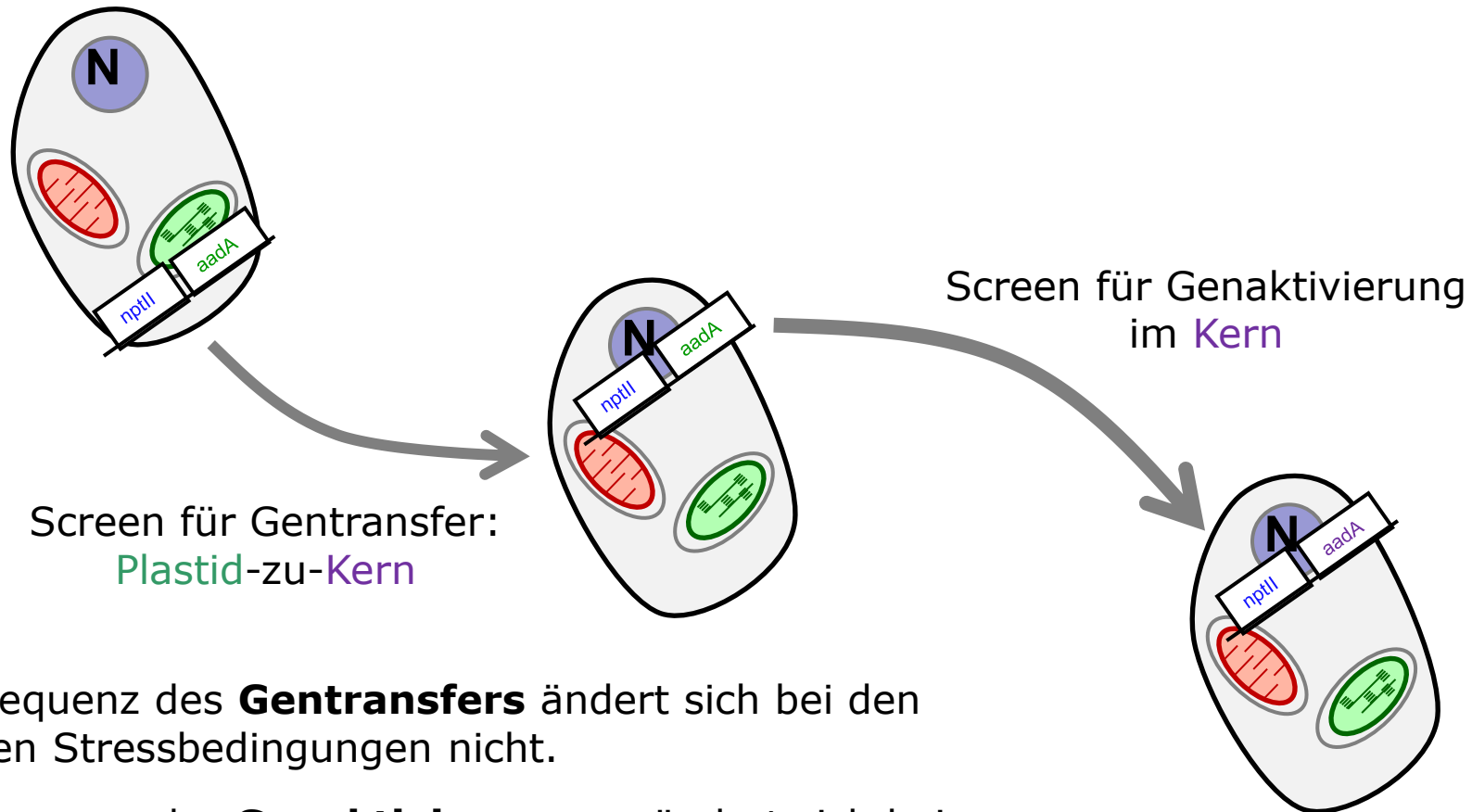
Mit diesen Pollen werden männlich sterile Mutterpflanzen bestäubt.

Die Samen werden auf antibiotiahaltigem Medium ausgesät. In den Keimlingen können die väterlichen Plastiden trotz des Antibiotikums ergrünen und somit detektiert werden.



→ **Die Frequenz der äußerst geringen väterlichen Plastidentransmission ist unter den meisten Stressbedingungen nicht erhöht.**

Gentransfer eines plastidären Gens in den Zellkern und funktionelle Aktivierung eines transferierten plastidären Gens unter Stressbedingungen



- Die Frequenz des **Gentransfers** ändert sich bei den meisten Stressbedingungen nicht.
- Die Frequenz der **Genaktivierung** verändert sich bei keiner Stressbedingung.



Männliche Sterilitätssysteme – Pappel



Frühblühende Pappel mit Einzelblüte:
Staubbeutel mit Pollen



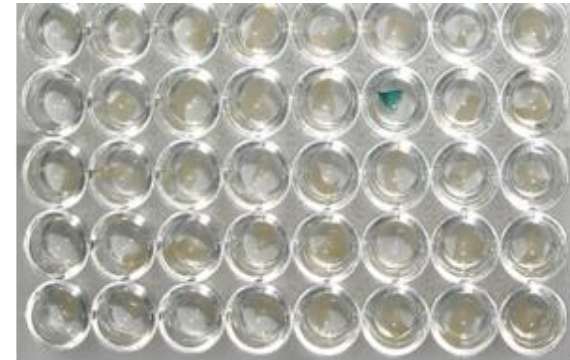
Staubbeutel ohne Pollen bei sterilen
Pappeln mit Sterilitätsgen

- Pflanzen, die keinen Pollen bilden, können eine gentechnische Veränderung nicht an andere Pflanzen weitergeben
- Zwei der getesteten Sterilitätsgene sind nur während der Blütenbildung aktiv
- Die Bildung steriler männlicher Blüten konnte bei frühblühenden Pappeln nachgewiesen werden

Transgen-freier Pollen – Pappel/Mais



Rekombinierte Pappeln



GUS-Färbung von Nachkommen, die aus einer Bestäubung von Wildtyppflanzen mit einer transgenen Pflanze stammen

- In Pappeln konnte der Aufbau eines Rekombinationssystems zur gezielten Transgen-Eliminierung im Pollen nachgewiesen werden
- Im Mais konnte bereits die gezielte Transgen-Eliminierung in den Nachkommen einer Auskreuzung gezeigt werden
- Die Effizienz der Methode für beide Pflanzenarten wird gegenwärtig im Gewächshaus überprüft



Confinement durch cytoplasmatische Sterilität

Mais hat ein hohes Auskreuzungspotential
(Pollen-vermittelter Genfluss)

Lösungsvorschlag: Anbau von cytoplasmatisch männlich sterilem Mais, Prüfung der Umwelt-abhängigen Zuverlässigkeit von CMS-Mais als biologische Confinement-Methode



Fertile Maisrispe



CMS-Maisrispe

Fragen (2jähriger Feldversuch, 3 Umwelten, 3 CMS-Hybriden):

- Bilden die CMS-Hybriden in verschiedenen Umwelten fertilen Pollen aus?
- Wie verteilt sich der Grad der Auskreuzung der CMS-Hybriden über die Bestände des Pollenempfängers (Weißmais)?
- Wie stark ist die Auskreuzung gegenüber konventionellen Sorten reduziert?
- Lassen sich aus den Untersuchungen Empfehlungen für den Anbau von nutzungsverändertem Mais ableiten?



Confinement durch cytoplasmatische Sterilität

Reduktion der Auskreuzung [%]

CMS-Hybriden im Vergleich zu Delitop (= 100%)

2009	Abstand zur CMS-Hybride [m]						MW
	3,50	6,50	11,00	14,75	19,25	30,25	
DSP2							
Hötzum	-79,82	-89,90	-95,42	-93,48	-97,15	-94,65	-91,73
Lüsewitz	-74,16	-55,58	-95,18	-94,52	-86,50	-91,69	-82,94
Freising	-48,29	-82,92	-80,48	-86,85	-82,72	-85,98	-77,87
MW	-67,42	-76,13	-90,36	-91,62	-88,79	-90,77	-84,18
Torres							
Hötzum	-98,57	-98,85	-98,90	-96,84	-97,51	-97,51	-98,03
Lüsewitz	-98,24	-96,41	-99,60	-97,48	-96,44	-91,74	-96,65
Freising	-97,20	-97,41	-95,05	-95,92	-93,58	-89,84	-94,83
MW	-98,00	-97,56	-97,85	-96,74	-95,84	-93,03	-96,50
Zidane							
Hötzum	-89,33	-92,18	-92,39	-85,48	-80,25	-86,22	-87,64
Lüsewitz	-88,73	-81,52	-97,46	-93,63	-96,70	-78,92	-89,49
Freising	-45,87	-80,17	-73,30	-79,84	-83,57	-81,22	-74,00
MW	-74,64	-84,62	-87,71	-86,32	-86,84	-82,12	-83,71

Resümee 2009/10

Pollenbildung?

Keine CMS-Hybride 100% steril

Torres (S-Cytoplasma) an allen Standorten höchste Stabilität; DSP2 (T-Cytoplasma) und Zidane (S-Cytoplasma) nicht stabil; Restauration je Standort unterschiedlich – weitere Prüfung notwendig

Verteilung und Grad der Auskreuzung?

Höchste Auskreuzung in der 1. Reihe des Pollenempfängers, danach starke Abnahme

Reduktion der Auskreuzung?

Im Mittel der ersten 30m Auskreuzungsreduktion um 84% bis 97%

➤ **Die 2009/10 geprüften CMS-Mais-Hybriden stellen (mit Einschränkungen) ein geeignetes Instrument zur Auskreuzungskontrolle dar.**

Optimierung der biologischen Sicherheit gentechnisch veränderter Pflanzen

Problem:

Integration des Transgens ist unspezifisch

Mutationen

Positionseffekte bei der Transgenexpression

Lösungsvorschläge:

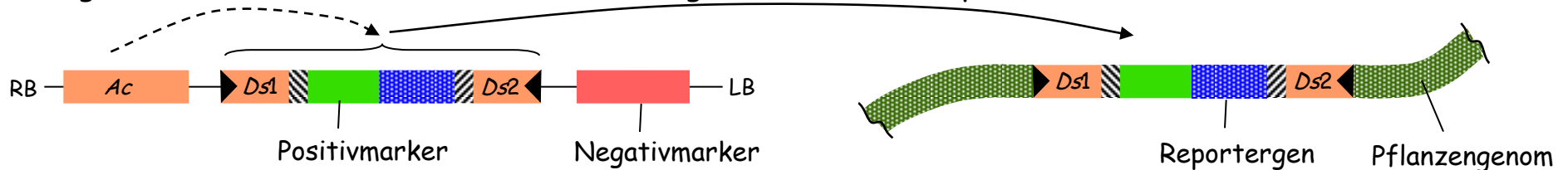
„Charakterisierung der Transgenintegrationsstelle“ - Dr. Ralph Lisson

„Gene Targeting durch Rekombination“ - Dr. Michael Pacher

Ausgewählte Ergebnisse:

Charakterisierung der Transgenintegrationsstelle

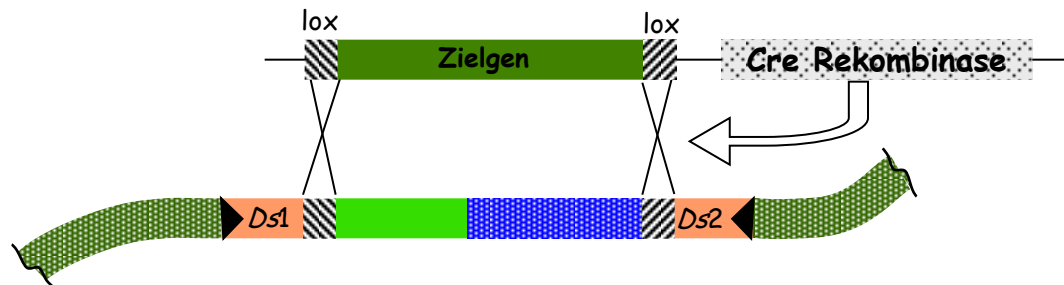
Integration eines DsLox Elements ins Pflanzengenom durch Transposition



Erzeugung T-DNA freier, Transposon tragender Linien erfolgt in einem Schritt mit Hilfe von zwei Selektionsmarkern

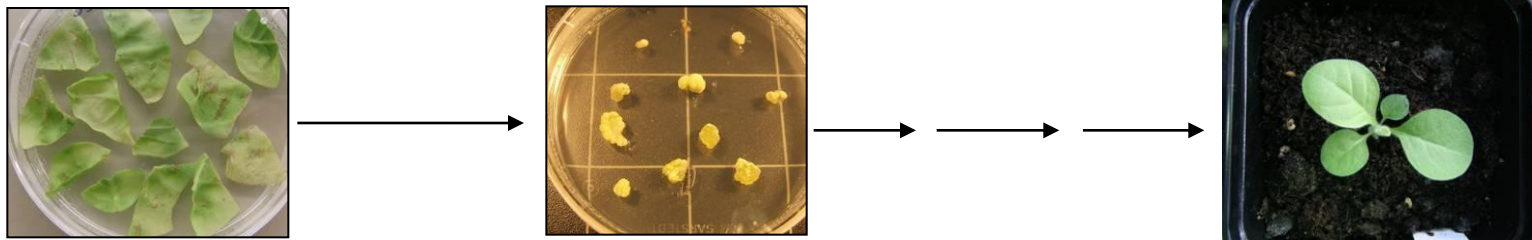
Charakterisierung der Integrationsorte (Expressionsstärke, benachbarte Gene)

Insertion eines Transgens/Zielgens durch homologe Rekombination in ausgewählte Empfängerlinien



Charakterisierung der Transgenintegrationsstelle

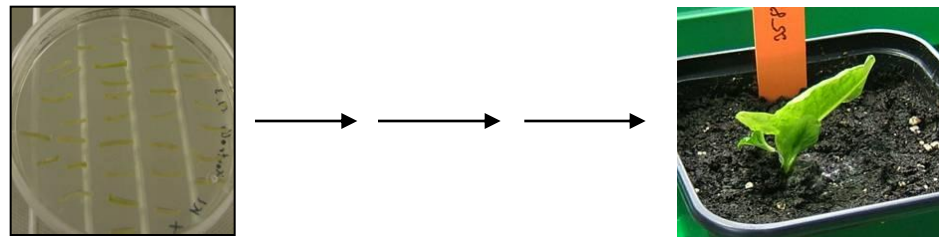
Anwendung in Tabak: Nach der Transformation wurden unter Selektionsbedingungen 13 transgene Linien etabliert. Davon waren 5 Linien mit DsLox Integration frei von T-DNA Sequenzen



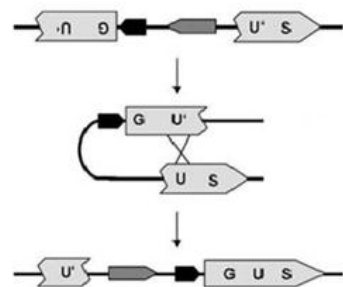
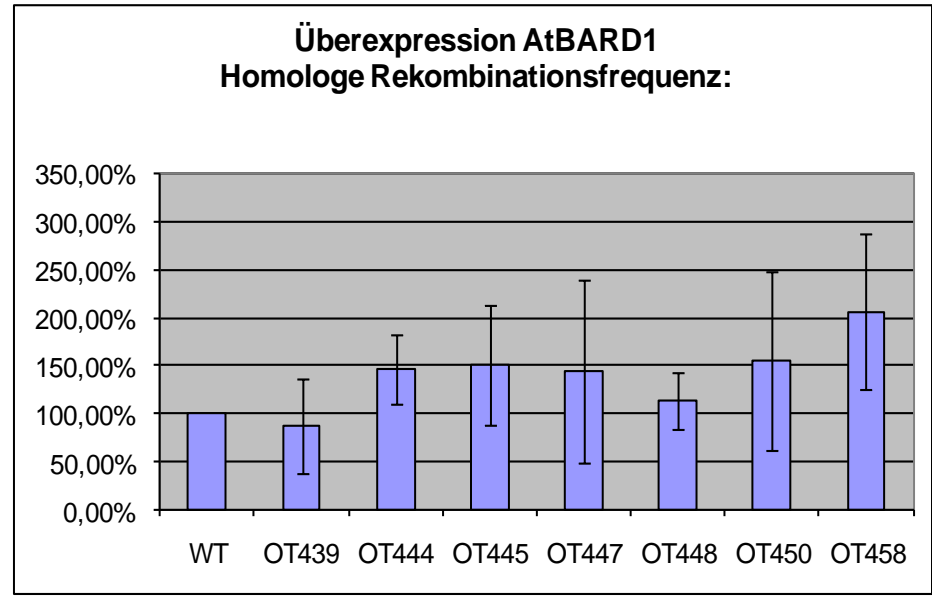
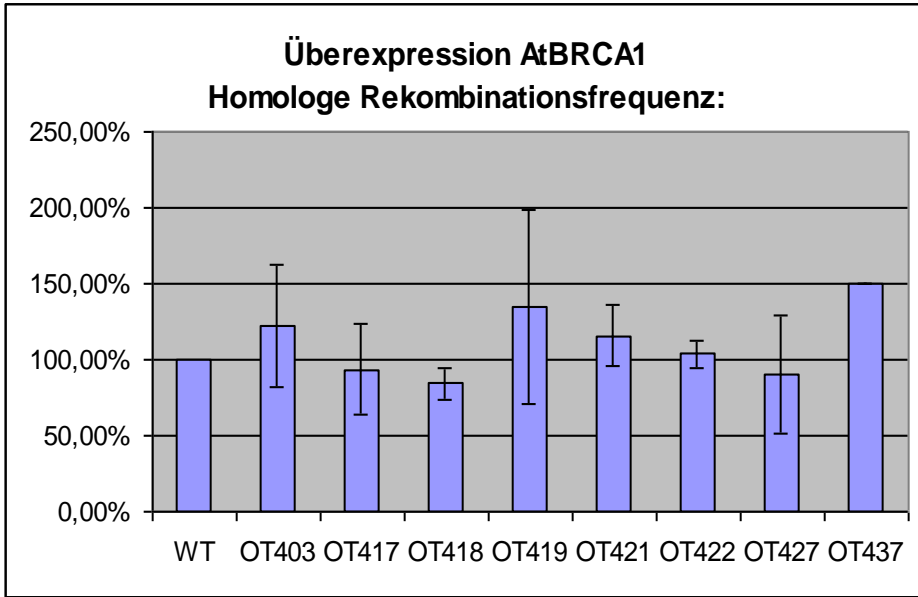
Eine Linie mit starker Reportergenaktivität und nachgewiesenem genomischem Integrationsort von Ds wird zur Untersuchung der homologen Rekombination verwendet [Zusammenarbeit mit Dirk Becker, Universität Hamburg]

Anwendung in Raps:

Transformationen werden zur Zeit durchgeführt; drei transgene Linien zur Analyse vorhanden



Gene Targeting durch Rekombination



BRCA1/BARD1 und BRCA2 sind für homologe Rekombination in Pflanzen notwendig
 Überexpression von BRCA1 oder BARD1 ohne Effekt auf die homologe Rekombination
 Überexpression von BRCA1/BARD1 und BRCA2 noch in Arbeit



BMBF-geförderte Projekte (2)

Entwicklung und Überprüfung von Confinement-
Strategien für Raps



Entwicklung und Prüfung von Confinement-Strategien für Raps

Teilprojekte

1 Entwicklung und Bewertung anwendungsorientierter Confinement-Strategien zur Kontrolle von Gentransfer über Durchwuchsraps

Universität Hohenheim, Prof. Dr. W. Claupein, PD Dr. S. Gruber (Koordinator)

2 Genetische Untersuchungen zur Vererbung der Dormanz bei Winterraps

Universität Göttingen, Prof. Dr. H.C. Becker, Dr. C. Möllers

3a Untersuchungen zur Durchwuchsproblematik verschieden dormanter Raps-Genotypen (*Brassica napus* L.) in der Praxis

JKI Braunschweig, Prof. Dr. J. Schiemann, Dr. A. Dietz-Pfeilstetter

3b Quantitative Erfassung der Zuverlässigkeit biologischer Confinement-Methoden am Beispiel der Kleistogamie beim Raps (*Brassica napus* L.)

JKI Braunschweig, Prof. Dr. J. Schiemann, Dr. A. Hüsken

UNIVERSITÄT HOHENHEIM



GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT
GÖTTINGEN



Hintergrund und Fragestellung

- ▶ Gewisses Auskreuzungspotenzial mit Pflanzen der Segetal- und Ruderalflora; Auskreuzung mit Kulturraps in gesäten Beständen
- ▶ Mehrjährig überdauernder Bodensamenvorrat (Dormanz)

➡ Gentransfer durch Pollen und Vermischung von Samen in Folgejahren möglich

Lösungen:

- ▶ Unterbindung der Pollenverbreitung
- ▶ Verminderung/Vermeidung der Überdauerungsneigung der Samen

Confinement-Strategie I:

Entwicklung und Prüfung nicht-dormanter Genotypen

Confinement-Strategie II:

Entwicklung und Prüfung kleistogamer Genotypen

Ziele der Teilprojekte

1 (Universität Hohenheim)

- ▶ Evaluierung von Rapsgenotypen (transgen, isogen, veränderte Inhaltsstoffe) auf nicht-dormante Genotypen, Entwicklung eines Schnelltests zum Screening, Überdauerung im Freiland, Konkurrenz von Durchwuchsrap, Modellentwicklung

2 (Universität Göttingen)

- ▶ Vererbung „sekundärer Dormanz“, Bedeutung von Genotyp, Umwelt und Genotyp x Umwelt-Interaktionen für „sekundäre Dormanz“, Zusammenhänge zwischen „sekundärer Dormanz“ und wertgebenden Sameninhaltsstoffen

3a (JKI Braunschweig)

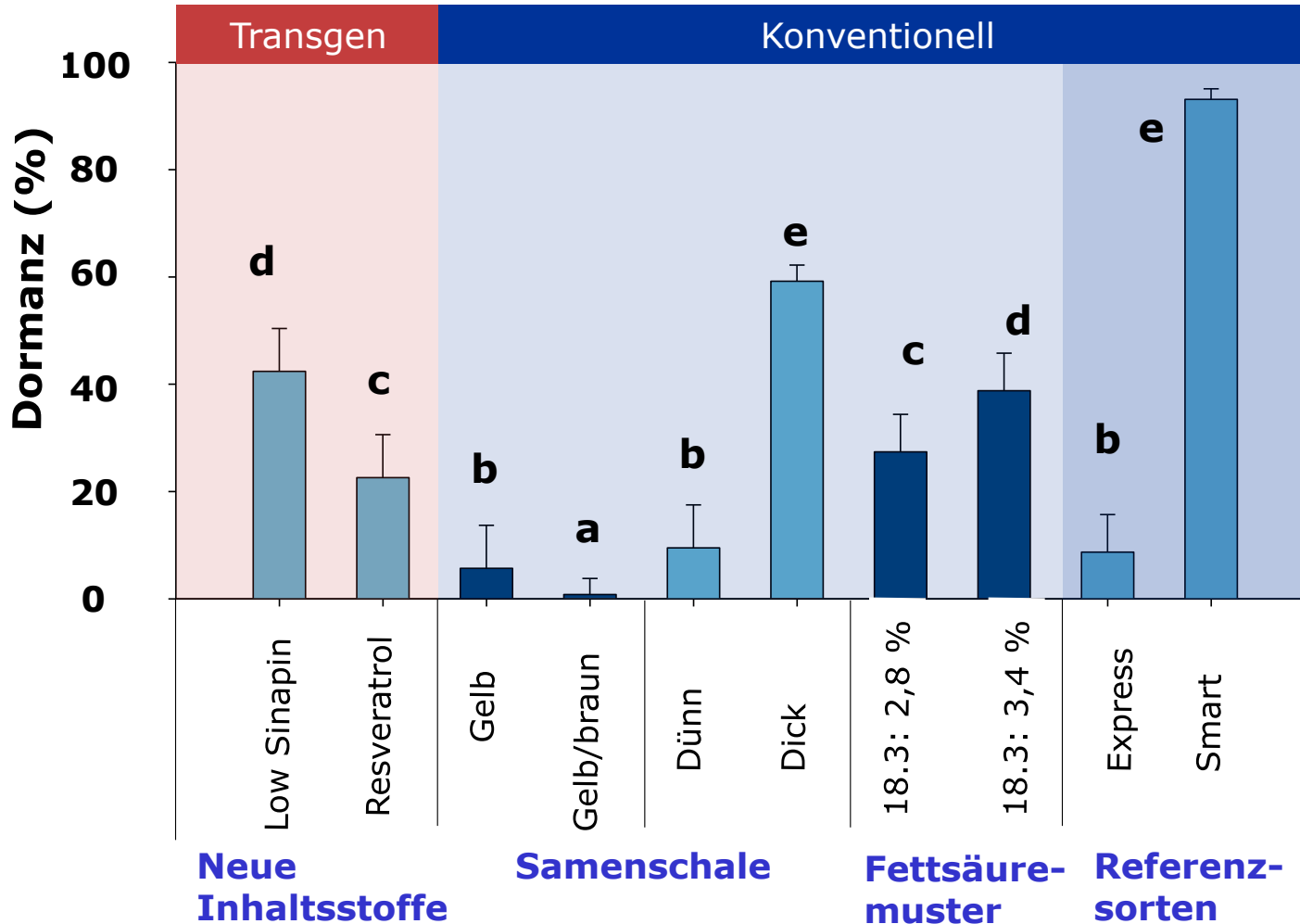
- ▶ Langzeit-Überdauerung und bundesweite Detektion von Durchwuchsrap in der Praxis, Auswertung anbautechnischer Einflussgrößen, Prognosemodell, Anbauempfehlungen

3b (JKI Braunschweig)

- ▶ Zuverlässigkeit der Kleistogamie als Confinement-Strategie (Unterbindung der Pollenverbreitung), Entwicklung eines PCR-Verfahrens zur quantitativen Bestimmung der Auskreuzung kleistogamer Sorten in nicht-kleistogame Sorten

Sekundäre Dormanz inhaltsstoffveränderter, transgener und konventioneller Sorten

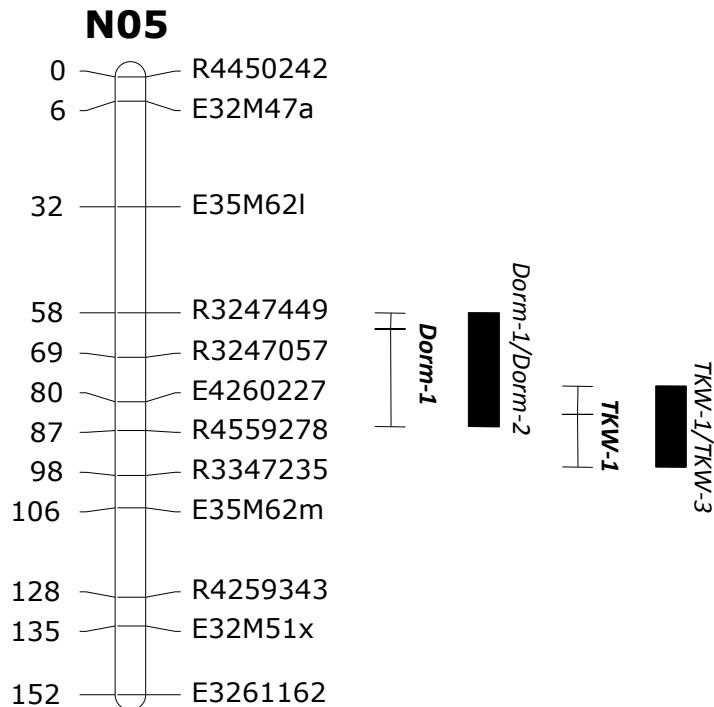
Universität Hohenheim



- ▶ **Dormanz:** Breite Variation bei transgenen und konventionellen Rapssorten
- ▶ **Samenschale:** Einfluss (Dicke, Farbe) auf Dormanz und Überdauerung

Abbildung: Datenauszug

Vererbung sekundärer Dormanz



- ▶ **Signifikanter Einfluss von Genotyp, Umwelt und Genotyp x Umwelt-Interaktionen auf „sekundäre Dormanz“**
- ▶ **Bei der QTL-Kartierung mit den Daten des ersten Versuchsjahres konnten 4 QTL identifiziert werden, die zusammen 35% der phänotypischen Varianz erklärten**
- ▶ **Entwicklung von Sorten mit einer geringen Dormanz ist möglich**

Kopplungsgruppe N05 mit QTL für Dormanz (Dorm) und Samengröße (TKW)

Durchwuchsrapr auf Praxisschlägen

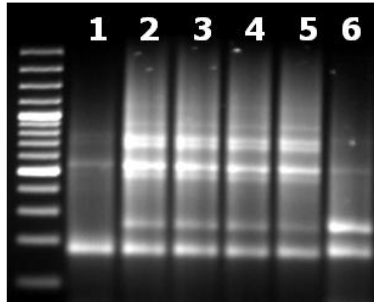
Anbauregion	Schläge (n)	Durchwuchs (DW) pro m ²	Rapsfolge < 4 J. (% Schläge)
Hügelland S-H	10	11,0	80,0
Diluvialb. NO	10	3,5	40,0
Brandenburg NW	5	0,5	20,0
Diluvialböden SO	11	0	9,1
Verwitterung SO	11	1,0	9,1
Höhenlagen M/W	7	4,0	42,8
Mittellagen SW	4	4,0	0
Marsch	7	3,0	14,3
Lehmböden NW	11	3,0	18,2
Löß Mitte/O	27	1,0	14,8

- ▶ **Wesentliche Einflussfaktoren: Standort und Anbauhäufigkeit**
- ▶ **Auf Schlägen mit geringer Anbauhäufigkeit (Rapsfolge > 5 J.) höhere DW-Raten durch Sorten mit hoher Dormanz**

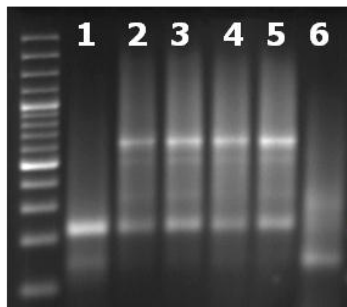


Kleistogame Genotypen

*Bam*HI SINE8



*Crf*13I SINE6



- 1 - CLG
- 2 - 0,1% CLG in Marcant
- 3 - 1% CLG in Marcant
- 4 - 5% CLG in Marcant
- 5 - 50% CLG in Marcant
- 6 - Marcant



Konventioneller
Raps



Kleistogamer
Raps

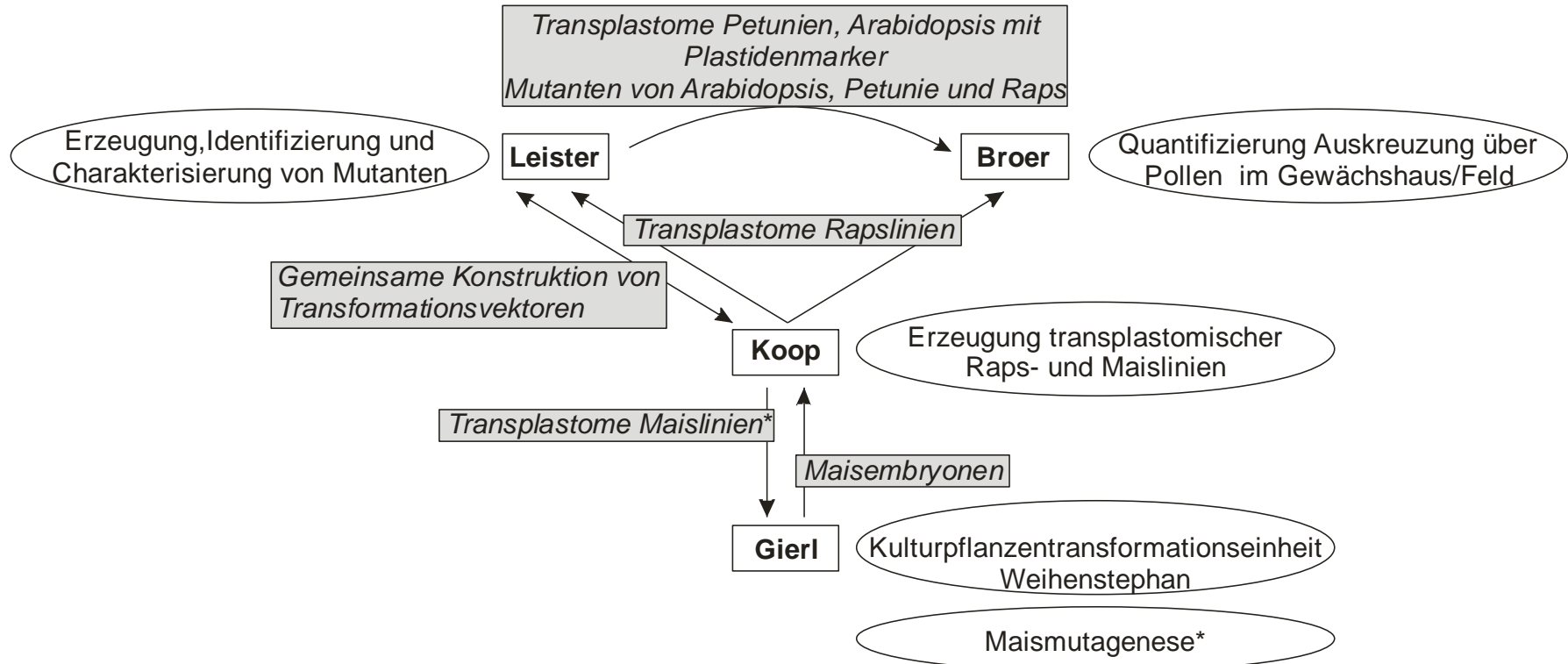
- ▶ **Charakteristische Banden treten auch in gespikten Proben mit einem Anteil von 0,1% CLG-Samen in Prüfsorte auf
→ Hinweis auf sensitive Nachweismethode**
- ▶ **Durch Klonierung und Sequenzierung der CLG-spezifischen DNA-Fragmente wird ein quantitativer real-time PCR Assay für CLG-Raps entwickelt**

BMBF-geförderte Projekte (3)

Entwicklung und Prüfung von Plastidentransformation
als Confinement-System bei Raps und Mais unter
Berücksichtigung der bei Modellpflanzen gewonnenen
Erkenntnisse

Confico: Übersicht

Entwicklung und Prüfung von Plastidentransformation als Confinement-System bei Raps und Mais, unter Berücksichtigung der bei Modellpflanzen gewonnenen Erkenntnisse





ConfiCo: Fragestellungen und Lösungsvorschläge

Ausgangspunkt

- Lehrbuch: die meisten (Kultur)pflanzen vererben Chloroplasten nur maternal
- Aber: es gibt neuere Untersuchungen, dass ein geringer Anteil von Plastiden auch über den Pollen vererbt werden und dass Chloroplastengene in den Kern transferiert werden

Fragestellung

- Wie sicher ist also dieses Confinement von chloroplastidären Genen?

Lösung

- Untersuchte Arten: Arabidopsis und Petunie (Modellpflanzen), Raps und Mais
- Feldversuch: Arabidopsis und Petunie
- Plastidentransformation: Raps und Mais
- Identifizierung der Gene, die maternale Vererbung ermöglichen (Arabidopsis, Petunie)



ConfiCo: wichtigste Ergebnisse

Transformation von Raps und Mais

- Transformations-Vektoren und -Protokolle sowie Regenerationsprotokolle wurden etabliert
- Beim Raps liegen bereits resistente Kalli vor

Freilandversuche Arabidopsis und Petunie

- Arabidopsis: keine messbare Verbreitung von Chloroplasten über den Pollen
- Petunie: Verbreitungshäufigkeit nach bisherigem Kenntnisstand im unteren Prozent-Bereich

Identifizierung beteiligter Gene

- Identifizierung einer Petunienmutante, in der die paternale Vererbung im Prozentbereich liegt



BMBF-geförderte Projekte (4)

Gentechnische Ansätze zur Begrenzung der
Ausbreitungsfähigkeit von Kartoffelknollen



Ansätze zur Begrenzung der Ausbreitungsfähigkeit transgener Kartoffeln

Problem:

Geringe Auskreuzungswahrscheinlichkeit, aber **Groundkeepers**; ca. 3% der Knollen verbleiben nach der Ernte auf dem Feld und können zu Durchwuchs in der Folgesaison führen

Lösung:

Herstellung nicht-keimender Kartoffelknollen



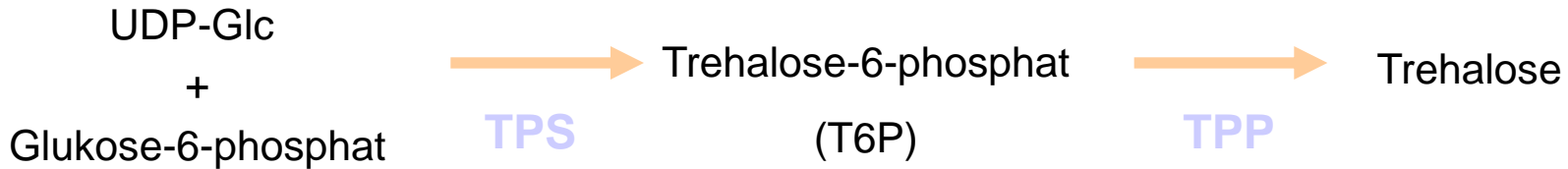
Aufheben der Keimruhe nach Zugabe eines chemischen Induktors

Zielprozesse zur Beeinflussung der Knollenkeimung:

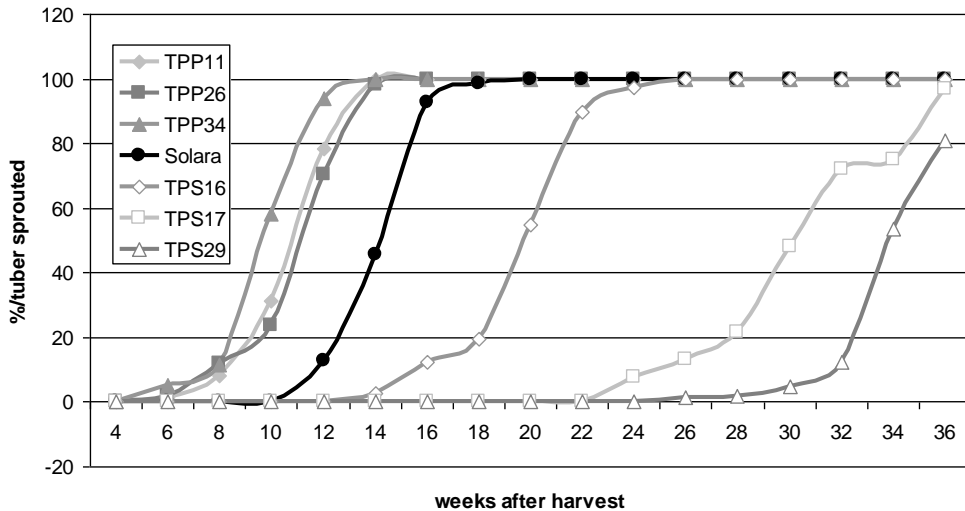
- Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels
- Veränderung des Phytohormonhaushalts
- Veränderung der Meristemaktivität

Beispiel: Veränderung des Kohlenhydratstoffwechsels

Trehalose-6-phosphat ist ein zentraler Regulator des Kohlenhydratstoffwechsels



Keimungsverhalten von transgenen Knollen mit verändertem T6P Gehalt



Wildtyp

Transgene Knollen mit erhöhtem Trehalose-6-phosphat Gehalt

Schlussfolgerungen und Empfehlungen

- In der Ausschreibung formulierte generelle Zielstellungen erreicht
- Fokussierung künftiger Sicherheitsforschung auf GVO erscheint nicht sinnvoll, da in den letzten Jahren auch zahlreiche weitere Methoden zur gezielten Genomveränderung bei Pflanzen entwickelt wurden
- Zunehmender Ausbau der Produktionsplattform Pflanze zur Herstellung von pharmazeutischen Produkten und industriellen Wertstoffen - Förderung von Entwicklung und Validierung von Confinement-Systemen weiterhin erforderlich, um deren Wirksamkeit und Nachhaltigkeit fundiert bewerten zu können
- Reduzierung regulatorischer Hürden – weiterhin Bestandteil der biologischen Sicherheitsforschung



Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit



Foto: Anke Schiemann