

Public Comments for Part C Notification C/GB/03/M5/3 (deadline 04/10/2003)
Glufosinate-tolerant Rice, LLRICE62

-----Original Message-----

From: [REDACTED]
Sent: 23 September 2003 13:42
To: SNIF comments
Subject: Comment on SNIF C/GB/03/M5/3 LLRice62

[REDACTED] comments on the summary notification for Bayer CropScience's application to place a Glufosinate-tolerant Rice, LLRICE62 on the European market.

Application ref: C/GB/03/M5/3

The GM rice was obtained by transforming the rice variety Bengal with the bar gene derived from the soil-borne bacterium *Streptomyces hygrosopicus*. The bar gene encodes phosphinothricin-N-acetyltransferase (PAT), an enzyme which inactivates the herbicide glufosinate ammonium. The bar gene was not introduced by a vector but by using a gene gun. However, the transformation event includes the 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter.

[REDACTED] have particular concerns about the safety of that PAT enzyme and the secondary metabolites produced in the plant as breakdown products of glufosinate ammonium as well as the potential impact of creating new disease as a result of the presence of the unstable 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter. We have great reservations about its use in genetic engineering. The promoter is active in animal and human cells. There are no toxicology results presented and the post-monitoring programme is useless.

Estimated demand

According to Bayer CropScience [Estimated potential demand in the Community] for the last three years, about 25% of the EU's imported rice originated in the U.S. (800,000 metric tonnes of rice in the 2001/2002 market year). The United Kingdom, the Netherlands, Germany, France and Belgium are the principal importers of U.S. rice. If the US wishes to secure any future for its European rice market, then the European Union will be doing American rice growers a great disservice should it authorise the marketing of GM rice. With European public opinion heavily rejecting GM foods/crops, it is clear that the main purchasers will go to great lengths to search out GM free rice and there will be no market for glufosinate-tolerant rice (called LL RICE 62) and the estimated demand is likely to be zero.

Expression of the PAT gene

Bayer state in the section on "Parts of the plant where the insert is expressed" that

"From published experience with the 35S promoter in rice, we expected LLRICE62 plants to show high levels of PAT protein in the leaves and lesser amounts in the other organs. Indeed, we found the following order of PAT expression leaf blade>>stem (culm)>>roots, seed (grain)

>>>>>pollen (not detected). The amount of PAT protein in the leaves of LLRICE62 during the vegetative life cycle of the plant has an upper limit of approximately 150 µg/g fresh weight. The amount of PAT protein in seed is 12 µg/g fresh weight."

Whilst the expression of the PAT gene might be reduced (or absent in the case of pollen), the PAT gene is present and its expression could be switched on again.

Potential to pass on the genetic trait

Whilst we recognise that the marketing application does not include cultivation of Liberty Link rice, rice is grown in some parts of Europe (In Europe, *O. sativa* is present in two forms; the cultivated rice in Italy, France, Portugal and Spain, and the introduced weed, red rice, which is present in some fields of cultivated rice), there is always a risk that GM rice grain might grow by accident in these countries and pass on the genetic trait.

Toxicology

There are no toxicology studies reported. The summary notification states:

"To support the finding of nutritional equivalence, poultry and swine were fed diets containing rice under study conditions designed to evaluate growth and health parameters. Poultry were selected to evaluate the effects of a feed component over an entire life span and under conditions of very rapid growth, thus the assay is highly sensitive for nutritional deficiencies or toxic effects. In contrast, swine represent a close approximation to the human food preferences and digestive processes. No differences were identified for nutritive value of the grain and no indications of toxic or adverse effects were associated with any of the sources of rice in either of the tested animal species."

Nutritional equivalence is no proof of safety or the absence of non-toxic side-effects on both the target and non-target audience that feed on the GMO during growth and post harvest.

Monitoring

There is no monitoring plan as such because there is no proposal to deliberately grow GM rice in Europe. The Bayer plan "provide for the general surveillance of unanticipated occurrence of adverse effects of the GMHP or its use on human health or the environment, which were not anticipated in the environmental risk assessment." This is to say that nothing will be done - this is clearly not an acceptable monitoring plan.

Loss of productivity and/or unexpected toxic plant products

██████████ professor emeritus of genetics at the University of ██████████ had this to say about this GMO:

Rice is an allotetraploid whose cultivated varieties are relatively current in evolutionary terms (Ge, S, Sang, T, Lu, B, and Hong, D "Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species" 1999 Proc. Natnl Acad Sci USA 96, 14400-5). Allotetraploids are made up of two or more diploid chromosome sets combined from grass species to make hybrids.

Rice is the world's most important food crop. GM rice is effected by somaclonal variation-a form of gene and chromosome instability that results from the tissue culture embryos used to propagate

GM crops (Labra, M, Savini, C, Bracale, M, Pelucchi, N, Columbo, L, Bardini, M and Sala, F "Genomic changes in transgenic rice plants produced by infecting calli with Agrobacterium tumefaciens "2001 Plant Cell Reports On line reports DOI 10.1007/s002990100329). Somaclonal variation occurs in tissue culture embryos from both normal and GM crops, but the effect is greatest in GM crops. Somaclonal variation is caused by replication of genetic elements called retrotransposons that replicate in the plant cell nucleus and are inserted into structural genes to cause mutation and chromosome rearrangement (Agrawal, G, Yamazaki, M, Kobayashi, M, Hirochika, R, Miyao, A and Hirochika, H "Screening of rice viviparous mutants generated by endogenous retrotransposon Tos17 insertion tagging of a zeaxanthin epoxidase4 gene and a novel OsTATC gene" Zool Plant Physiology 125, 1248-57). The genetic changes activated in producing GM crops may be numerous and subtle and may produce gradual loss in productivity of GM varieties or unexpected toxic plant products.

Glufosinate ammonium

We do not share Bayer's enthusiasm for Bayer's Liberty that they describe as having "positive environmental characteristics". The metabolites for glufosinate ammonium also have neurotoxic properties. These cannot be washed off the GM rice.

In a scientific research study conducted a year or two ago carried out at the University of [REDACTED] by [REDACTED] and [REDACTED] glufosinate ammonium, at the levels used in the GM fields, was found harmful to the caterpillars of skipper butterflies.

Glufosinate ammonium is a structural analogue of glutamate, an amino acid. Thus, glutamate is a building block of proteins in animals and plants. Glufosinate ammonium inhibits the plant enzyme glutamine synthetase, an essential enzyme in nitrogen metabolism and amino acid biosynthesis in plants, leading to the accumulation of ammonia in the plant and the death of the plant. It is also toxic to mammals, resulting in central nervous system problems (it can cross the blood-brain barrier to cause unconsciousness, convulsions, apnoea and amnesia), haematological and haemodynamic changes, increase levels of creatine kinase, gastro-intestinal symptoms and a syndrome similar to diabetes insipidus (Tanaka et al, 1998; Watanabe and Sano, 1998; Takahashi et al, 2000). It also causes considerable problems in embryos of mice and offspring of rats, including functional brain abnormalities, growth retardation, increased embryo lethality and very high rates of morphological defects (Watanabe and Iwase, 1996; Fujii, 1997).

This GMO offers NO benefit to the European market - indeed it offers dis-benefits. We ask that the EU reject this application.

[REDACTED]

[REDACTED]

Sent: 03 October 2003 20:40
To: gmoinfo-comments@jrc.it
Subject: [REDACTED] coment assessment report nr C/GB/03/M5/3

L.S.,

Attached to this message I send the JRC the comments of [REDACTED]
[REDACTED] of the [REDACTED] in het lichaam, re
the
assessment report nr C/GB/03/M5/3 on glufosinate resistant rice.

The comments are in the Dutch language and contain also the assessment
by
the late [REDACTED] and by [REDACTED] chemists.

I feel these comments are of the utmost importance and I recommend them
for careful consideration by the JRC.

the address of [REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

Sincerely,
[REDACTED]

AMSTERDAM, 30 september 2003

gmoinfo-comments @ jrc.it

Subject: Comment on Assessment Report

Notification number C/GE/03/M5/3

L.S.

Retreft: Glufosinate-tolerant Rice
Transformation event IERICE62
voor Import in the EU for all uses as any
other rice (food, feed and industrial uses).

Bij lezing van de Summary Information van deze Notification krijg ik een beeld van de grote nonchalance waarmee men ernstige schadelijke gevolgen voor onze gezondheid probeert te bagatelliseren. Waar is de onderbouwing van de al te gemakkelijke beweringen en waar zijn de onderzoeksresultaten? Op te veel punten wordt verwezen naar vroegere ervaringen (met het klassieke produkt) en wordt een en ander afgedaan met b.v. "no human health or environmental risks were observed" of "No effect could be observed (on birds or small mammals)".

Para.3-1:

De laatste drie jaren kwam ca. 25% van de in de EU geïmporteerde rijst uit de V.S., en werd erbij vermeld: not relevant. Wat is de bedoeling van deze mededeling? Inderdaad niet relevant. Alles is afhankelijk van het feit of het gebruik van het herbicide Liberty bestendig zal worden.

Voorlopig is in Nederland de toelating wederom op juridische gronden uitgesteld om de toelatinghouder in 2004 in de gelegenheid te stellen op een aantal punten te laten bewijzen, dat Liberty inderdaad niet schadelijk zou zijn voor een aantal organismen (wormen, vissen, vogels, kreeftachtigen, afvalwater). Zo zeker ziet de toekomst van Liberty er niet uit.

Para.15:

"Some segments of the population have been identified to have an allergic reaction to rice...". Deze "gevoeligheid" voor rijst zal er met die GM-rijst niet beter op worden. Het gebruik van GLA als bestrijdingsmiddel zorgt er voor dat het geacetyleerde product van GLA (via sprayen) IN de plant/rijstkorrel terecht komt. Twee Japanse onderzoekers beschreven de neurotoxicologische werking van GLA en apoptosis bij het embryo (Fujii, resp. Watanabe) bij opname van zeer KLEINE doses.

In de Notification wordt niet vermeld, hoe het zit met die allergie voor "klassieke" rijst. Zou het met iets kunnen zijn als allergie voor soja-"stof", dat ontstaat bij het verleden? Het is bekend, dat allergie voorkomt bij mensen

Para.21-b:
"From published experience ..." bleek in het blad van LLRICE62 ruim 12x zoveel FAT te zitten als in de rijst KORRE. Voornamelijk veroorzaakt door het "sprayen"? Via het blad krijgt de plant als eerste een lading herbicide te verwerken, vervolgens de stengel, wortels, zaad.

Para.22-d:
"...LLRICE62 are tolerant in Liberty herbicide..." Hierin zitten behalve de werkzame stof Glufosinaat ammonium, ook de "inerts" in de formulering: propaandiol, AES en formaldehyde. Propaandiol en formaldehyde (zie MCS) veroorzaken dermatitis- volgens documentatie uit Spanje en Frankrijk, en volgens eigen ervaring!

Para.23-a:
Gentr. Genetic Transfer worden uitdrukkingen gebezigd als "no indications", "no evidence", "no adverse impact to biodiversity". Komen deze uitdrukkingen ook voor in het uitgebreidere dossier??? Het komt toch wel al te gemakkelijk over. Niet vermeld werd, dat ONDERZOEK werd ingesteld om resultaten te boeken. Beweringen hebben geen waarde. De zaak moet onderbouwd worden.

Para.23-b:
Zeker van Uw zaak bent U niet. Horizontale Gentransfer werd in de literatuur uitvoerig beschreven: transfer van plant naar bacterie. Niks "unlikely".

En ovd'r dat substraat van FAT sluit ik een aantal stukken bij.

Para24-Gezondheidsschadelijk gevolgen voor de mens tengevolge van de modificatie zijn wel degelijk aanwezig. Dat "no harmful effects are expected" is een voorbij station! Dat stoffen uit de formulering van pesticiden door de mond, huid- ademhalingsorganen en lichaam binnenkomen (dus ook via voeding) wordt in een lawine van literatuurbronnen aangegeven en deze stoffen in de formulering maken het bestrijdingsmiddel schadelijker voor de gezondheid dat de z.g. werkzame stof sec.

Para.25:
Varkens hebben ongeveer dezelfde voedselvoorkeur als mensen en er waren geen aanwijzingen voor toxische of gezondheids-schadelijke effecten in verband met de "sources of rice in either of the tested animal species". DAT WE ALLEMAAL BEESTEN ZIJN WETEN WE AL LANGER DAN VANDAAG!

Para.25:
De onderhevige rijst LLRICE62 is ... not toxic for mammals and no effects on animal health are expected". En nu de mens. Dit event is wel degelijk schadelijk. In ieder geval blijkt uit de benadering van de gezondheidseffecten door de Notifier absoluut geen deferentie voor de mens. Dus toch: van een "broodje mens" wordt de kannibaal goed ziek!

Para.27:

"No effects could be observed on birds or small mammals".
Uit deze zinsnede blijkt overduidelijk, dat totaal geen onderzoek werd gedaan naar die effecten van toepassing van het herbicide op genoemde organismen.

Die niet zoekt zal niets vinden.

In Nederland staat of valt de toelating van Liberty met het leveren van bewijs of Liberty op basis van GLA niet schadelijk is voor kreeftachtigen, vissen, vogels, wormen, afvalwater in de zomer van 2005. Onderzoek dus in 2004.

Hoe kunnen we in 's hemelsnaam vertrouwen hebben in de niet-onderbouwde beweringen van de Notifier?

Para.29-2:

Hier wordt een nieuw licht geworpen op eventuele gevaren bij toepassing van het gewasbeschermingsmiddel Liberty. In Nederland zullen dus de toelatingseisen VASOUREPT moeten worden met betrekking tot het gebruik van het herbicide met zijn formulering in de nabijheid van "grain storage facilities, processing plants" etc.

Para.29-6:

"Possible immediate and/or delayed effects on human health resulting from potential direct and indirect interactions of the GMHP and persons working with, coming into contact with or in the vicinity of the GMHP release(s)".
....."Bayer CropScience safety assessment supports the benign toxicological profile of PAT protein...."
(Same as for other commercial rice varieties);
Welke andere rijst-varieteiten? Sorry voor de uitdrukking: maar dit komt over als misleidend gezwam. Wat is er "benign" aan vergif, dat wordt rondgespoten bij de toepassing van het herbicide Liberty. Voor PAT zie toegevoegde stukken.
"Benign" voor de inerts in de formulering (propaan-diel, formaldehyde die dermatitis veroorzaken, en AES die cardiovasculaire effecten geeft)? Dit woord is zeer cynisch gebruikt. En dan te denken aan al die slachtoffers die voor hun leven voortschrijdende effecten - gezondheidsschadelijke - opgelopen hebben. Zoals gezegd, totaal geen deferentie voor de mens.

Para.29-8:

....."LLRICE62 is substantially equivalent to non GM rice except for the intended trait.. Niks gelijkwaardig, dus.

Para.31-a:

Ook geen deferentie voor de bevolking in landen buiten de EUROPA!

"...LLRICE62 may establish in the environment and, thereby modify the biodiversity. Furthermore it might transfer the trait via pollen flow to other cultivated rice or weed rice (red rice) or wild rice ... in the vicinity and contribute to their establishment and modification of the biodiversity too. However the anticipated area of cultivation is not in

AMSTERDAM 30.9.03 -4-

Para.31-b: Effects on endangered species.

"No adverse effects are expected on endangered species since no adverse effects have been observed on non-target organisms including birds and small mammals."

Als die effecten wel zouden zijn waargenomen, zou dat zijn dat die species door het gevaar het loodje legden. De mens is ook een endangered species. Uit een en ander blijkt, dat er geen wezenlijk diepgaand onderzoek is gedaan naar bedoelde effecten en ook dat er een totale onverschilligheid is voor het milieu en de mens. Een bijdrage aan de voedselonveiligheid

Para.32-c:

... "in the USA no human health or environmental risks were observed".

Hier moet ik weer verwijzen naar de zwaar MISLEIDENDE TESTS om dermatitis op te sporen in besmetting met het "inert" propaandiol, waarbij vaseline als "vehicle" gebruikt wordt, zodat er geen bewijs gevonden kan worden, daar door die vaseline de propaandiol niet door de huid kan doordringen en de "metabolic pathway" niet kan plaatsvinden. Wereldwijde misleiding, en wereldwijd wordt "geen effect gevonden"!

Eindelijk is er een plan om te zoeken naar "unanticipated occurrence of adverse effects of the GMHP; dus die onverwachte effecten zijn wel degelijk bekend!

In aansluiting aan deze brief vindt U een aantal uiteenzettingen over de problemen met het PAT, geschreven door de [REDACTED] en [REDACTED]

- [REDACTED] -Twee proefopzetten (onderzoeken) waaruit elkaar tegenstelde conclusies werden getrokken [REDACTED]
- " -"Achtergrond"
- " -"Chemische reacties"
- " -"De 5 Substraten van PAT"
- " -Commentaar op Research article van A.Wehrmann
- " -Opmerkingen in verband met de ziekte van Crohn.
- [REDACTED] -Kanttekeningen bij de substratspecificiteit van PAT.

Het is duidelijk, dat de toelating van LMRICE62 geen door- gang mag vinden.

Hoogachtend,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

AMSTERDAM, 7 november 1999

TWEE PROEFPZETTEN (onderzoeken) waaruit elkaar tegen-
gestelde conclusies werden getrokken, t.w. van

1. [REDACTED]: Characterization of the
[REDACTED] antibiotic resistance gene bar from *Streptomyces*
hygroscopicus;
2. [REDACTED] L-Phosphinothricine N-Acetyl-
transferase - Biochemical Characterization - een rapport
verwerkt in Wehrmann 1996 (Schulz is co-auteur).
Het onderwerp is de characterization van het enzym
Phosphinotrycinacetyltransferase PAT, en wel in het
bijzonder de specificiteit van de substraten.

Het eerste onderzoek betreft de reactie van phosphino-
thricine acetyl co-enzym A onder invloed van het enzym
PAT EN VERGELIJK DIT MET een aantal structurele analogen
van PPT Phosphinothricin.

Eén van de analogen was L-glutamaat.

De reactieproducten werden geïdentificeerd via een
massaspectrogram en de evenwichtsconstanten (de affiniteit)
werd bepaald.

Naast Phosphinothricine (PPT) werden een aantal structurele
analogen getest of er een acetyleringsreactie plaats vond.

L-Glutaminezuur was een van de onderzochte stoffen.

Ten opzichte van PPT was de affiniteit van de meeste stoffen
gering; één stof reageerde niet.

Bij deze proef, waarbij een reactie optrad tot een geïdenti-
ficeerd product (de detectiegrens is hier niet in het
geding) dat getalsmatig kan worden gerapporteerd, lijkt er
geen reden aanwezig om aan het feit, dat glutaminezuur
een substraat is van PAT te twijfelen.

Het tweede onderzoek betreft de reactie van een groot
aantal aminozuren, waaronder L-glutaminezuur, dat ook in
het eerste onderzoek voorkwam, in een reactiemix tezamen
met 100% overmaat PPT t.o.v. de acetylbron acetyl co-enzym A
en PAT. Reactieproducten werden via chromatografie
geïdentificeerd.

Ook bij een zeer grote overmaat L-aminozuur konden geen
reactieproducten met de aminozuren worden gevonden. Er
werd alleen [REDACTED] acetylphosphinothricine gevonden.

De auteurs concludeerden dat PAT heel specifiek alleen PPT
als substraat heeft.

AMSTERDAM 7.11.99

Tegen deze, met het eerste onderzoek in strijd zijnde conclusie, kan het volgende worden aangevoerd. (Overigens wordt het eerste onderzoek in de literatuurlijst van het tweede onderzoek genoemd):

- 1 - er is geen detectiegrens bepaald voor geacetyleerd L-glutaminezuur.
- 2 - De mogelijkheid, dat geacetyleerd glutaminezuur een acetylbron is voor de acetylering van PPT is buiten beschouwing gebleven.
In de proefopzet had dit gerealiseerd kunnen worden door geacetyleerd glutaminezuur aan de reactiemix toe te voegen in een hoeveelheid boven de detectiegrens en na te gaan of deze hoeveelheid toegevoegde hoeveelheid bij de reactie verdwijnt.
Op grond van de resultaten van het eerste onderzoek zal het verdwijnen zeker voorspelbaar plaatsvinden!!
- 3 - Er is gewerkt met een reactiemix waarin een grote overmaat van een concurrerend substraat, het PPT, aanwezig was.
Observaties met de zuivere aminozuren zijn niet gedaan.
- 4 - Een bespreking van de uitkomsten van het eerste onderzoek in het bijzonder waarom deze anders uitvallen, ontbreekt geheel.
- 5 - In wezen beschuldigen de auteurs van het tweede onderzoek de auteurs van het eerste onderzoek van duimzuigerij van fraude (het eerste onderzoek bevat een schat van getalsmatige gegevens; in het tweede onderzoek ontbreken getallen).
In het tweede onderzoek is dit aspect onvoldoende uitgewerkt.

De achtergrond van de conclusie, dat PAT slechts één substraat - het PPT - zou hebben is het volgende:

In herbicide (PPT)-resistente gewassen komt het gen-product, het PAT - voor.

→ Voor een toelating tot de markt moet de giftigheid van dit gen-product worden bekeken.

Zou dit gen-product kunnen reageren met onze DARMINHOUD b.v. met het - belangrijke - aminozuur L-glutaminezuur?

Het zou handenvol onderzoeksgeld betekenen om het te bagatelliseren. Totaal ontkennen lijkt voor HOECHST een betere strategie!

Wij geloven, dat de conclusie uit het tweede onderzoek totaal ongefundeerd is en dat het onderzoek niet de naam van "onderzoek" mag dragen. Het is een incompetent onderzoek, en de mensen, die dit citeren dienen op de incompetentie te worden aangesproken.

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

AMSTERDAM 7.9.99

Schulz

ACHTERGROND

Het eiwit PAT komt in transgeen voedsel voor.

Reageert dit enzym misschien met onze darminhoud?

In 1987 werd gevonden ([REDACTED]) dat PAT met L-glutamaat kan reageren. Beide stoffen zijn in onze darm aanwezig.

Wat zijn de doemscenario's van de aanwezigheid van geacetyleerd glutamaat en een verminderde aanwezigheid van glutamaat?

Alleen al de kosten van het onderzoek hiernaar zijn prohibitief voor verdere ontwikkeling van transgeen voedsel met PAT.

Dat is natuurlijk problematisch voor de toelating van transgeen voedsel.

Vandaar een mislukte poging om [REDACTED] te weerleggen.

AMSTERDAM 7. september 1999

CHEMISCHE REACTIES

- Een reactie kan aflopen, d.w.z. alles zet zich om;
- Een reactie is niet mogelijk, d.w.z. niets wordt gevormd;
- Alle tussenvormen komen voor, d.w.z. er is een evenwicht tussen de reagerende stoffen en het reactieproduct; het reactieproduct vormt weer de reagerende stoffen door ontleding.

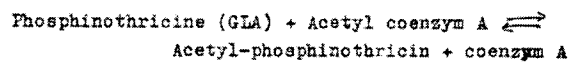
Wij schrijven dit:



Een katalysator is een stof, welke zorgt, dat het evenwicht zich instelt, daarbij verdwijnt de katalysator niet.

PAT is zo'n katalysator

Phosphinothricine - Acetyl - Transferase



Wet van het evenwicht:

$$\frac{\text{GLA concentratie} \times \text{concentratie acetylbron}}{\text{concentratie geacetyleer produkt/GLA} \times \text{concentratie co-enzym}} = \text{Konstante } K.$$

We schrijven Concentratie door Vierkante haken te plaatsen:

$$\frac{[A] \times [B]}{[C] \times [D]} = K$$

Zonder PAT wordt dit evenwicht NIET bereikt, er gebeurt wel iets, maar te langzaam!

Met PAT wordt alleen de L-enantiomeer in evenwicht gebracht; de D-enantiomeer blijft onveranderd.

GLA is een racemisch mengsel van de D en L-enantiomeer.

AMSTERDAM 7.9.99

-1-

Chem.reacties

PAT blijkt ook de reactie van L-enantiomeren van aminozuren, zoals o.a. glutaminezuur, tot een evenwicht te brengen.

L-glutaminezuur is dus ook een substraat voor PAT.

In een mengsel van geacetyleerd glutaminezuur, geacetyleerd glufoosinaat en de ongeacetyleerde produkten kunnen we na toevoeging van PAT een evenwicht vinden: te berekenen via de Reactieconstante K.

bepaalde deze verschillende K's:
in een mengsel geldt de K van ieder deel van het mengsel!

K is afkorting voor Konstante.

waarin één van de geacetyleerde produkten niet meer analytisch is aan te tonen, maar natuurlijk NOG WEL aanwezig zal zijn.

heeft zo'n mengsel gefabriceert. Als hij aan zijn mengsel nog extra geacetyleerd L-glutamaat had toegevoegd, dan zou dit zijn verdwenen. (Dan had hij ook net als bewezen, dat L-glutamaat een substraat is van PAT).

Het niet aantonen van geacetyleerd glutaminezuur (glutamaat) is in dit geval **JUIST EEN BEWIJS**, dat glutaminezuur een substraat is van PAT.

De proefopstelling van deugde niet.

Het mengsel van bevatte 100% overmaat van het giftige glufoosinaat ammonium t.o.v. alle acetylbronnen. Bovendien, zulke omstandigheden komen toch niet in het darmkanaal routinematig voor!

Om te demonstreren, dat PAT niet praktisch giftig zou zijn is **POUT!**

N.B. Uit dit verhaal blijkt, dat absoluut suivere stoffen **NIET** bestaan; alles is altijd met de stoffen, waaruit het gevormd werd, verontreinigd! Al is het maar nog zo weinig!

AMSTERDAM 7.9.99

De 5 SUBSTRATEN VAN PAT

1 - L-Phosphinothricin	K_M = 0,06 mMol
2 - DMPPT	= 2. "
3 - L-Glutamaat x)	= 240. "
4 - Methionine Sulfoximine	= 36. "
5 - δ - hydroxylysine	= 56. "

x) Affiniteit is dus 4000 x kleiner dan voor GLA.

Als er GLA aanwezig is, dan gaat deze GLA acetylering 4000 x sneller dan bij glutamaat. Bij [redacted] was bovendien 50% overmaat van GLA t.o.v. het Co-substraat (acetyl - co-enzym A). Logisch, dat hij in zijn proef niet kon aantonen, dat L-Glutamaat geacetyleerd was.

Voorspelbaar uit de proeven van [redacted].

De proef geeft geen uitslag; zonder GLA wordt glutamaat gewoon geacetyleerd, zij het mondjesmaat.

De grote fout van [redacted] is:

Acetyl-L-glutamaat niet getest als Co-substraat

Wehrmann testte wel nog andere Co-substraten, n.l.

Malonyl Co-enzym A

Succinyl Co-enzym A

Op geen enkele wijze probeert Schulz te verklaren waarom [redacted] en hijzelf tot totaal verschillende uitspraken komen. DIT IS EEN OMISSIE.

Als [redacted] nog leeft, dan is hij misschien bereid Schulz te corrigeren.

AMSTERDAM, 7 september 1999

Research Article: The similarities of bar and pat gene products make them equally applicable for plant engineers

Dit is geen echte Rapportage

Aan de reactie-omstandigheden zijn slechts 7 (zeven) regels gewijd.

Dit is veel te weinig

In de tekst wordt gesuggereerd, dat de reactie is uitgevoerd met zuivere L-aminozuren. Uit de 7 regels blijkt echter, dat zij met mengsels hebben gewerkt. De reactie met zuivere L-aminozuren werd in 1987 gerapporteerd () en daarbij bleek o.a. L-glutamaat te reageren (geacetyleerd te worden).

Uit de reactie-omstandigheden in de 7 regels blijkt, dat met mengsels met GLA is gewerkt. In een correcte rapportage behoren verscheidene pagina's aan de reactie-omstandigheden - de proefopzet - gewijd te worden ().

De rest van het rapport geeft geen duidelijk beeld, dat slechts met mengsels van L-phosphinothricine en L-aminozuren werd gewerkt, en dat helemaal geen controle-proeven zijn genomen met geacetyleerde eindprodukten.

Een juiste proefopzet zou zijn geweest:

- Reactie uitvoeren met de zuivere componenten
 - L-aminozuren, o.a. glutamaat
 - L-phosphinothricine
 - Acetyl Co-enzym A
 - PAT
- Reactie uitvoeren met mengsels van verschillende L-aminozuren, tesamen met L-phosphinothricine
- Reactie uitvoeren met mengsels waaraan "zuiver" geacetyleerde eindprodukten zijn toegevoegd, ter controle, dat deze in het mengsel enerzijds analyseerbaar zijn, en anderzijds, dat zij na reactie eventueel verdwenen zijn.

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

12

AMSTERDAM

7.9.97

Vreemde xenobiotische stof, die getest moet worden op effecten. Bis.

Glutamaat hebben wij in onze voeding nodig
Bij verminderd gl. in onze voeding: deficiëntie afwijkingen.

Door Nutricia wordt glutamaat aan de enterale voeding toegevoegd.

Bij verminderd glutamaat wordt het effect van enterale voeding minder.

Die zieke mens vindt geen optimale genezing bij verminderd glutamaat

[REDACTED]

Kanttekeningen bij de substratspecificiteit van PAT

In respectvolle herinnering aan [REDACTED]
om zijn onverzettelijkheid waar het de handhaving betrof van
wetenschappelijke kwaliteit en volledigheid.

Probleemstelling

Een belangrijk argument in de toelating van AgrEvo glufosinaat ammonium tolerant
raapzaad was de overweging van het Scientific Committee on Plants¹ dat

*'the only known substrate of phosphotricin acetyltransferase (PAT) is the
herbicide glufosinate ammonium'.*

Dit oordeel gaat terug op de publicatie Wehrmann et al. 1996² en achterliggende
onderzoek door [REDACTED] (zie onder), het is echter in tegenspraak
met [REDACTED] et al. 1987³. In die laatstgenoemde publicatie worden nog ettelijke
andere substraten vermeld dan phosphotricine (PPT), waaronder glutamaat en
delta-hydroxy-lysine. Gelet op gegevens als die uit de neurofarmacie dat stoffen
als PPT en zijn metaboliet de-methyl-PPT tot de (grote groep van de) glutamaat-
analoga behoren⁴, was een nog veel uitgebreider onderzoek (dan dat van
[REDACTED] et al.) naar andere substraten voor het PAT aangewezen.
Zulk onderzoek heeft echter nimmer plaatsgevonden.

Aan de voor toelating uit te voeren proeven zijn echter ook een aantal algemene
voorwaarden verbonden waaraan de gepubliceerde, dan wel aangeleverde,
proeven niet voldoen. We noemen er enkele, waarna we ingaan op de feiten van
het wél voorliggend materiaal.

¹ Scientific Committee on Plants - Outcome of discussions -
Opinion of the Scientific Committee on Plants regarding the genetically modified, glufosinate-
tolerant rape notified by the AgrEvo Company -
Submitted 10 february 1998

² A. Wehrmann, A. van Vliet, C. Opsomer, J. Botterman, A. Schulz -
The similarities of *bar* and *par* gene products make them equally applicable for plant
engineers -
Nature Biotechnology 14(1996)1274-8

³ C. J. Thompson, N. Rao Movva, R. Tizard, R. Cramer, J. E. Davies, M. Lauwereys, J. Botterman -
Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus* -
EMBO J. 6(1987)2519-23

⁴ Zie bijvoorbeeld: J. C. Watkins -
L-glutamate as a central neurotransmitter: looking back -
Bioch. Soc. Trans. 28(2000)297-310

Ten eerste dient het in-planta-PAT te worden gebruikt en niet het in E.coli geproduceerde PAT.

Toelichting:

Er zijn in doorsnee ruime verschillen tussen 'dezelfde' eiwitten uit bacteriën en die uit hogere organismen. Die verschillen kunnen zelfs als spelen bij transcriptie, splicing en translatie, ze spelen echter heel veelvuldig bij de transformaties volgend op de translatie. Het is beslist onjuist ervan uit te gaan dat het 'hetzelfde' PAT zal betreffen. Bijvoorbeeld geldt juist voor immunologisch en anderszins zo belangrijke zaken als glycosylering dat zij in-planta een belangrijke rol spelen, in bacteriën echter slechts incidenteel (en dan nog anders).

Zoals de zaken nu liggen is om deze hoofdreden het voorliggend toelatingsmateriaal ondeugdelijk.

Ten tweede dienen proeven de in-planta omstandigheden te weerspiegelen.

Toelichting:

Die omstandigheden weerspiegelen ze in het voorliggend materiaal in 't geheel niet. Nergens is rekening gehouden met de fysiologische e.a. omgeving van het PAT. Heel het onderzoek naar die omgeving wacht nog - laat staan dat de uitkomsten gebruikt zouden zijn in opzetten voor toelatingsproeven.

Intussen is die fysiologische omgeving wel beslissend. In het toelatingsmateriaal worden pH's en temperaturen gebruikt die deels beslist, deels vermoedelijk sterk afwijken van die in-planta. Daarmee is de geldigheid van die proeven al direct een vraagteken. Op verder gaande vragen krijgen we al helemaal geen antwoord.

Ten derde is er intussen een veelheid aan onderzoek verschenen dat zou moeten mee-beslissen over de toelating, echter in de afgelopen jaren om onduidelijke redenen buiten beschouwing is gebleven, dan wel eerst recent tot vraagtekens leidde bij een eventuele toelating.

Toelichting:

Dit algemene punt betreft een scala aan problemen voor mens en milieu. We noemen het nu slechts en gaan ervan uit dat we in een later stadium de gelegenheid krijgen het toe te lichten in zijn verband met de toelatings-eisen te stellen aan glufosinaat-ammonium resistent raapzaad (e.d. gentech gewassen).

Toetsing van wel voorliggend materiaal

Intussen is het ook nu al mogelijk om

- a) de mate van overeenstemming en verschil van de door Hoechst verstrekte gegevens na te lopen met die van Thompson et al. 1987
- b) af te wegen of de proeven waarop de door Hoechst verstrekte gegevens zijn gebaseerd wetenschappelijk voldoende gehalte hebben.

Bij dat laatste maken wij mede gebruik van het interne Hoechst-rapport

Schulz 1993³.

In de tekst van de publicatie van Wehrmann et al. (p. 1276) wordt gesteld

'No acetylation of the L-amino acids was detected...'
Uit het Experimental protocol (p. 1277, 1278) blijkt echter dat niet de afzonderlijke aminozuren zijn getest, maar dat telkens met een mengsel met het PPT is gewerkt. Tegenover 0,04 mM PPT stond in het reactiemengsel 2 mM aminozuur. Nemen we eerst aan dat deze proefopzet geen verdere complicaties veroorzaakte, wat houdt hij dan chemisch in?

Nemen we - met Thompson et al. p. 2521 - aan dat we een Michaelis-constante (met achterliggende kinetiek etc.) mogen hanteren, namelijk (mM) 0,06 voor PPT en 240 voor glutamaat GLA, dan levert eenvoudig cijferwerk een verhouding van de concentraties van het enzym-substraat-complex voor PPT vergeleken met dat voor GLA 80:1. Bij voor beide substraten ongeveer gelijke kat. constante (Thompson et al. p.2521) betekent dat, onder de toegepaste reactie-omstandigheden, ook een te verwachten product-verhouding 80:1. De toegepaste detectiemethode nu - een TLC variant die hoogstens semi-kwantitatief is, in de uitvoering gekozen door Schultz en door Wehrmann et al. - laat aantoning van zo'n relatief lage concentratie van geacetyleerd GLA niet toe.

Andere proeven uit Schultz '93 lopen vast op dezelfde punten (te verwachten productverhouding plus ongevoelige detectiemethode). Zie bijv. de proef vermeld op p.5 van Schultz '93.

Conclusie:

de beweerde 'no acetylation' is middels de aangevoerde proeven niet aangetoond en k n bij de toegepaste proefopzet ook niet worden aangetoond.

De proefopzet doet echter ook overigens veel vragen rijzen. Men gaat er namelijk stiltzweigend vanuit dat andere substraten in staat zijn om het PPT onder de omstandigheden van de proef uit het enzym-substraat complex te verdringen. Blijkens tekst en protocol was er per keer nog geen picomol aan enzym aanwezig, tegenover zeg 2 micromol PPT (bij een reactievolume 50 ml). Bij deze verhouding kan het PPT zeer wel - tenminste voor de duur van de proef - de toegang voor andere substraten tot het enzym belemmeren. Dit soort mogelijkheden is door de onderzoekers echter niet uitgesloten.

Wehrmann et al. vermelden ook nog een 'competition assay' tussen PPT en GLA (p.1276) waaruit zou blijken dat ook relatief zeer hoge concentraties aan GLA geen belemmering vormen voor de acetylering van PPT. Daarbij komt uiteraard als eerste de boven genoemde mogelijkheid op. Lezing van de eigenlijke proefopzet in Schultz '93 (p.3) - Wehrmann et al. geven geen enkel detail - leveren aansluitende vragen.

³ A.Schulz -
L. Phosphinotricin N-Acetyltransferase: biochemical characterization -
Hoechst, Geschäftsbereich Landwirtschaft, Report No. 93.01

Daar staat namelijk

'14-C-PPT (0,035 mM) was incubated with acetyl-CoA and an acetyltransferase amount sufficient to give ca. 50% conversion of PPT to Acetyl-PPT'.

Afhankelijk van de volgorde van toevoeging van de reactie-componenten zou dit bijvoorbeeld kunnen betekenen dat het enzym al verbruikt was vóór het aminozuur erbij kon komen. Ook diverse andere onbeantwoorde vragen rijzen bij deze summierse verwoording van de gedane proeven. Zoals de zaken nu liggen is de geschetste proefopzet dus niet geschikt om de gestelde vraag (naar competitie) te beantwoorden.

De minst discutabele proefopzet is mogelijk die van de vergelijkende proef Schultz '93 p. 5/6. Daarin wordt namelijk gezocht naar (enig) geacetyleerd GLA, d.w.z. is er een kwalitatief analysedoel dat past bij de gebruikte TLC-methode. Bij deze proef moeten equimolaire PPT en GLA door gelijke concentraties enzym worden omgezet.

Eenvoudig rekenwerk vanuit de Michaelis-Menten kinetiek etc. levert hier een enzym-substraat-complex verhouding voor PPT:GLA = 4000:1. Blijkens het protocol moet 0,1 minuut voldoen om het PPT om te zetten. Nemen we aan dat de kat. constante voor de GLA-omzetting gelijk is aan die voor de PPT-omzetting, dan zou (bij deze enzym-substraat-complex verhouding) voor eenzelfde mate van GLA-acetylering 400 minuten nodig zijn. In dat geval zou na 90 minuten enig geacetyleerd GLA aantoonbaar moeten zijn.

Intussen blijven we ook hier met onbeantwoorde vragen zitten. Enkele beslissende vragen stelden we boven al (Inleiding). Zolang deze niet zijn beantwoord, heeft de laatst besproken proef geen geldigheid. Daarbij komt o.m. nog de vraag of het Acetyl-CoA wel zo geschikt is als co-substraat en acetyleringsbron voor het GLA. Blijkens Wehrmann et al. p. 1275 zijn ook andere cosubstraten mogelijk, deze zijn echter niet getest. Er is ruim reden dat wel te doen: de nauwere chemische verwantschap tussen PPT en Ac-CoA dan die tussen GLA en Ac-CoA doet de vraag rijzen of het enzym-coenzym-substraat-complex in deze gevallen wel gelijk is. Het feit dat het werkzame enzym een dimeer is, maakt de variatie-mogelijkheden hier alleen maar groter.

Conclusie:

de gebruikte proefopzetten zijn, gelet op de daaromtrent geleverde gegevens, ongeschikt om de vraag naar de specificiteit van het PAT te beantwoorden.

-----Original Message-----

From: [REDACTED]
Sent: 04 October 2003 12:03
To: gmoinfo-comments@jrc.it
Subject: Comment on SNIF C/GB/03/M5/3-bijlage 1 en 2.

L.S.,

[REDACTED]
[REDACTED] heeft mij gevraagd haar
"Comment on Assesment report C/GB/03/M5/3" via 16 bijlagen aan u te doen toekomen.

Ik zal u acht e-mails doen toekomen met elk 2 bijlagen. Tesaamen vormen zij het gehele
bezwaarschrift met bijlagen van [REDACTED]

Vriendelijke groeten,

[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]
[REDACTED]

(Attachments are the same as the 16 attachments above)