



**Antrag 6786-01-0150**

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten  
Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (Transformationsevents  
B33-LegHg-3' OCS 13, 45, 54 und 57) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,  
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,  
Berlin, den 18. März 2004**

**Hinweis zu diesem Dokument:**

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
  - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
    - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
    - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
    - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
    - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
  - III.2. Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

### III.1.2.1. Bewertung der durch die übertragenen Nukleinsäuresequenzen bewirkten Veränderungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen

#### (a) Die cDNA des Leghämoglobingens aus *Lotus japonicus* (LegHg-Gen)

Im Gegensatz zu höheren Tieren verfügen Pflanzen über kein Transportsystem für Sauerstoff. Die Sauerstoffverteilung erfolgt, ausgehend von Öffnungen in den Abschlussgeweben (Stomata und Lentizellen), über Gasdiffusion durch Interzellularräume zu den Orten des Verbrauchs. In Organen, deren Oberfläche/Volumen-Verhältnis klein ist und die über englumige Interzellularräume verfügen, kann die Sauerstoffversorgung tiefer liegender Organschichten unzureichend sein. Die Sauerstoffversorgung wird dann zum limitierenden Faktor für die Intensität energieverbrauchender Prozesse, u. a. der Stärkebiosynthese.

In Zellen von unterirdisch wachsenden Kartoffelknollen, die keine Photosynthese betreiben können, werden energieverbrauchende Prozesse über ein Regulationssystem der Verfügbarkeit energiereicher, reduzierter Verbindungen angepasst. Dieses Redoxregulationssystem verändert die Aktivität des Enzyms ADP-Glucose-Pyrophosphorylase (AGPase), welches den ersten Schritt der Stärkebiosynthese katalysiert und als entscheidende Kontrollstelle des Stärkestoffwechsels funktioniert.

Es wurde daher versucht, die Sauerstoffversorgung in Kartoffelknollen durch Expression des Gens für das pflanzliche Protein Leghämoglobin zu verbessern. Das Gen stammt aus der Leguminose *Lotus japonicus* und kodiert für ein Protein, das den Proteinen ähnlich ist, die den Transport von Sauerstoff in Wirbeltiergeweben gewährleisten. In *Lotus japonicus* wird dieses Protein in den Wurzelknöllchen gebildet, wo es die Sauerstoffversorgung bei minimalem Partialdruck an freiem Sauerstoff im Gewebe sicherstellt.

Das hier verwendete LegHg-Gen stammt aus einer *Lotus japonicus*-cDNA-Bank. Zur Herstellung der cDNA-Bank wurde aus Wurzelknöllchen von *Lotus japonicus* Poly(A)-mRNA isoliert. Unter der Kontrolle des B33-Promotors erfolgt die Expression überwiegend in den Geweben der Kartoffelknolle, sporadisch bzw. nach Induktion mit Saccharose auch im Spross. Die zur Freisetzung beantragten Transformanten wurden auf mRNA-Ebene (Northern Blot) auf die Expression des Leghämoglobingens in Knollengewebe untersucht. Alle Transformanten weisen Leghämoglobin-RNA auf, welche bei der untransformierten Ausgangssorte nicht nachweisbar ist.

In Gewächshausversuchen führte die Bildung der Leghämoglobin-RNA zu einem erhöhten Sauerstoffgehalt in einer Tiefe von 2 mm unter der Knollenschale, zu vergrößerten Lentizellen und zu einem erhöhten Stärkegehalt in den Kartoffelknollen. Unter den Bedingungen des Foliengewächshauses war der Phänotyp des oberirdischen Teils des Sprosses im Frühjahr/Sommer 2003 nicht verschieden von der Ausgangssorte.

Leghämoglobin ist in den Wurzelknöllchen wild vorkommender *Lotus*-, *Melilotus*-, *Medicago*- und *Trifolium*-Arten sowie landwirtschaftlich genutzter Fabaceen (Luzerne, Weißklee) vorhanden und gelangt beim Abbau der Knöllchen nach dem Absterben der Pflanzen in den

Boden. Nachteilige Effekte der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen auf Bodenleben oder unterirdische Fraßschädlinge sind daher nicht zu erwarten.

In den Ernteprodukten landwirtschaftlicher Nutzpflanzen sind die leghämoglobinhaltigen Wurzelknöllchen der Fabaceen nicht enthalten. Direkte toxische Wirkungen des Leghämoglobins sind nicht bekannt. Infolge der postulierten Beeinflussung des pflanzlichen Stoffwechsels über die Redoxregulationssysteme ist es nicht auszuschließen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffeln einen veränderten Gehalt kartoffeleigener toxischer Alkaloide aufweisen. Daten liegen hierzu nicht vor. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sind jedoch nicht zum Verzehr bestimmt. Es ist darüber hinaus nicht zu erwarten, dass der Alkaloidgehalt der gentechnisch veränderten Knollen über dem von konventionellen unreifen oder ergrünten bzw. teilweise ergrünten Knollen liegt. Ferner liegt das Versuchsfeld auf einem umzäunten Versuchsgelände, wodurch der Zugang zu der Versuchsfläche für Menschen und größere Tiere eingeschränkt ist.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind daher im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung durch die Expression des Leghämoglobins sowie durch die damit verbundenen Veränderungen in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen nicht zu erwarten.

(b) Das *nptII*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase. Es wurde als Markergen zur Selektion transformierter Pflanzenzellen eingeführt.

Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-OH-Gruppe des Aminohexose-Rings bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika katalysiert, wodurch diese inaktiviert werden. Das Enzym zeichnet sich durch eine hohe Substratspezifität aus. Zu den Substraten der APH(3')II-Enzyme zählen die Antibiotika Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin. Die in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsamen Gentamicine und sonstigen Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme. In der Tiermedizin finden Kanamycin und Neomycin jedoch breite Anwendung.

Aufgrund der Substratspezifität der Neomycin-Phosphotransferase ist zu erwarten, dass unter Freilandbedingungen in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen bei fehlendem Substrat keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen. Da die betreffenden Antibiotika im Boden nicht in höheren Konzentrationen vorliegen, vermittelt die Neomycin-Phosphotransferase den gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland keinen Selektionsvorteil. Eine Toxizität des Enzyms für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder den Menschen liegt nicht vor.

## (c) Weitere innerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Das zur Transformation der Kartoffelpflanzen eingesetzte Plasmid ist ein Derivat des binären Vektors pART27, der vollständig sequenziert wurde.

Innerhalb der T-DNA enthält das Plasmid neben den Expressionskassetten des LegHg-Gens und des *nptII*-Gens Nukleotide des T7-Promotors, des SP6-Promotors und des *lac*-Operons bzw. *lacZ*-Gens aus *E. coli*. Diese sind in Pflanzen nicht funktional.

## (d) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border wurde jedoch berichtet.

Da keine genaue Analyse der in die Kartoffelpflanzen integrierten Sequenzen vorliegt, wird der Risikoabschätzung zugrunde gelegt, dass das gesamte Plasmid integriert worden sein kann.

Das Transformationsplasmid enthält außerhalb der Borderregionen

- den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli*, der für triparentale Paarungen benötigt wird;
- das Insertionselement IS1 aus *E. coli*;
- das *traJ*-Gen aus dem Plasmid RK2, das als Regulationsfaktor die Expression der Mobilisierungsgene für die Bakterienkonjugation beeinflusst;
- einen DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologien zum *trfA*-Gen des Plasmids RK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (kodiert für ein Membranprotein, das die Exkretion von Tetracyclinen bewirkt und Zellen so eine Resistenz gegen Antibiotika aus der Gruppe der Tetracycline verleiht);
- den ColE1-Replikationsursprung des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das Tn7-Transposon mit dem *aadA*-Gen, das Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin verleiht;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*.

Eine Bildung funktionsfähiger Genprodukte basierend auf diesen Sequenzen ist in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten, da sie nicht unter der Kontrolle pflanzenspezifischer Promotoren stehen.

(e) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Insertionsorts („Positionseffekt“). Unter Freilandbedingungen kann die Expressionsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, dass die Eigenschaften der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen wurden jedoch keine Beobachtungen gemacht, die auf ein solches Ereignis hindeuten.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, liegen jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. Das Leghämoglobin-Gen stammt aus der Fabacee *Lotus japonicus*. Leghämoglobin-Gene kommen natürlicherweise in einer Reihe von Pflanzenarten vor, darunter auch landwirtschaftliche Nutzpflanzen. Pollen von Kartoffelpflanzen wird ohnehin nur in geringem Umfang durch den Wind verbreitet und spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle.

### III.1.2.2. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Pflanzen, im Freiland zu überdauern oder sich zu etablieren

Kartoffeln befinden sich in Mitteleuropa seit mehreren hundert Jahren im landwirtschaftlichen Anbau. Auf landwirtschaftlich genutzten Flächen können in Abhängigkeit von den Temperaturen im Winter nach Kartoffelanbau im Folgejahr Durchwuchskartoffeln auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen oder Samen hervorgegangen sind. Eine Etablierung von Kartoffeln in natürlichen Ökosystemen wurde jedoch in Europa nicht beobachtet, da Kartoffeln gegenüber Wildpflanzen konkurrenzschwach und außerdem nicht frostresistent sind. Kartoffeln werden zwar gelegentlich außerhalb kultivierter Flächen angetroffen, jedoch nur auf nicht-natürlichen Standorten wie Wegrändern und anderen Ruderalflächen. Auch an solchen Standorten kommt es wegen der fehlenden Frosthärte der Kulturkartoffeln nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung.

Die Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffeln werden nach der Ernte analysiert oder zur Wiederauspflanzung im Folgejahr aufbewahrt. Überzählige Knollen sollen inaktiviert werden. Die auf dem Feld verbleibenden transgenen Pflanzenreste sollen zur Verrottung liegen bleiben. Kartoffeln sollen während der Nachkontrolle nicht angebaut werden. Durchwuchskartoffeln werden während dieser Zeit erkannt und vernichtet.

Kartoffelpflanzen der Sorte „Désirée“ können blühen und Beeren bilden. Dass unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und dass daraus Pflanzen aufwachsen, ist nicht wahrscheinlich. Sollten Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die Nachkontrolle erfasst.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen unterschieden sich nach Angaben der Antragstellerin bei Untersuchungen im Gewächshaus phänotypisch durch vergrößerte Lentizellen und einen erhöhten Stärkegehalt in den Kartoffelknollen. Unter den Bedingungen des Foliengewächshauses war der Phänotyp des oberirdischen Teils des Sprosses im Frühjahr/Sommer 2003 nicht verschieden von der Ausgangssorte. Konventionelle Kartoffelsorten mit einem erhöhten Stärkegehalt in den Knollen werden seit langem landwirtschaftlich angebaut.

Redoxregulation hat einen Einfluss auf zahlreiche Prozesse in der Pflanze. Es gibt Veröffentlichungen, in denen postuliert wird, dass Redoxregulation an der Ausprägung der Frosttoleranz im Rahmen der Frosthärtung u. a. bei frosttoleranten Wildkartoffelarten beteiligt ist. Bei Kulturkartoffeln der Art *Solanum tuberosum* ssp. *tuberosum* werden jedoch im Gegensatz zu den Wildkartoffelarten die Gene, die zum Erwerb der Frosttoleranz im Rahmen der Härtung beitragen, weniger stark exprimiert. Es ist daher bei den im Freisetzungversuch verwendeten Kulturkartoffeln weniger wahrscheinlich, dass die Beeinflussung des Redoxregulationssystems zu einer Veränderung der Frosttoleranz führt.

Weiterhin könnte eine als Folge der Expression des Leghämoglobins und der vergrößerten Lentizellen verbesserte Sauerstoffversorgung in den Knollen der gentechnisch veränderten

Kartoffelpflanzen theoretisch dazu führen, dass diese an sauerstoffarmen Standorten besser wachsen können als Pflanzen der Ausgangssorte „Désirée“.

Diese Möglichkeiten werden durch die zweijährige Anbaupause, die gemäß der Nebenbestimmung II.11. durchzuführende Nachkontrolle und durch die vorgesehenen Isolationsmaßnahmen ausreichend berücksichtigt. Während der Nachkontrolle nach Beendigung der Freisetzung sind auf den zu kontrollierenden Flächen keine Pflanzen oder nur solche Pflanzen anzubauen, welche die Nachkontrolle nicht behindern.

Auch unter Berücksichtigung dieser Faktoren ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Vergleich zu konventionellen Kulturkartoffeln veränderte pflanzensoziologische Eigenschaften aufweisen und natürliche Ökosysteme besiedeln können. Selbst wenn es zu einer Vertragung von Beeren, Samen oder Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen durch Tiere kommen würde, was unwahrscheinlich ist, wäre daher keine Etablierung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in der Umwelt zu erwarten.

### III.1.2.3. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Gene von den gentechnisch veränderten Pflanzen durch Pollen auf andere Pflanzen

Versuche zur Kreuzung von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden Solanaceen waren erfolglos. Unter Freilandbedingungen fand keine Einkreuzung von gentechnisch veränderten Kartoffeln in *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) statt. Auch nach künstlicher Pollenübertragung auf *S. nigrum* wurden keine lebensfähigen Samen erhalten. Eine Regeneration einiger Hybriden, die sich allerdings als steril erwiesen, war nur mit Hilfe artifizierender Methoden ("embryo rescue") unter Bedingungen möglich, die in der Natur nicht auftreten. Kartoffeln und *Solanum dulcamara* (Bittersüßer Nachtschatten) erwiesen sich als streng bilateral inkompatible Arten; bei Kreuzungsversuchen kam es nicht zu einer Befruchtung der Samenanlagen. Auch mit der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) ist die Kartoffel nicht kreuzbar. Die Vermehrung von Kartoffeln erfolgt in der landwirtschaftlichen Praxis vegetativ über Knollen.

Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen auf andere Kartoffelpflanzen eingegangen. Pollen von Kartoffelpflanzen können durch Insekten oder durch den Wind übertragen werden. Eine Übertragung durch den Wind geschieht jedoch nur über kurze Entfernungen. Bei Kartoffeln findet in erster Linie Selbstbefruchtung statt, eine Fremdbefruchtung bereits innerhalb eines blühenden Kartoffelfeldes ist selten. Sie geschieht am ehesten zwischen benachbarten Pflanzen.

Die oberirdischen Teile der zur Freisetzung beantragten gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen unterschieden sich unter den Bedingungen des Foliengewächshauses phänotypisch nicht von der Ausgangssorte. Es gibt keine Hinweise auf eine gegenüber der Ausgangssorte veränderte Fertilität der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen. Der in dem beantragten Versuch vorgesehene Abstand von mindestens 20 m zwischen den Freiset-

zungsflächen und der Randbegrenzung des Versuchsgeländes wird als ausreichend angesehen. Sollte es dennoch zu einer Pollenübertragung auf Kartoffelpflanzen kommen, die zur Erzeugung von Speisekartoffeln angebaut werden, so wäre auch dadurch nicht mit schädlichen Einwirkungen zu rechnen, da Pflanzgut für den landwirtschaftlichen Anbau von Kartoffeln vegetativ vermehrt wird, d. h. nicht über Samen.

Die Wahrscheinlichkeit, dass aus möglicherweise gebildeten Samen Pflanzen auflaufen würden, ist, wie weiter oben bereits ausgeführt wurde, unter den gegebenen klimatischen Bedingungen sehr gering. Solche Pflanzen würden auf landwirtschaftlich genutzten Flächen im Rahmen einer Fruchtfolge durch die üblichen feldbaulichen Maßnahmen eliminiert werden.

#### III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Pflanzen über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in den Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und ihrer Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, dass auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, dass ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde.

Soweit anzunehmen ist, dass ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Pflanzen und Bakterien tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmaterial allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmaterial, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

##### (a) Die cDNA des Leghämoglobingens aus *Lotus japonicus*

Leghämoglobingene sind natürlicherweise in wurzelknöllchenbildenden Leguminosen vorhanden. Die regulatorischen Sequenzen stammen aus *S. tuberosum* und *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen kommen damit in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen.

##### (b) Das *npII*-Gen



Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1. bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringerer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es war somit zu prüfen, ob durch einen möglichen horizontalen Gentransfer des *nptII*-Gens der therapeutische Einsatz der betreffenden Antibiotika beeinträchtigt würde.

Der Resistenzmechanismus der Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung kommt natürlicherweise bei Bodenmikroorganismen vor. APH(3')II-Enzyme wurden zudem in klinischen Isolaten von Menschen gefunden. Die weite Verbreitung von Genen, die eine Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika vermitteln, ist durch die häufige Anwendung dieser Antibiotika sowie dadurch zu erklären, dass diese Gene oft auf Plasmiden lokalisiert sind, wodurch eine effektive Übertragung durch Konjugation möglich ist. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Kartoffeln auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

(c) Nukleotide des *lacZ*-Gens aus *E. coli*

Das *lacZ*-Gen stammt aus *E. coli* und ist daher in der Umwelt weit verbreitet. Von der Anwesenheit von Teilen des *lacZ*-Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen ist daher kein Gefährdungspotential zu erwarten.

(d) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln können folgende genetische Elemente enthalten, die auf dem verwendeten Transformationsplasmid außerhalb der Borderregionen liegen:

- den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli*, der für triparentale Paarungen benötigt wird;
- das Insertionselement IS1 aus *E. coli*;
- das *traJ*-Gen aus dem Plasmid RK2, das als Regulationsfaktor die Expression der Mobilisierungsgene für die Bakterienkonjugation beeinflusst;
- einen DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologien zum *trfA*-Gen des Plasmids RK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (kodiert für ein Membranprotein, das die Exkretion von Tetracyclinen bewirkt und Zellen so eine Resistenz gegen Antibiotika aus der Gruppe der Tetracycline verleiht);
- den *ColE1*-Replikationsursprung des Plasmids RK2 aus *E. coli*;

- das Tn7-Transposon mit dem *aadA*-Gen, das Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin verleiht;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*.

Das *tetA*-Gen aus dem Transposon Tn10 kodiert für ein Membranprotein, welches Antibiotika der Tetracyclin-Gruppe aus der Zelle ausschleust und so die Zelle resistent gegen Tetracycline macht. Tetracycline sind durch ein breites Wirkungsspektrum ausgezeichnet und sind in der Humanmedizin therapeutisch weiterhin von Bedeutung; sie werden u.a. gegen *Brucella*, *Chlamydia*, *Mycoplasma*, *Rickettsia* und *Vibrio* eingesetzt.

Das *aadA*(Strep/SpecR)-Gen stammt aus dem Plasmid R538-1 von *E. coli* und kodiert für eine Streptomycin-Adenyltransferase. Das *aadA*-Gen liegt wie das *tetA*-Gen auf dem Transformationsplasmid außerhalb der T-DNA, seine Übertragung in die gentechnisch veränderten Pflanzen wurde jedoch nicht ausgeschlossen. Streptomycin und Spectinomycin werden nur begrenzt in der Humanmedizin eingesetzt, besitzen aber durchaus noch für die Behandlung der Tuberkulose (Streptomycin) oder der Gonorrhoe (Spectinomycin) nennenswerte humanmedizinische Bedeutung. Bakterien mit einer Resistenz gegenüber Streptomycin sind in der Umwelt verbreitet. Eine Resistenz gegenüber diesen Antibiotika kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten.

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen sollen nur auf einer begrenzten Fläche für einen begrenzten Zeitraum freigesetzt werden. Eine Verwendung der Pflanzen als Tierfutter oder für die menschliche Ernährung ist ausgeschlossen. Aufgrund der sehr geringen Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen und der Abwesenheit eines Selektionsdrucks auf den Freisetzungsf lächen ist nicht davon auszugehen, dass die Präsenz der Gene *tetA* und *aadA* in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen wird.

Das Insertionselement IS1 tritt natürlicherweise bei verschiedenen Arten der Enterobacteriaceae auf. Es wurde beispielsweise bei Arten der Gattungen *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Serratia* und *Salmonella* gefunden. Die Kopienzahl pro Bakteriengenom kann bei IS1 mehr als 40 Kopien betragen. Kopien von IS1 können sowohl chromosomal als auch plasmidal lokalisiert sein und wurden auch in Prophagen nachgewiesen. Es ist anzunehmen, dass eine Ausbreitung dieses Insertionselements über horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien leicht möglich ist. Im Vergleich hierzu ist eine theoretisch denkbare Ausbreitung über einen horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen extrem gering.

RK2 gehört zu einer Gruppe von broad host range-Plasmiden (u. a. RP1, RP4, R18, R68), die in einer Vielzahl gram-negativer Bakterien replizierbar sind. Für die aus RK2 stammenden DNA-Abschnitte ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung

zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

#### III.1.2.5. Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen eingesetzte Agrobakterien

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden sterile Kartoffelblätter mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen des binären Vektorplasmids enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt.

Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorinduktion befähigt. In dem unwahrscheinlichen, aber theoretisch denkbaren Fall der Übertragung der eingeführten Fremdgene durch solche Agrobakterien in eine Zelle einer anderen Pflanze müsste diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen würden. Nur auf diese Weise könnten diese Gene an die Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Unter der Annahme, dass ein Vorhandensein geringer Mengen rekombinanter Agrobakterien in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht auszuschließen ist, ist ferner eine mögliche Übertragung der in den Agrobakterien enthaltenen binären Plasmide durch Konjugation auf in der Umwelt vorkommende Wildtyp-Agrobakterien (*A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes*) in Betracht zu ziehen, die dann wiederum möglicherweise die Fremdgene auf einzelne Zellen anderer Pflanzen übertragen könnten.

Im Fall einer Infektion und nachfolgenden Transformation durch Wildtyp-*A. tumefaciens* bzw. *A. rhizogenes* entsteht aus der transformierten Pflanzenzelle ein Tumor ("Wurzelhalsgalle" bzw. "hairy roots"). Die Bildung einer Pflanze aus einem solchen Tumor ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu erwarten.

Zu berücksichtigen ist weiterhin eine Übertragung der eingeführten Gene aus Agrobakterien in andere Bodenbakterien. Auf die möglichen Auswirkungen wurde bereits unter III.1.2.4. eingegangen.