



Antrag 6786-01-0048

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten
Espen (*Populus tremula L.* und *P. tremula L. x P. tremuloides Michx.*),**

verschiedene unabhängige Linien,

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,

Berlin, den 28. Mai 1996

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) Das *roIC*-Gen

Das *roIC*-Gen ist eines von 4 *roI*-Genen ("root locus") auf dem Ri-Plasmid von *Agrobacterium rhizogenes*, die nach natürlichem Gentransfer die "hairy root"-Krankheit bei dikotylen Pflanzen hervorrufen. Unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors verursacht es in den transgenen Pflanzen eine Wuchsminderung und die Ausbildung von kleinen, hellgrünen Blättern, die Expression des *roIC*-Gens ist in den Blättern und Internodien gleich stark. Dagegen zeigen Bäume, bei denen das *roIC*-Gen unter der Kontrolle des lichtinduzierbaren *rbcS*-Promotors steht, ausschließlich eine hellere Färbung der Blätter. Die *roIC*-mRNA kann nur in Blättern und nicht in Internodien nachgewiesen werden. Genprodukt des *roIC*-Gens ist eine Cytokinin- β -Glucosidase (22 kD), die über die Freisetzung von Cytokinin aus inaktiven Konjugaten die Zellteilung und über die Veränderung der Hormonbalance (z.B. mit Abscisinsäure) eine Reihe von Entwicklungsprozessen beeinflussen kann.

Als Folge der gentechnischen Veränderung können die transgenen Espen von nicht gentechnisch veränderten Bäumen optisch unterschieden werden. Die gentechnische Veränderung hat daher eine "Marker"-Funktion. Die Auswirkungen einer verschiedenartigen Expression des *roIC*-Gens können über den Zeitraum des Freisetzungsvorganges verfolgt werden.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen werden nach Versuchsende mechanisch zerstört und verbrannt. Sie sind nicht zum Verzehr oder zur Verfütterung vorgesehen. Selbst bei einem unbeabsichtigten Verzehr durch Tiere oder Menschen wären keine schädlichen Einwirkungen auf deren Gesundheit 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. Das in der Humanmedizin therapeutisch bedeutsame Gentamicin und sonstige 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 Espen 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 kei-

nen Selektionsvorteil. Eine Toxizität des Enzyms für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder den Menschen liegt nicht vor.

(c) Weitere möglicherweise übertragene DNA-Abschnitte

Die gentechnisch veränderten Espen wurden durch Transformation mit Derivaten des binären Vektors pPCV002 erzeugt.

Bei diesem Vektor befindet sich die „multiple cloning site“ innerhalb der für die bakterielle Replikation und Selektion notwendigen DNA-Sequenz aus dem Plasmid pBR322. Diese Sequenz enthält das ColE1-Replikon und das Gen für die β -Lactamase (Ampicillinresistenz), das unter der Kontrolle des bakteriellen Promotors steht. Eine Expression des β -Lactamase-Gens ist in den Pflanzen nicht zu erwarten.

Der Vektor pPCV002 und seine Derivate enthalten innerhalb der T-DNA noch den Gen5-Promotor aus der T_L-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*. Es handelt sich hierbei um den ersten bakteriellen Promotor, von dem gezeigt werden konnte, daß er in Pflanzen gewebespezifisch exprimiert und durch Pflanzenhormone reguliert wird. Er ist allerdings in den vorliegenden Konstrukten entgegen der Leserichtung des β -Lactamase-Gens orientiert, weshalb eine Expression der bakteriellen Sequenz nicht zu erwarten ist.

(d) Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten ins Genom integriert folgende Regulationssequenzen:

- den lichtinduzierbaren Promotor der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase (*rbcS*) aus *Solanum tuberosum*,
- den 35S-Promotor und -terminator des Cauliflower Mosaic Virus (CaMV),
- den Promotor des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die Terminatorregion des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regulieren die Expression der Gene *rolC* und *nptII* in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) bis (b).

(e) Außerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Von einer Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch im Einzelfall berichtet. Der Vektor pPCV002 enthält außerhalb der T-DNA den ori und Teile des Transfersystems aus dem Plasmid RK2, die eine Replikation und Mobilisierung des Vektors in gramnegativen Bakterien ermöglichen. Für einen Transfer des Vektors in das Pflanzengenom sind *tra*- und *vir*-Funktionen eines Helferplasmides (z. B. pMP90RK) erforderlich. Weitere DNA-Sequenzen, die zu Genprodukten in den Pflanzen führen könnten, sind außerhalb der T-DNA in dem Vektor pPCV002 nicht vorhanden.

(f) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke auch 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 Espenpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter 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 pflanzeneigener 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 im Gewächshaus und im Freiland wurden 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 Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit diesen gentechnisch veränderten Pflanzen sowie anderer Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, aus In- und Ausland keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Pollen von Espen werden in diesem Versuch nicht entstehen, da Antragsteller und Nebenbestimmungen Maßnahmen vorsehen, dies zu verhindern.

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

In Vorversuchen mit transgenen Kartoffeln und Tabakpflanzen, die das *rolC* Gen aus *A. rhizogenes* exprimierten, zeigte sich eine erhöhte Anfälligkeit für bestimmte pilzliche Pathogene bzw. Die Pflanzen waren männlich steril. Da die gentechnisch veränderten Espen im Gewächshaus im Wachstum reduziert sind, ist damit zu rechnen, daß die Pflanzen dies auch im Freisetzungsvorversuch zeigen werden. Hinweise auf eine erhöhte Viabilität und Fertilität, die eine Überdauerung oder Verwilderung der gentechnisch veränderten Pflanzen begünstigen würden, gibt es nicht.

Es ist vorgesehen, die gentechnisch veränderten Espen nach Versuchsende zu verbrennen. Die Genehmigungsbehörde geht davon aus, daß dies umweltgerecht erfolgen wird. Eventuell übrig bleibendes Material, das zum Wiederaustreiben befähigt ist, soll durch Herbizideinsatz inaktiviert werden. Während zweier Jahre nach Versuchsende soll das Feld kontrolliert und mit Herbizid behandelt werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Beendigung des Versuchs möglicherweise im Boden verbliebene Wurzelteile ist nach den systematischen Erfahrungen des Antragstellers sehr gering. Demzufolge ist die Möglichkeit, daß sich auf diesem Wege Pflanzen etablieren, vernachlässigbar.

Aus den genannten Gründen ist daher weder eine Etablierung noch eine unkontrollierte Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen zu erwarten.

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

Pollen von *Populus*-Arten werden durch den Wind verbreitet. Auskreuzungen auf Pflanzen außerhalb der Freisetzungsfäche könnten nicht ausgeschlossen werden, wenn die Pflanzen aus dem Versuch zum Blühen kämen. Der Antragsteller sieht die rechtzeitige Beendigung des Experiments vor Erreichen der generativen Phase der Pflanzen vor und beabsichtigt die Kontrolle auf Bildung von Blütenknospen, um jeglichen sexuellen Austausch mit Pflanzen der Umgebung zu verhindern.

Es ist vorgesehen, Bäume, bei denen vorzeitiges Blühen beobachtet wird, zu entfernen. Es ist weiterhin vorgesehen, das Experiment abzubrechen, wenn die generative Phase bei 5% der Bäume eintreten sollte. Daher wird die Wahrscheinlichkeit einer Auskreuzung der Transgene als verschwindend gering erachtet.

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 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 allerdings folgern, daß auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann.

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 Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmateriale, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

Das Gen für die Markierung stammt aus *Agrobacterium rhizogenes* und kommt in der Umwelt häufig vor. Es könnte also auch - mit weit höherer Wahrscheinlichkeit - durch bakteriellen Gentransfer in andere Mikroorganismen gelangen.

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1.(b) 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, die eine effektive Übertragung der Gene durch Konjugation ermöglichen. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Espen auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Die gentechnisch veränderten Espen enthalten als rekombinante DNA-Sequenz eine Ampicillinresistenz und den Replikationsursprung des Plasmides ColE1. Da diese Sequenzen in Enterobacteriaceen weit verbreitet sind, ist die Wahrscheinlichkeit einer Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen.

Auch bei einer Übertragung der sonstigen in den Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *Agrobacterium tumefaciens* und CaMV.

Agrobacterium tumefaciens ist in Böden weit verbreitet, und die genannten Sequenzen befinden sich in Wildtyp-Agrobakterien auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation ausgetauscht werden können. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist also zu erwarten, daß eine Übertragung der entsprechenden Sequenzen aus *Agrobacterium* weitaus wahrscheinlicher ist, als eine Übertragung aus den gentechnisch veränderten Pflanzen.

Die theoretische Möglichkeit eines Transfers der CaMV-Sequenzen aus den gentechnisch veränderten Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil CaMV als doppelsträngiges pflanzeninfizierendes DNA-Virus ohnehin in Pflanzen anzutreffen ist.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden Espenblätter mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen eines binären Vektorplasmids enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Um nachzuweisen, daß das Vermeh-

rungsmaterial der freizusetzenden Pflanzen frei von Agrobakterien ist, wurden Gewebemogenate auf geeigneten Kulturmedien ausgestrichen. Dabei wurden keine Agrobakterien festgestellt.

Es ist nicht ausgeschlossen, daß die freizusetzenden Pflanzen sehr geringe Mengen der zur Transformation eingesetzten Agrobakterien enthalten könnten. Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *Agrobacterium 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 Agrobakterien, die aus den freigesetzten gentechnisch veränderten Espenpflanzen stammen, in eine Zelle einer anderen Pflanze, müßte diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen und so an die Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden können. 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 Vektorplasmide durch Konjugation auf in der Umwelt vorkommende Wildtyp-Agrobakterien (*Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium 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-Stämme von *Agrobacterium tumefaciens* bzw. *Agrobacterium 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.