



**Antrag 6786-01-0159**

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffeln**

**(*Solanum tuberosum*; Désirée) B33-Apy1-RNAi 1331 #3, #10, #25**

**im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,**

**durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde**

**Berlin, den 01. April 2005**

**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 AtSDD1-Überexpressions-Konstrukt sowie das StSDD1-RNAi-Konstrukt

Gegenstand der beantragten Freisetzung ist die physiologische Charakterisierung der Wasserausnutzung von Kartoffelpflanzen mit veränderter Stomatadichte unter Freilandbedingungen.

Stomata (Spaltöffnungen) gewährleisten die Aufrechterhaltung des Transpirationsstroms, in dem Wasser und Nährstoffe durch die Pflanze transportiert werden, sowie den Gasaustausch (Kohlendioxid, Sauerstoff und Wasserdampf) der innerhalb der Pflanzenorgane liegenden Zellen mit der Atmosphäre. Der Gasaustausch ist wesentlich für die in Mesophyllzellen lokalisierte Photosynthese und damit wachstumsbestimmend. Unter optimalen Bedingungen ist die Öffnungsweite der Stomata so reguliert, dass ein möglichst hoher Gasaustausch ermöglicht wird, ohne dass ein zu hoher Wasserverlust durch den Transpirationsstrom entsteht. Unter unzureichender Wasserversorgung kann die Verringerung der Stomataöffnungsweite zwar den Wasserverlust minimieren, gleichzeitig aber auch den Gasaustausch und damit die Kohlenstofffixierung limitieren.

Für *Arabidopsis thaliana* liegt eine Mutante (*sdd1-1*) vor, bei der die Schließzellendichte der Blätter auf das Dreifache erhöht ist, wobei vielfach Schließzellenpaare direkt an andere Schließzellenpaare grenzen, was beim Wildtyp sehr selten vorkommt. Diese *Arabidopsis*-Mutante ermöglichte die Identifizierung des Wildtyp-Gens *sdd1* (stomatal density and distribution). Sein Genprodukt (SDD1) ist eine Subtilisin-ähnliche Serinprotease, die offenbar als ein negativer Regulator der Schließzellenentstehung fungiert. Die Überexpression von SDD1 in transgenen *Arabidopsis thaliana* führt zu einer Erniedrigung der Schließzellendichte auf ca. 40% des Wildtyps. Um die Konsequenzen einer veränderten Stomatadichte auf Wachstum, Photosynthese und Ertrag zu untersuchen, wurden gentechnisch veränderte Kartoffelpflanzen erzeugt, bei denen die Spaltöffnungsichte verringert bzw. erhöht wurde.

Zur Verringerung der Schließzellendichte wurde ein Konstrukt übertragen (pBinARHyg-AtSDD1), das in den Kartoffelpflanzen zu einer Überexpression des Wildtyp-SDD1-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* führt. Die Spaltöffnungsichte der transgenen Kartoffellinien ist gegenüber der nicht transformierten Ausgangssorte auf ca. 65% reduziert. In Gewächshausversuchen in den Jahren 2002 und 2003 wiesen die Pflanzen einen auf 50% reduzierten Knollenertrag auf. Der Sprossphänotyp der Pflanzen war bei niedrigen Lichtintensitäten nicht verschieden von dem der Ausgangssorte. Bei höheren Lichtintensitäten zeigten die Pflanzen ein starkes Blattaufrollen.

Um die Schließzellendichte zu erhöhen, wurde in anderen Kartoffelpflanzen mit Hilfe eines RNAi-Konstrukts (pBinAR-StSDD1) die Expression des kartoffeleigenen SDD1-Proteins reduziert. Durch das RNAi-Konstrukt wird die RNA eines Teils des SDD1-Gens so in Sense- und Antisense-Orientierung transkribiert, dass Sense- und Antisense-RNA durch eine hinreichend lange Zwischensequenz getrennt sind. Der Sense- und der Antisense-Anteil der RNAi bilden einen Doppelstrang, dessen Einzelstränge durch eine Haarnadelschleife verbunden sind. Der RNA-Doppelstrang wird in der Pflanzenzelle von spezifischen Enzymen erkannt und in kleine Fragmente zerlegt. Diese RNA-Fragmente binden an die mRNA des betreffenden Gens (SDD1-Gen) und vermitteln den Abbau dieser mRNA durch die gleichen Enzyme. Für die Freisetzung wurden vier Linien ausgewählt, bei denen mittels Western Blot eine Verringerung der SDD1-Proteinmenge gegenüber der Ausgangssorte gezeigt wurde. Unter Gewächshausbedingungen haben diese Pflanzen eine auf 115% erhöhte Spaltöffnungsichte. Im Jahr 2002 unterschied sich der Knollenertrag dieser Pflanzen im Gewächshaus nicht von dem der Ausgangssorte. Demgegenüber lag er im besonders heißen Sommer 2003 signifi-

kant um 15 bis 22% über dem Ertrag der Kontrollpflanzen. Unter hohen Lichtintensitäten zeigten die transgenen Pflanzen ein geringeres Blattaufrollen als die nicht transformierte Ausgangssorte.

Eine Veränderung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in Bezug auf mögliche toxische oder gesundheitsschädliche Inhaltsstoffe aufgrund unbeabsichtigter Auswirkungen der gentechnischen Veränderung auf den pflanzlichen Stoffwechsel ist möglich. Diesbezügliche Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sollen jedoch in dem beantragten Freisetzungsvorhaben nicht zur Herstellung von Lebensmitteln oder Futtermitteln verwendet werden und die Freisetzung findet auf einem abgegrenzten und gekennzeichneten Versuchsgelände statt, so dass im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung keine Risiken für die Gesundheit von Tieren oder Menschen als Folge der Freisetzung zu erwarten sind.

(b) Das *hph*-Gen

Die mit dem Konstrukt pBinARHyg-AtSDD1 transformierten Pflanzen enthalten als Selektionsmarker ein *hph*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*. Die von dem *hph*-Gen kodierte Hygromycin-Phosphotransferase inaktiviert durch Phosphorylierung spezifisch das Antibiotikum Hygromycin. Diese Substratspezifität begründet die Erwartung, dass bei fehlendem Substrat in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter Freilandbedingungen keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen können. Überdies bietet dieses Gen den gentechnisch veränderten Pflanzen unter Freilandbedingungen keinen Selektionsvorteil, da Hygromycin im Boden nicht in höheren Konzentrationen vorliegt.

(c) 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.

(d) Weitere innerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Die zur Transformation der Kartoffelpflanzen verwendeten Plasmide enthalten innerhalb der T-DNA neben den bereits beschriebenen Konstrukten Nukleotide des *lacI*- und des *lacZ*-Gens aus *E. coli*, des Replikationsursprungs und des Gens III des *E. coli*-Phagen M13, sowie Nukleotide des Tn5-Transposons aus *E. coli*. Diese sind in Pflanzen nicht funktional.

## (e) 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. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch berichtet.

Die Transformationsplasmide pBinARHyg-AtSDD1 und pBinAR-StSDD1 sind Derivate des binären Vektors pBin19 und enthalten außerhalb der Borderregionen die folgende genetischen Elemente:

- das *aphAIII* (= *nptIII*)-Gen aus *Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus faecalis*), unterbrochen durch das Transposon *IS1*, jedoch funktionsfähig in prokaryoten Systemen;
- eine Sequenz mit homologen Teilsequenzen des *tetA*-Gens des Plasmids pRK2, unterbrochen durch die T-DNA;
- das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E.coli* und in *A. tumefaciens*;
- ein Fragment des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- ein *traF*-Fragment, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4, aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pUC (ColE1 *ori*) aus *E. coli*.

Eine von der Antragstellerin durchgeführte PCR-Analyse ergab, dass das *nptIII*-Gen in keiner der zur Freisetzung beantragten Transformanten enthalten ist.

Für die übrigen, außerhalb der Borderregionen liegenden Sequenzen wurde kein Nachweis ihrer An- bzw. Abwesenheit in den gentechnisch veränderten Pflanzen durchgeführt. Der Risikoabschätzung wird daher zugrunde gelegt, dass sie in den Pflanzen enthalten sein können.

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

## (f) 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 *hph*-Gen oder das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, liegen jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. 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 Versuchspflanzen werden geerntet, bonitiert, gewogen und für weitere Untersuchungen oder als Rückstellproben in eine gentechnische Anlage gebracht. Nicht benötigte Kartoffelknollen werden durch Dämpfen inaktiviert. Das Kartoffelkraut bleibt zur Verrottung auf der Versuchsfläche liegen.

Nach der Ernte ist vorgesehen, die Versuchsfläche flach zu eggen, um eventuell auf der Fläche verbliebene Knollen zu Tage zu fördern und die Fläche einzuebnen. Die Fruchtfolge auf der Versuchsfläche wird so gestaltet, dass nach der Freisetzung gentechnisch veränderter Kartoffeln auf einer Fläche für mindestens zwei Vegetationsperioden keine Kartoffeln angebaut werden. In dem auf die Freisetzung folgenden Jahr wird die Fläche auf Durchwuchskartoffeln kontrolliert. Die Kontrolle erfolgt so lange, bis auf der Fläche, auf der gentechnisch veränderte Kartoffeln angebaut wurden, für eine Vegetationsperiode keine Kartoffelpflanzen mehr festgestellt werden. Danach wird auf der Fläche mindestens eine weitere Vegetationsperiode lang kein Kartoffelanbau vorgenommen.

Kartoffelpflanzen 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.

Unter Gewächshausbedingungen reagierten die pBinAR-Hyg-AtSDD1-Pflanzen aufgrund der verringerten Spaltöffnungsichte empfindlicher auf hohe Lichtintensitäten. Es ist darüber hinaus denkbar, dass die Verringerung der Anzahl der Spaltöffnungen bei diesen Pflanzen zu einer geringeren Anfälligkeit gegenüber Infektionen mit phytopathogenen Pilzen führt, die durch die Spaltöffnungen in die Blätter eindringen. Wegen der fehlenden Frosthärte von Kartoffelknollen wäre daraus jedoch kein Risiko abzuleiten.

Der erhöhte Knollenertrag der pBinAR-StSDD1-Pflanzen könnte sich aufgrund erhöhter Knollen- oder Augenzahl im Vergleich zur untransformierten Ausgangssorte in einem erhöhten Nachauflauf nach frostarmen Wintern auswirken. Auch unter Berücksichtigung dieser Faktoren ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Vergleich zu konventionellen Kulturkartoffeln veränderte pflanzenökologische 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. Im Rahmen der Freisetzung wird die Möglichkeit eines erhöhten Nachauflaufs aus Knollen durch die vorgesehenen Nachkontrollmaßnahmen ausreichend kontrolliert.

#### 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 artifizieller 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.

Der in dem beantragten Versuch vorgesehene Abstand von mindestens 20 m zu benachbarten Kartoffelanpflanzungen 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 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.

(a) Das AtSDD1-Überexpressions-Konstrukt sowie das StSDD1-RNAi-Konstrukt

Die in dem Konstrukt vorhandenen Sequenzen der SDD1-Gene stammen aus *Arabidopsis thaliana* bzw. aus der Kartoffel, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen. Es ist auch nicht zu erwarten, dass das AtSDD1-Überexpressions-Konstrukt oder das RNAi-Konstrukt im Fall eines horizontalen Gentransfers in Mikroorganismen in diesen eine Funktion hätte.

(b) Das *hph*-Gen und das *nptII*-Gen

Das *hph*-Gen, das das Enzym Hygromycin-Phosphotransferase kodiert, wurde aus *E. coli* isoliert. Hygromycin wird wegen seiner hohen Toxizität für eukaryote Organismen in der Humanmedizin nicht und in der Tiermedizin nur für spezielle Anwendungsgebiete eingesetzt. Hygromycin-resistente Enterobacteriaceen, die ein Gen für eine Hygromycin-Phosphotransferase enthalten, wurden in Probenmaterial (Faeces, Urin, Blut) tierischen und menschlichen Ursprungs gefunden und werden von diesen Tieren bzw. Menschen in die Umwelt abgegeben.

Das *nptII*-Gen befindet sich in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter der Kontrolle des *nos*-Promotors. Das Gen kodiert das Enzym Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase II (APH(3')II), das die ATP-abhängige Phosphorylierung bestimmter Aminoglycosid-Antibiotika (Kanamycin, Neomycin, Geneticin) katalysiert, wodurch diese inaktiviert werden.

Die durch die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase II inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1. (c) 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.

Das „GMO-Panel“ der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat die Gene *hph* und *nptII* in die Gruppe derjenigen Gene eingeordnet, für die bezüglich der Sicherheit kein Grund besteht, ihre Verwendung zu verbieten oder einzuschränken, und zwar weder für Feldversuche noch zum Zweck des Inverkehrbringens. Von der ZKBS wurden das *hph*-Gen und das *nptII*-Gen in ihrer Stellungnahme vom 6.7.1999 zur biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen in die Gruppe der Antibiotika-Resistenzgene eingeordnet, „die (a) in Boden- und Enterobakterien bereits weit verbreitet sind und (b) deren relevante Antibiotika keine oder nur geringe therapeutische Bedeutung in der Human- bzw. Veterinärmedizin besitzen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass - wenn überhaupt - das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom transgener Pflanzen keine Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hat“.

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

Die Gene *lacI* und *lacZ* stammen aus *E. coli* und sind daher in der Umwelt weit verbreitet. Von der Anwesenheit von Teilen dieser Gene in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen ist daher kein Gefährdungspotential zu erwarten.

(d) M13-Sequenzen

pBin19 und Derivate enthalten innerhalb der T-DNA zwei Abschnitte aus M13mp19, nämlich einen 440 bp großen Abschnitt, der einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfaßt sowie einen 433 bp großen Abschnitt, der den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält. Der Phage M13 zählt zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen. Für diese Nukleinsäureabschnitte 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. Sollte es zu einer Expression des Genabschnitts für das Strukturprotein kommen, so würde dies nicht zu einem funktionsfähigen Protein führen, da der Abschnitt nur für 167 von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Mit einer Funktionsfähigkeit dieses Teils des Strukturproteins in Bakterien ist nicht zu rechnen

(e) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

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

- eine Sequenz mit homologen Teilsequenzen des *tetA*-Gens des Plasmids pRK2, unterbrochen durch die T-DNA;
- das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- ein Fragment des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- ein *traF*-Fragment, enthaltend den *oriT* des Plasmids RP4, aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pUC (*ColE1 ori*) aus *E. coli*.

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. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unterbrochen bzw. unvollständig (*klaC*, *tetA*).

Das pUC-Replikon gehört zum Typ der ColE1-Plasmide, die einen auf einige gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich haben. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und

nahe verwandten Bakterienspezies, wie z.B. *Serratia* oder *Salmonella*, replizieren. In den meisten gram-negativen Bodenbakterien erfolgt keine Replikation. In Enterobakterien treten ColE1-Plasmide recht häufig auf. Ein Gentransfer ausgehend von Enterobakterien auf andere Bakterien ist als weitaus wahrscheinlicher anzusehen als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien. Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass die eventuelle Präsenz des Replikationsursprungs von pUC im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.