



Antrag 6786-01-0176

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten

Kartoffeln (*Solanum tuberosum* L.; Désirée, Albatros)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 14. Juni 2006

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 vp60-Konstrukt

Das virale Kapsidprotein VP60 ist ein Strukturprotein des RHD-Virus (Rabbit Haemorrhagic Disease Virus). Dieses Virus befällt ausschließlich adulte Kaninchen und eine Infektion führt bei diesen innerhalb von 48 Stunden zum Tode. Das Virus gehört zu der Gruppe der Caliciviridae. Immunantworten nach Infektion bei Mensch und anderen Tieren sind beobachtet worden, Krankheitssymptome sind jedoch nicht bekannt. Das VP60-Protein alleine ist bei Kaninchen nicht krankheitsauslösend. Die Bekämpfung des Virus in Hauskaninchenbeständen erfolgt über Schlachtung und Impfungen. Die hierbei eingesetzten Impfstoffe enthalten inaktiviertes Virus und somit auch VP60-Protein. Die Impfstoffe sind nach den vorliegenden Literaturangaben gut verträglich und werden sogar bei trächtigen Tieren eingesetzt.

Um die Expression des VP60-Genes in Kartoffeln zu ermöglichen, wurde in Kartoffelpflanzen der Varietät Désirée über einen *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer ein technisch synthetisiertes Gen eingebracht, welches die Sequenzinformation des *vp60*-Genes des RHDV-Virusisolates R-592 unter Ausnutzung der Tabakcodonpräferenz beinhaltet. An die *vp60* Sequenz wurde ein DNA-Abschnitt kodierend für die Aminosäuren SEKDEL angefügt, welche die Rückführung des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum beim sekretorischen Proteinbildungsweg bewirken. Damit soll die Stabilisierung des Proteins erreicht werden. Die Expression wird in der Pflanze durch den 35S Promotor und Terminator aus dem Blumenkohlmosaik-Virus reguliert, was zu einer Expression in allen Pflanzenteilen im gesamten Lebenszyklus der Kartoffel führt. Der Nachweis der Expression von VP60-Protein wurde über ELISA bzw. Western-blot-Technik mittels eines VP60-spezifischen Antikörpers geführt.

Erfahrungen aus Impfungen mit VP60-Protein aus heterologen Expressionssystemen liegen vor, subkutane und orale Immunisierungsexperimente mit VP60, welches aus gentechnisch veränderten Kartoffeln gewonnen wurde, sind ebenfalls publiziert. Bei letzteren gelang es bisher nicht, durch Verfütterung von Pflanzenfrischmasse eine Immunisierung von Kaninchen zu bewirken. Eine Immunantwort konnte stets nur bei der Verabreichung von Pflanzenextrakten oder mit Proteinextrakten aus anderen Expressionssystemen erzielt werden. Die hier zur Freisetzung beantragten gentechnisch veränderten Kartoffeln wurden in Fütterungsexperimenten an der FBN Dummerstorf und dem Friederich-Löffler-Institut an Ratten und Kaninchen getestet. Eine Verfütterung von Knollenfrischmasse an Kaninchen führte auch hier nicht zur Immunisierung, Fütterungsstudien an Ratten hatten keinerlei Veränderungen bei histologischen, biochemischen und hämatologischen Parametern zur Folge. Vor diesem Hintergrund ist von einer Schädigung oder einer Immunisierung bei Wildfraß nicht auszugehen.

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sollen in dem beantragten Freisetzungsvorhaben nicht zur Herstellung von Lebensmitteln oder Futtermitteln außerhalb der angezeigten Laboruntersuchungen 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 *ctxB*-Konstrukt

Das Cholera-Toxin gehört zu der Familie der AB-Toxine. Die Funktion der ungiftigen B-Untereinheit ist es dabei, zu einem ringförmigen, homologen Pentamer zu assoziieren und an Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche von intestinalen Epithelzellen (GM1-Gangliosiden) zu binden.

Die krankheitserregende Wirkung geht von der A-Untereinheit aus. Diese wird in zwei Domänen gespalten, einer Ankerdomäne A2 und einer toxischen Domäne A1. Die Ankerdomäne bindet die toxische A1-Domäne an die B-Untereinheit. Über weitere Aktivierungsschritte verursacht dann die A1-Domäne letztendlich eine massive Sekretion von Chloridionen in das Darmlumen, die Ursache der Durchfallerkrankung. Nur die A1-Untereinheit ist daher toxisch, die B-Untereinheit nicht.

Zur Expression der ungiftigen B-Untereinheit wurde über *Agrobacterium tumefaciens* vermittelten Gentransfer ein Konstrukt in Kartoffeln der Varietät Albatros überführt, welches ein synthetisches Gen enthält, das zu 71% mit der Gensequenz des *ctxB*-Genes aus *Vibrio cholerae* kodierend für die nicht toxische Untereinheit des Cholera Toxin übereinstimmt. Das Gen wurde an die Codonpräferenz höherer Pflanzen angepasst. An die *ctxB*-Sequenz wurde ein DNA-Abschnitt kodierend für die Aminosäuren SEKDEL angefügt, welche die Rückführung des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum beim sekretorischen Proteinbildungsweg bewirken. Damit soll die Stabilisierung des Proteins erreicht werden. Die Expression wird in der Pflanze durch den 35S Promotor und Terminator aus dem Blumenkohlmosaik-Virus reguliert, was zu einer Expression in allen Pflanzenteilen im gesamten Lebenszyklus der Kartoffel führt. Der Nachweis der Expression von CtxB-Protein wurde über ELISA - Technik geführt.

Die ungiftige B-Untereinheit des Cholera-Toxines wird als Bestandteil von Impfstoffen gegen die Cholera und andere Durchfallerkrankungen seit mehr als 20 Jahren am Menschen angewendet. Dabei werden subkutane und orale Applikationen durchgeführt. Eine Expression dieses Proteins in Kartoffeln wurde ebenfalls bereits durchgeführt zur Beantwortung der Fragestellung, ob eine orale Verabreichung über Nahrungsmittel zu einer Immunantwort führt. Dieses war nach Verfütterung der Kartoffeln an Mäusen der Fall. Weiterhin liegen Erfahrungen aus einer Verzehrstudie an Probanden vor, die gentechnisch veränderte Kartoffeln mit einem dem CtxB-Protein sehr ähnlichen Protein zu sich nahmen. Aus diesen Studien sind keine Effekte bekannt geworden, die zu schädlichen Nebenwirkungen geführt haben.

Vor diesem Hintergrund ist mit einem Entstehen schädlicher Stoffwechselprodukte nicht zu rechnen. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sollen in dem beantragten Freisetzungsvorhaben nicht zur Herstellung von Lebensmitteln oder Futtermitteln außerhalb der angezeigten Laboruntersuchungen verwendet werden und die Freisetzung findet auf einem abgegrenzten und gekennzeichneten Versuchsgelände statt, so dass Risiken für die menschliche Gesundheit und die Umwelt nicht zu erwarten sind.

(c) Das *psbY-cyeI*-Konstrukt

Das eingebrachte Gen *cyeI* kodiert für eine Cyanophycin Synthetase aus dem Cyanobakterium (Blualge) *Thermosynechococcus elongatus*. Das Enzym katalysiert die Bildung des Polymers Cyanophycin, das aus einem Aspartat-Rückgrat sowie Arginin-Seitenketten besteht. Dieses nicht-ribosomale Protein dient dem Bakterium vermutlich als Speicherprotein. Eine Vielzahl von Cyanobakterien verfügen über die Möglichkeit, Cyanophycin zu synthetisieren. Cyanobakterien sind in der Umwelt ubiquitär auf belichteten Oberflächen vorhanden, ein Eintrag von Cyanophycin in die Umwelt aus absterbenden Blualgen ist also ständig gegeben. Cyanophycin wird durch Cyanobakterium eigene und Enzyme anderer bodenbürtiger Bakterien, z.B. Streptomyceten, abgebaut.

In die gentechnisch veränderten Kartoffeln wurde ein Konstrukt mit einem Cyanophycin-Synthetasegen eingebracht, das an seinem 5'-Ende eine zusätzliche Sequenz kodierend für ein Transitpeptid für den Import in Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* enthält.

Durch die Anknüpfung des Strukturgenes an die regulatorischen 35S-Promotor- und Terminatorsequenzen wird eine Expression in allen Geweben und zu allen Entwicklungsstadien der Kartoffel erreicht, wobei die Synthetase im Blatt als auch in der Knolle in verschiedene Plastiden verbracht wird. Der Nachweis der Expression wurde über Elektronenmikroskopie mit Hilfe goldmarkierter Antikörper gegen Cyanophycin erbracht.

Zur Untersuchung der Folgen einer oralen Aufnahme von Cyanophycin durch Säuger liegt ein Bericht über eine Fütterungsstudie an Ratten durchgeführt an der FBN Dummerstorf vor. Aus dem Bericht ergeben sich Anhaltspunkte für eine schlechtere Verwertbarkeit der Nährstoffe aus Futter mit Cyanophycinzusatz. Eine akut-toxische Wirkung des Cyanophycins konnte jedoch nicht gezeigt werden, gesundheitliche Beeinträchtigungen wurden im Beobachtungszeitraum nicht festgestellt. Die Gehalte an Cyanophycin im Futter dieser Studie waren höher als die, die in den Knollen der zur Freisetzung beantragten Kartoffel vorliegen. Ferner ist nicht davon auszugehen, dass Wild (durch den vorgesehenen Wildzaun bedingt vor allem Kleinsäuger) sich in der Vegetationsperiode ausschließlich von diesen Kartoffeln ernähren würde, so dass bei gelegentlichem Wildfraß von einer weiteren Reduzierung des Anteils von Cyanophycin an der Gesamtfuttermenge auszugehen ist. Vor diesem Hintergrund ist mit einer Gefährdung bei Aufnahme der gentechnisch veränderten Kartoffel nicht zu rechnen.

(d) Das *npt* II-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *npt* II-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 (vorwiegend C₁, C_{1α} und C₂) 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.

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

Die zur Transformation der Kartoffelpflanzen verwendeten Plasmide enthalten innerhalb der T-DNA neben den angesprochenen Genen und der Expressionskassette des *nptII*-Gens die zur Expression nötigen regulatorischen Sequenzen 35S Promotor und Terminator aus dem Blumenkohlmosaik-Virus. Diese sind nicht kodierend und regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden DNA-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Weitergehende Funktionen sind nicht bekannt, weitergehende Auswirkungen in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht zu erwarten.

(f) 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.

Das den Konstrukten zu Grunde liegende Transformationsplasmid p35S ist ein Derivat des binären Vektors pLH9000 und enthält außerhalb der Borderregionen die folgenden genetischen Elemente:

- den Replikationsursprung pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa*,
- den Replikationsursprung des Plasmids pBR322 (*ColE1 ori*) aus *E. coli*;
- das *aadA*-Gen des Tn7-Transposons aus *E. coli*, welches eine Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin vermittelt.

Für diese Sequenzen wurde kein Nachweis ihrer An- oder Abwesenheit in den gentechnisch veränderten Kartoffeln geführt. 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.

(g) 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 den bisherigen Gewächshausversuchen und den vorliegenden Ergebnissen der Fütterungsstudien 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.

Das Kraut der auf dem Versuchsgelände befindlichen Kartoffeln wird durch Einsatz eines Sikkationsmittels vor der Ernte abgetötet. Die Knollen der Versuchspflanzen werden geerntet und für weitere Untersuchungen oder als Rückstellproben in eine gentechnische Anlage gebracht. Nicht benötigte Kartoffelknollen werden durch Autoklavieren oder Dämpfen inaktiviert. Das Kartoffelkraut bleibt zur Verrottung auf der Versuchsfläche liegen.

Nach der Ernte ist vorgesehen, die Versuchsfläche 15-20 cm tief aufzulockern, um eventuell auf der Fläche verbliebene Knollen zu Tage zu fördern. Die Fruchtfolge auf der Versuchsfläche wird so gestaltet, dass nach der Freisetzung gentechnisch veränderter Kartoffeln auf einer Fläche für mindestens zwei Jahre keine Kartoffeln angebaut werden (begrünte Brache und Wintergetreide). 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. Sollte im Jahr der Nachbeobachtung Durchwuchskartoffeln gefunden werden, so verlängert sich die Nachbeobachtung um ein weiteres Jahr.

Kartoffelpflanzen können blühen und Beeren bilden. Dass unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und dass daraus Pflanzen aufwachsen, ist nicht wahrscheinlich. Samentragende Beeren sollen vor Einsatz der Sikkationsmittels entfernt werden. Sollten Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die Nachkontrolle erfasst.

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 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 sowohl Selbst- als auch Fremdbefruchtung statt, eine Fremdbefruchtung geschieht jedoch am ehesten zwischen benachbarten Pflanzen.

Der in dem beantragten Versuch vorgesehene Abstand von mindestens 150 m zu benachbarten Kartoffelanpflanzungen wird als ausreichend angesehen. Auskreuzungen von *Solanum tuberosum* in andere Kartoffelbestände über eine Distanz von 20 m hinaus sind unwahrscheinlich. 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 oder Pflanze und Viren tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austausches 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 *vp60*-Konstrukt

Pflanzenpathogene Caliciviren existieren nicht. Trotzdem kann prinzipiell eine heterologe Transkapsidierung bei der Infektion der gentechnisch veränderten Kartoffel mit einem phytopathogenen Virus nicht ausgeschlossen werden. Ein Vorteil für das Virus ist daraus nicht zu erkennen, von einem Verlust der aufgenommenen Fremdproteine bei einem weiteren Vermehrungszyklus ist auszugehen. Zudem ist die Wahrscheinlichkeit, dass die dreidimensionale Struktur des VP60-Proteins in die räumliche Kapsidstruktur eines Pflanzenvirus derart passt, dass das chimäre Kapsid noch funktionsfähig ist, äußerst gering. Die Möglichkeit eines Genaustausches zwischen überinfizierendem Virus und gentechnisch veränderter Pflanze bezüglich des *vp60*-Genes ist ebenfalls als wenig wahrscheinlich anzusehen, da Nukleotid-

sequenzhomologien zwischen dem *vp60*-Gen und Genen aus Pflanzenviren nicht beschrieben sind. Eine Wirtsbereicherweiterung durch die Aufnahme des *vp60*-Genes würde einem phytopathogenen Virus darüber hinaus keinen Vorteil bringen, da das synthetische *vp60*-Gen in den gentechnisch veränderten Kartoffeln dem Codon-Gebrauch höherer Pflanzen angepasst ist. Die in dem Konstrukt vorhandenen regulatorischen Sequenzen (35S-Promotor und Terminator) stammen aus dem Blumenkohlmosaikvirus und kommen in der Umwelt häufig vor. Dieses gilt auch für das *vp60*-Gen selber, das aus Kadavern infizierter Wildkaninchen in die Umwelt eingetragen wird. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen für jedes Teil des Konstrukts könnte daher mit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen als aus den freigesetzten gentechnisch veränderten Kartoffeln. Selbst im unwahrscheinlichen Fall eines horizontalen Gentransfers hätte es in Mikroorganismen keine Funktion.

(b) Das *ctxB*-Konstrukt

Das *ctxB*-Gen kodiert für ein ungiftiges Protein. Zudem handelt sich um ein synthetisches Gen, welches in seiner Codon-Struktur der von höheren Pflanzen angepasst ist. Daraus folgt eine ineffiziente Umsetzung in Protein im unwahrscheinlichen Fall eines horizontalen Gentransfers auf Mikroorganismen. Ein erkennbarer Selektions-Vorteil in solch einem Fall ist nicht zu erkennen. *Vibrio cholerae* selbst kommt hauptsächlich in Süßwasser und salzhaltigem Brackwasser vor. Eine Übertragung des Genes auf andere Mikroorganismen, etwa bei Überschwemmungen, aus nicht gentechnisch veränderten Organismen wäre viel wahrscheinlicher als aus den gentechnisch veränderten Kartoffeln im Rahmen eines zeitlich und räumlich begrenzten Freisetzungversuches. Für die regulatorischen Sequenzen gilt das unter (a) Gesagte.

(c) Das *psb-cyeI*-Konstrukt

Das *psb-cyeI*-Konstrukt bewirkt die Bildung des Enzymes Cyanophycin-Synthetase. Im unwahrscheinlichen Fall eines horizontalen Gentransfers auf Mikroorganismen wäre es theoretisch denkbar, dass es zu einer Aktivität dieses Enzyms in den Mikroorganismen kommt. Ein selektiver Vorteil wäre daraus nicht abzuleiten. Darüber hinaus kommen Cyanobakterien überall an belichteten Standorten in der Umwelt vor. Die Freisetzung der gentechnisch veränderten Pflanzen erhöht daher nicht erkennbar den Eintrag dieses Genes in die Umwelt. Weiterhin ist das Produkt der Cyanophycin-Synthetase, das polymere Eiweiß Cyanophycin, nicht toxisch und über die Aktivität anderer Bakterien biologisch abbaubar.

(d) Das *npt II*-Gen

Das *npt II*-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. (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 *npt II*-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 Wissenschaftliche Gremium für gentechnisch veränderte Organismen (GMO-Panel) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat das Gen *npt II* 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 Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) wurde das *npt II*-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“.

(e) Weitere außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln können folgende genetische Elemente enthalten, die auf den verwendeten pLH900 Derivaten außerhalb der Borderregionen liegen:

- den Replikationsursprung pVS1 aus *Pseudomonas aeruginosa*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pBR322 (*ColE1 ori*) aus *E. coli*;
- das *aadA*-Gen aus *E. coli*;

Der Replikationsursprung des Plasmides pVS1 stammt aus *Pseudomonas aeruginosa* und enthält die genetische Information für die Stabilität und die Replikation des Plasmides. Für diesen DNA-Abschnitt ist die Wahrscheinlichkeit der Weitergabe durch Übertragung zwischen Pseudomonaden und anderen Mikroorganismen viel größer als zwischen den gentechnisch veränderten Pflanzen und Mikroorganismen.

Das pBR322-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 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 pBR322 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

Das *aadA* (Strep/SpecR)-Gen stammt vom Transposon Tn7 aus *E. coli* und kodiert für eine Aminoglycosid-Adenyltransferase. Das *aadA*-Gen liegt auf dem Transformationsplasmid außerhalb der T-DNA, eine Übertragung auf die gentechnisch veränderten Kartoffeln wurde nicht untersucht. Daher muss das Risiko bei der Übertragung über einen horizontalen Gentransfer von der Pflanze auf Mikroorganismen berücksichtigt werden. Das *aadA*-Gen vermittelt eine Resistenz gegen Streptomycin und Spectinomycin. Diese Antibiotika werden nur begrenzt in der Humanmedizin eingesetzt, besitzen aber durchaus noch für die Behandlung der Tuberkulose (Streptomycin) oder der Gonorrhoe (Spectinomycin) humanmedizinische Bedeutung. Bakterien mit einer Resistenz gegenüber Streptomycin sind in der Umwelt weit verbreitet. Eine Resistenz gegenüber diesem Antibiotikum kann sich also auch durch horizontalen Gentransfer von nicht gentechnisch veränderten Mikroorganismen ausbreiten.

Das *aadA*-Gen wurde daher von der ZKBS in die Gruppe II der Antibiotika-Resistenzgene eingestuft, „die (a) in Mikroorganismen verbreitet sind und (b) deren relevante Antibiotika nur noch in Teilbereichen der Human- bzw. Veterinärmedizin therapeutische Anwendung finden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass - wenn überhaupt - das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom transgener Pflanzen nur sehr geringe Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hat“. Das GMO-Panel der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit hat in seinem Gutachten über die Verwendung von Antibiotika-Resistenzgenen als Markergene in gentechnisch veränderten Pflanzen vom 2. April 2004 das *aadA*-Gen in die Gruppe derjenigen Gene eingeordnet, die auf experimentelle Freilandversuche beschränkt werden und nicht in gentechnisch veränderten Pflanzen vorliegen sollten, die in Verkehr gebracht werden sollen. 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 Freisetzungsfeldern ist nicht davon auszugehen, dass die Präsenz des *aadA*-Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.