Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Antrag 6786-01-0167

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffeln

(*Solanum tuberosum* ; Désirée)

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 15. März 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.

Dienstsitz Braunschweig
Bundesallee 50, Geb. 247
38116 Braunschweig
Tel: +49 (0)531 21497-0
Fax: +49 (0)531 21497-299

Abt. Pflanzenschutzmittel
Messeweg 11/12
38104 Braunschweig
Tel: +49 (0)531 299-5
Fax: +49 (0)531 299-3002

Dienstsitz Berlin
Mauerstraße 39-42
10117 Berlin
Tel: +49 (0)30 18444-000
Fax: +49 (0)30 18444-89999

Referatsgr. Untersuchungen
Diedersdorfer Weg 1
12277 Berlin
Tel: +49 (0)30 18412-0
Fax: +49 (0)30 18412-2955

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

(a) Das StSDDhpi-RNAi-Konstrukt

Gegenstand der beantragten Freisetzung ist es, die Rolle der Stomatadichte für den Wasserhaushalt, das Wachstum und die Knollenbildung von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen unter Freilandbedingungen zu untersuchen.

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 den Mesophyllzellen stattfindende 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. Um die Konsequenzen einer veränderten Stomatadichte auf Wachstum, Photosynthese und Ertrag zu untersuchen, wurden gentechnisch veränderte Kartoffelpflanzen erzeugt, bei denen die Spaltöffnungsdichte erhöht wurde.

Um die Schließzellendichte zu erhöhen, wurde in Kartoffelpflanzen mit Hilfe eines RNAi-Konstrukts (pStSDDhpi) die Expression des kartoffeleigenen SDD1-Proteins reduziert. Durch Transkription des RNAi-Konstrukts, welches eine Teilsequenz des *SDD1*-Gens sowohl in Sense- als auch in Antisense-Orientierung – getrennt durch ein Intron des Pyruvat-Orthophosphat Dikinase (pdk)-Gens aus *Flaveria trinervia* – enthält, entsteht eine RNA mit so genannter „hairpin intron" Struktur. Dabei bilden Sense- und Antisense-Anteil der RNA einen Doppelstrang, dessen Einzelstränge durch eine aus dem pdk-Intron gebildeten Haarnadelschleife verbunden sind. Das Intron wird durch zelleigene Mechanismen erkannt und korrekt gespleißt, wodurch ein kompakter RNA-Doppelstrang entsteht. Dieser wird in der Pflanzenzelle von spezifischen Enzymen erkannt und in kleine Fragmente zerlegt. Diese RNA-Fragmente binden an die mRNA des betreffenden endogenen Gens (*StSDD1*) und vermitteln den Abbau dieser mRNA durch die gleichen Enzyme. Für die Freisetzung wurden vier Linien ausgewählt, bei denen mittels quantitativer real-time PCR (qRT-PCR) eine Verringerung (Linie #23, #41 und #45) bzw. ein gänzlicher Wegfall (Linie #1) der SDD1-Expression gegenüber der Ausgangssorte gezeigt werden konnte. In Gewächshausversuchen wiesen die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen verglichen mit der unveränderten Ausgangslinie eine bis zu 70 % höhere Stomatadichte auf. Zudem besaßen die gentechnisch veränderten Pflanzen eine erhöhte Temperaturtoleranz, wobei sie unter sehr hohen Temperaturbedingungen während der Wachstumsphase auch einen erhöhten Knollenertrag zeigten.

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 *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 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

Die zur Transformation der Kartoffelpflanzen verwendeten Plasmide enthalten innerhalb der T-DNA neben dem StSDDhpi-RNAi-Konstrukt und der Expressionskassette des *npt* II-Gens Nukleotide des *lac*I- und des *lac*Z-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. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch berichtet.

Das Transformationsplasmid pStSDDhpi ist ein Derivat des binären Vektors pART27 und enthält außerhalb der Borderregionen die folgenden genetischen Elemente:

- den *ori*T des Plasmids RP4 aus *E. coli*;
- die transponierbare Insertionssequenz IS1 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *traJ*-Gens des Plasmids RP4 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *ori*V des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *trfA*-Gen des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *pecM* ähnlichen Gens des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung des Plasmids pBR322 (ColE1 *ori*) aus *E. coli*;
- Nukleotide des *bla*-Gens des Plasmids pBR322 aus *E. coli*;
- das *sat1*-Gen des Tn7-Transposons aus *E. coli*;
- das *aadA*-Gen des Tn7-Transposons aus *E. coli*.

Eine vom Antragsteller durchgeführte PCR-Analyse ergab, dass das *aadA*-Gen in drei (#1, #41 und #45) von vier der zur Freisetzung beantragten Transformanten enthalten ist, so dass der Risikoabschätzung zugrunde gelegt wird, dass alle im Plasmid pStSDDhpi enthaltenen Gene, die außerhalb der Borderregionen liegen, in die pflanzliche DNA integriert 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.

(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 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 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 *npt* II-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 Jahre 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 betrieben.

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.

In Gewächshausversuchen zeigten die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen unter sehr hohen Temperaturbedingungen während der Wachstumsphase einen erhöhten Knollenertrag, der sich aufgrund erhöhter Knollenzahl im Vergleich zur untransformierten Ausgangssorte in einem erhöhten Nachauflauf nach heißen Vegetationsperioden in Kombination mit frostarmen Wintern auswirken könnte. Auch unter Berücksichtigung dieses Faktors ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die transgenen 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 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) Das StSDDhpi-RNAi-Konstrukt

Die in dem Konstrukt vorhandenen Abschnitte des *SDD1*-Gens, die durch ein pdk-Intron aus *Flaveria trinervia* getrennt sind und unter der Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohlmosaikvirus sowie des *ocs*-Terminators aus *Agrobacterium tumefaciens* stehen, stammen aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*). Alle im Konstrukt enthaltenen Sequenzen kommen in der Umwelt ohnehin häufig vor, weshalb ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen für jedes Teil des Konstrukts mit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen könnte. Es ist auch nicht zu erwarten, dass die Übertragung des RNAi-Konstrukts mit einer erhöhten Häufigkeit erfolgen wird. Selbst im Fall eines horizontalen Gentransfers hätte es in Mikroorganismen keine Funktion.

(b) 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“.

(c) Das Antibiotika-Resistenzgen *aadA*

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, wurde jedoch in drei (#1, #41 und #45) von vier der zur Freisetzung beantragten Transformanten übertragen. Streptomycin und Spectinomycin 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 Freisetzungsflächen 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.

(d) Das Antibiotika-Resistenzgen *sat1*

Das *sat1*-Gen stammt wie das *aadA*-Gen vom Tn7-Transposon aus *E. coli* und kodiert für eine Streptothricin-Acetyl-Transferase. Zwar wurde das Vorhandensein des *sat1*-Gens, das auf dem Transformationsplasmid außerhalb der T-DNA liegt, im Genom der gentechnisch veränderten Pflanzen nicht untersucht, aber die unmittelbare Nähe dieses Gens zum *aadA*-Gen, dessen Anwesenheit im Genom der Transformanten #1, #41 und #45 experimentell nachgewiesen werden konnte, lässt vermuten, dass auch das *sat1*-Gen in die pflanzliche DNA integriert ist. Das *sat1*-Gen verleiht eine Resistenz gegen Antibiotika aus der Streptothricin-Gruppe. Bei Streptothricinen handelt es sich um Sekundärmetabolite, die von verschiedenen Streptomyceten produziert werden, und die aus einem Streptolidinring, einem Gulosamin und einer in ihrer Länge variierenden Poly-Lysin-Seitenkette bestehen. Ihre antibiotische Wirkung beruht auf einer Interaktion mit der 30S-Untereinheit der Ribosomen, die in einem Translationsabbruch oder einer Fehltranslation resultiert. Streptothricin-Acetyl-Transferasen sind durch eine N-Acetylierung der β-Aminogruppe eines Lysinrestes der Poly-Lysin-Seitenkette dazu in der Lage, Antibiotika der Streptothricin-Gruppe spezifisch zu inaktivieren. Streptothricine werden in der Human- und Veterinärmedizin nicht zu therapeutischen Zwecken verwendet. Resistenzen gegen Streptothricine sind in Mitteleuropa bei Enterobakterien weit verbreitet, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass von 1983 bis 1990 in der DDR Streptothricine intensiv als wachstumsförderndes Mittel in der Schweinemast eingesetzt wurden. Zudem ist die Verbreitung von Streptothricin-Resistenzgenen über horizontalen Gentransfer zwischen Bodenbakterien begünstigt, weil sie auf verschiedenen Transposons vorkommen. Inzwischen wurden derartige Resistenzgene auch bei Pathogenen wie *Shigella* nachgewiesen. Die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen ist somit sehr gering im Vergleich zur Wahrscheinlichkeit des natürlich vorkommenden Gentransfers zwischen Mikroorganismen. Seitens der EFSA liegt für das Streptothricin-Resistenzgen *sat1* bisher keine Bewertung vor. In ihrem Beschluss zu diesem Antrag bewertet die ZKBS die Verwendung des *sat1*-Gens in Freisetzungsversuchen als unbedenklich, da Resistenzen gegen Streptothricine in Mitteleuropa in Darmbakterien weit verbreitet sind und Streptothricine in Human- und Veterinärmedizin nicht zu therapeutischen Zwecken verwendet werden.

(e) Nukleotide des *lac*I-Gens und des *lac*Z-Gens aus *E. coli*

Die Gene *lac*I und *lac*Z 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.

(f) Weitere außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln können folgende genetische Elemente enthalten, die auf den verwendeten pART27 Derivaten außerhalb der Borderregionen liegen:

- das *trfA*-Gen des Plasmids RK2 aus *E.coli*;
- den Replikationsursprung *ori*V des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *pecM* ähnlichen Gens des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- den *ori*T des Plasmids RP4 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *traJ*-Gens des Plasmids RP4 aus *E. coli;*
- den Replikationsursprung des Plasmids pBR322 (ColE1 *ori*) aus *E. coli*;
- Nukleotide des *bla*-Gens des Plasmids pBR322 aus *E. coli*;
- die transponierbare Insertionssequenz IS1 aus *E. coli*.

RK2 und RP4 gehören zu einer Gruppe von broad host range-Plasmiden (u. a. RP1, R18, R68), die in einer Vielzahl gram-negativer Bakterien replizierbar sind. Für die aus RK2 und RP4 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 unvollständig (*traJ*, *pecM*).

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 *bla*-Gen ist zudem unvollständig.

Das transponierbare 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.