



Antrag 6786-01-0160

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffeln

(*Solanum tuberosum*; Albatros)

**Linien pCB301-Kan-MaSpl-100xELP-3 und -6; pCB301-Kan-MaSplII-100xELP-26, -27
und -28; pCB301-Kan-So1-100xELP-31, -33, -37, -38, -39, -44 und -50**

im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,

durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 10. Mai 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) Die Konstrukte für die Bildung der für die Spinnenseidenproteine MaSpl, MaSpII bzw. SO1 aus *Nephila clavipes*

Die in die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen übertragenen Gene *MaSpl* und *MaSpII* kodieren für Proteine des Kerns des Tragfadens von Spinnennetzen der Radnetzspinne *Nephila clavipes*. Das SO1-Gen besteht aus dem repetitiven Anteil des *MaSpl*-Gens, die 3'-lokalisierte nicht-repetitive Sequenz von ca. 180 bp wurde entfernt.

Alle drei Zielgene (*MaSpl*, *MaSpII*, SO1) wurden in den jeweiligen Transformationsplasmiden mit den gleichen Funktionselementen kombiniert. Diese umfassen: das Gen für ein synthetisches Elastin, die Nukleinsäuresequenzen für einen c-myc-Tag, für die LeB4-Signalsequenz und für das ER-Retentionssignal KDEL. Die Konstrukte werden unter der Kontrolle des CaMV35S-Promotors und –Terminationssignals des in allen Pflanzenteilen der Kartoffel exprimiert.

Als Ergebnis der Transformation bilden die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen Spinnenseidenproteine, fusioniert mit einem synthetischen Elastinprotein. Das Elastinprotein 100xELP ist ein synthetisches Protein mit Ähnlichkeit zum menschlichen Elastin. Es besteht aus oligomeren Wiederholungen des Pentapeptids Valin-Prolin-Glycin-Xaa-Glycin und zeigt eine vom Salzgehalt und von der Temperatur abhängige Löslichkeit. Diese Eigenschaft überträgt es auf den Fusionspartner und ermöglicht so eine effiziente Isolierung und Reinigung des Spinnenseidenproteins. Mit „Xaa“ wird jede andere Aminosäure außer Prolin bezeichnet. Die N-terminal verknüpfte Legumin A LeB4-Signalsequenz soll in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen den Transport der Fusionsproteine MaSal-100xELP, MaSall-100xELP bzw. SO1-100xELP in das endoplasmatische Retikulum bewirken, wo die Signalsequenz durch Peptidasen abgespalten wird. C-terminal wurde das ER-Retentionssignal KDEL angefügt. Damit wird das rekombinante Protein im Lumen des endoplasmatischen Retikulums zurückgehalten und nicht von der Zelle sezerniert. Der c-myc-Tag dient dem immunochemischen Nachweis des Fusionsproteins per Antikörper im Western-Blot.

Die Expression der Fusionsproteine MaSpl-100xELP, MaSpII-100xELP bzw. SO1-100xELP in den Blättern und Knollen der freizusetzenden gentechnisch veränderten Kartoffellinien wurde durch Western-Blot nachgewiesen.

Die Goldene Radnetzspinne *Nephila clavipes* ist hauptsächlich im Süden der Vereinigten Staaten (z.B. Florida) und in Mittelamerika verbreitet. Das Weibchen besitzt verschiedene Spinndrüsen, um Fäden mit unterschiedlichen Eigenschaften zu produzieren. Der stabilste Faden ist der Tragfaden, der eine hohe Stärke und Bruchfestigkeit hat und damit von Interesse für die Nutzung als Biomaterial ist. Eine humantoxische Wirkung des Spinnenseidenproteins von *Nephila clavipes* ist nicht bekannt.

Das menschliche Elastin ist ein fibrilläres, elastisches Protein, reich an Glycin und Prolin, und Hauptbestandteil des elastischen Bindegewebes. Es besteht aus langen, geknäuelten Polypeptidketten. Elastin wird als Proelastin von Fibroblasten und glatten Muskelzellen in den Extrazellularraum ausgeschleust und dort enzymatisch quervernetzt. Elastische Fasern haben eine lange Bestehensdauer und sind selbst in kochendem Wasser nicht löslich und widerstandsfähig gegen Säuren und Basen.

Die Sequenz des c-myc-Tag aus *Homo sapiens* hat eine Länge von 11 Aminosäuren und dient der immunochemischen Detektion des Fusionsproteins SO1-100xELP. Die kurze Aminosäureabfolge stammt aus dem c-MYC-Protein, einem Transkriptionsfaktor aus Säugerzel-

len mit Funktion im Zellwachstum und der Proliferation. Er besitzt keine enzymatische Aktivität.

Das ER-Retentionssignal KDEL aus *Homo sapiens* ist eine kurze Aminosäureabfolge (Lys-Asp-Glu-Leu), die das Zurückhalten des BiP („heavy chain binding protein“) im Endoplasmatischen Retikulum bewirkt. Das Retentionssignal KDEL ist jedoch nicht spezifisch für humanes BiP, sondern dient generell neben HDEL (His-Asp-Glu-Leu) in eukaryoten Zellen der Retention von Proteinen im ER. In den gentechnisch veränderten Kartoffeln wird dadurch das rekombinante Protein im ER zurückgehalten.

Als Folge der gentechnischen Veränderung wurde der Proteinstoffwechsel in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen dahingehend verändert, dass pflanzenfremde Proteine, nämlich die Spinnenseiden-Fusionsproteine SO1-100xELP, MaSpl-100xELP oder MaSPII-100xELP, in den Kartoffelpflanzen synthetisiert werden. Der Anteil des rekombinanten Proteins wird von der Antragstellerin auf bis ca. 4 % des gesamtlöslichen Proteins geschätzt.

Bei den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen wurden in Gewächshausuntersuchungen keine phänotypischen Unterschiede (Größe, Blattmorphologie, Farbe, Knollenertrag, Knollengröße) zu den Wildtyp-Pflanzen von der Antragstellerin beobachtet. Eine Freisetzung des IPK in den Jahren 2003 und 2004 von vergleichbaren gentechnisch veränderten Kartoffeln, die das SO1-100xELP exprimieren, ergab keine signifikanten Unterschiede im Knollenertrag. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sind nicht für den Verzehr bestimmt, eine Nutzung als Futter ist nicht vorgesehen.

Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung durch die Bildung der Spinnenseiden-Elastin-Fusionsproteine sowie durch die damit verbundenen Veränderungen in der Proteinzusammensetzung und die Synthese pflanzenfremder Proteine in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen nicht zu erwarten.

(b) Das *nptII*-Gen

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

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

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

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

Die zur Transformation der Kartoffelpflanzen eingesetzten Plasmide pCB301-Kan-MaSpl-100xELP, pCB301-Kan-MaSplII-100xELP und pCB301-Kan-SO1-100xELP sind Derivate des binären Vektors pCB301, der aus pBIN19 entwickelt und vollständig sequenziert wurde.

Innerhalb der T-DNA enthalten die Transformationsplasmide neben den spezifischen Spinnenseiden-Konstrukten, der Expressionskassette des *nptII*-Gens und der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids pBluescriptII etwa 160 Nukleotide mit der rechten und ca. 140 Nukleotide mit der linken Bordersequenz aus pBIN19. 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 Plasmid pCB301 enthält außerhalb der Borderregionen:

- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *aphAIII* (= *nptIII*)-Gen aus *Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus faecalis*),
- einen DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologien zum *trfA*-Gen des Plasmids RK2 für die Replikation in *E.coli* und in *A. tumefaciens*;

Die Antragstellerin hat mit den zur Freisetzung beantragten Kartoffellinien PCR-Untersuchungen mit Primern durchgeführt, die den Replikationsursprung, das *nptIII*-Gen bzw. im *trfA*-Gen spezifisch amplifizieren. In diesen Untersuchungen wurden weder das *nptIII*-Gen noch der Replikationsursprung in den zur Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Kartoffellinien nachgewiesen. Die Anwesenheit des *nptIII*-Gens in einer der zur Freisetzung bestimmten Kartoffellinien ist daher höchst unwahrscheinlich. In einer gentechnisch veränderten Kartoffellinie wurde ein Bereich im *trfA*-Gen nachgewiesen. Der Risikoabschätzung wird daher zugrunde gelegt, dass es in den Pflanzen enthalten sein könnte.

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 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 im Gewächshaus 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 ge-

nutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, liegen jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. 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 Versuchsfläche liegt innerhalb eines als natürliches Überschwemmungsgebiet ausgewiesenen Gebietes eines kleinen Flusses, der in einiger Entfernung zu der Versuchsfläche fließt. In der Risikobewertung sind deshalb mögliche Folgen eines Hochwassers auf der Versuchsfläche zu berücksichtigen. Zwar sind Kartoffelknollen schwer und schwimmen nicht. Stolonen, Sprosse und Wurzeln sorgen zudem für eine feste Verankerung der Kartoffelpflanze im Boden. Zur Abschwemmung von Knollen, Pflanzen oder Tochterknollen sowie sich ggf. an den Pflanzen bildenden Früchten aus einem Pflanzenbestand bedürfte es einer hohen Fließgeschwindigkeit des Wassers. Die Versuchsfläche ist weitgehend eben, der Fluss fließt ca. 600 m entfernt. Unter diesen räumlichen Bedingungen erscheint eine Abschwemmung vermehrungsfähiger Pflanzenteile in Folge eines Hochwassers als unwahrscheinlich, wenn auch nicht unmöglich. Um zu vermeiden, dass vermehrungsfähige Pflanzenteile in Folge eines Hochwassers abgeschwemmt werden und an anderer Stelle wieder anwachsen und sich etablieren oder ausbreiten können, ist während der Freisetzung die Bildung von vermehrungsfähigen Samen an den gentechnisch veränderten Kartoffeln durch rechtzeitiges Ab sammeln der Blüten bzw. jungen Beeren zu verhindern. Droht ein Hochwasser die Freisetzungsfäche zu überschwemmen, ist durch geeignete Maßnahmen (z. B. durch Einfrieden der Freisetzungsfäche mit Sandsäcken oder durch Entfernen der Pflanzen) zu verhindern, dass vermehrungsfähige Teile der gentechnisch veränderten Kartoffelb durch strömendes Wasser von der Freisetzungsfäche abgeschwemmt werden.

Die Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffeln werden nach der manuellen Ernte bonitiert, gewogen und für weitere Untersuchungen in eine gentechnische Anlage gebracht. Nicht benötigte Kartoffelknollen werden sachgerecht inaktiviert. Das Kartoffelkraut bleibt zur Verrottung auf der Versuchsfläche liegen.

Nach der Ernte ist vorgesehen, die Versuchsfläche flach zu eggen, um sie 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 dieser Zeit wird die Fläche auf Durchwuchskartoffeln kontrolliert. Diese Durchwuchskontrolle ist jeweils um ein Jahr zu verlängern, wenn im Jahr des Beobachtungszeitraumes gentechnisch veränderte Durchwuchskartoffeln aufgetreten sind.

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.

Bei den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen wurden in Gewächshausuntersuchungen keine phänotypischen Unterschiede (Größe, Blattmorphologie, Farbe, Knollenertrag, Knollengröße) zu den Wildtyp-Pflanzen beobachtet. Eine Freisetzung des IPK in den Jahren 2003 und 2004 von vergleichbaren gentechnisch veränderten Kartoffeln, die das SO1-100xELP exprimieren, ergab keine signifikanten Unterschiede im Knollenertrag. Diese Ergebnisse ergeben keine Hinweise auf ein gegenüber dem Wildtyp veränderte Konkurrenzfähigkeit oder eine gesteigerte Invasivität.

Es ist 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 oder in Folge eines Hochwassers kommen würde, wäre daher keine Ausbreitung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in der Umwelt zu erwarten.

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

Versuche zur Kreuzung von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden Solanaceen waren erfolglos. Unter Freilandbedingungen fand keine Einkreuzung von gentechnisch veränderten Kartoffeln in *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) statt. Auch nach künstlicher Pollenübertragung auf *S. nigrum* wurden keine lebensfähigen Samen erhalten. Eine Regeneration einiger Hybriden, die sich allerdings als steril erwiesen, war nur mit Hilfe artifizierlicher 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, 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 anderen, möglicherweise mit Kartoffeln bebauten landwirtschaftlichen Nutzflächen 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.

Der Möglichkeit, dass aus möglicherweise gebildeten Samen Pflanzen auflaufen würden, soll im Übrigen dadurch vorgebeugt werden, dass während der Freisetzung die Bildung von vermehrungsfähigen Samen an den gentechnisch veränderten Kartoffeln durch rechtzeitiges Absammeln der Blüten bzw. jungen Beeren zu verhindern ist.

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) Die Konstrukte zur Expression der Spinnenseidenfusionsproteine MaSpl, MaSplII bzw. des synthetischen Spinnenseidenproteins (SO1) aus *Nephila clavipes*, jeweils fusioniert mit dem Gen für ein synthetisches Elastin (100xELP) sowie dem c-myc-Tag aus *Homo sapiens*, der LeB4-Signalsequenz aus *Vicia faba* und dem ER-Retentionssignal KDEL aus *Homo sapiens*

Die Gene für die Spinnenseidenproteine stammen aus *Nephila clavipes*. Die hier verwendete Kodierregion für das Protein SO1 ist ein synthetisches Spinnenseidenprotein mit hoher Ähnlichkeit zu den repetitiven Teilsequenzen des Proteins MaSpl des Tragfadens. Das synthetische Protein SO1 weist eine hohe Ähnlichkeit von ca. 94 % zum natürlichen Protein auf. Die Sequenz für das Signalpeptid stammt aus *Vicia faba*. Das Gen für das synthetische Elastin hat eine hohe Ähnlichkeit zum menschlichen Elastin-Gen. Die Sequenzen für den c-myc-Tag und das ER-Retentionssignal stammen aus *Homo sapiens*. Damit kommen die Gene in der Umwelt ohnehin häufig vor und ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen.

- (b) Das *nptII*-Gen

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

Der Resistenzmechanismus der Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung kommt natürlicherweise bei Bodenmikroorganismen vor. APH(3')II-Enzyme wurden zudem in klinischen Isolaten von Menschen gefunden. Die weite Verbreitung von Genen, die

eine Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika vermitteln, ist durch die häufige Anwendung dieser Antibiotika sowie dadurch zu erklären, dass diese Gene oft auf Plasmiden lokalisiert sind, wodurch eine effektive Übertragung durch Konjugation möglich ist. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Kartoffeln auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Der Wissenschaftliche Ausschuss für gentechnisch veränderte Organismen („GMO-Panel“) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat das *nptII*-Gen 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 wurde 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) Weitere innerhalb der T-DNA gelegene DNA-Abschnitte

Innerhalb der T-DNA enthalten die Transformationsplasmide neben den unter a) und b) genannten Expressionskassette etwa 160 Nukleotide mit der rechten und ca. 140 Nukleotide mit der linken Bordersequenz aus pBIN19. Diese sind in Pflanzen nicht funktional. Sie stammen aus *Agrobacterium tumefaciens*, einem in der Umwelt weit verbreiteten Bodenbakterium.

(d) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Außerhalb der T-DNA-Borderregionen der verwendeten Transformationsplasmide liegen folgende genetischen Elemente:

- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *aphAIII* (= *nptIII*)-Gen aus *Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus faecalis*),
- einen DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologien zum *trfA*-Gen des Plasmids RK2 für die Replikation in *E.coli* und in *A. tumefaciens*;

Die Ergebnisse der durchgeführten PCR-Untersuchungen zeigen, dass in einer der für die Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Kartoffellinien ein Bereich des *trfA*-Gens übertragen worden ist. Das *trfA*-Gen stammt aus dem Plasmid RK2. 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.

Es ist auf Grund der übrigen vorliegenden Ergebnisse von PCR-Untersuchungen höchst unwahrscheinlich, dass weitere genetische Elemente außerhalb der T-DNA-Borderregionen in die für die Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Kartoffellinien übertragen wurden. Da die Anwesenheit des *nptIII*-Gens jedoch nicht ausgeschlossen werden kann, sind alle freigesetzten Kartoffellinien nach Erscheinen der Blätter unter Anwendung von Primern, die die Anwesenheit der kodierenden Sequenz ausschließen, auf das Vorhandensein des *nptIII*-Gens zu überprüfen. Soweit das *nptIII*-Gen in einer Kartoffellinie nachgewiesen wird, ist das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit darüber in Kennt-

nis zu setzen und sind die Pflanzen der jeweiligen Linien unverzüglich und rückstandsfrei zu entfernen und unschädlich zu entsorgen.

In seiner Stellungnahme vom 02.04.2004 stuft der Wissenschaftliche Ausschusses für gentechnisch veränderte Organismen der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA), das in den zur Freisetzung anstehenden Kartoffeln vorhandene *nptIII*-Gen in die Gruppe III ein. Der Wissenschaftliche Ausschuss empfiehlt, dass Antibiotikaresistenzgene dieser Gruppe in Pflanzen, die inverkehrgebracht oder freigesetzt werden sollen, nicht enthalten sind.

Zwar wurde die Stellungnahme der EFSA im Zusammenhang mit der Umsetzung des Artikels 4 Abs. 2 der Richtlinie 2001/18/EG erarbeitet. Danach müssen Antibiotikaresistenzgene bei einer Umweltverträglichkeitsprüfung besonders berücksichtigt werden, und zwar im Hinblick auf die Identifizierung und schrittweise Einstellung der Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in GVO. Diese schrittweise Einstellung der Verwendung soll im Falle von gemäß Teil C in den Verkehr gebrachten GVO bis zum 31. Dezember 2004 und im Falle von gemäß Teil B zugelassenen GVO bis zum 31. Dezember 2008 erfolgen.

Die Aussage der EFSA vom 02.04.2004 ist jedoch nicht auf einen bestimmten Zeitraum beschränkt, sondern empfiehlt pauschal, auf die Verwendung dieser Antibiotikaresistenzmarkergene zu verzichten.