



Antrag 6786-01-0121

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten
Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (GPTV-Kan-Nib Linda Nb11, 12
und GPTV-Kan-Nib-blue Linda Nb36, 58, 60, 80, 88, DH59 Nb51, 93, 146, 156)
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der
deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 09. Mai 2000**

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 mutierte Gen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Nlb) des Potato Virus Y (PVY), zum Teil fusioniert mit dem „enhanced blue fluorescent protein“-Gen (EBFP)

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthalten DNA-Sequenzen für das mutierte Gen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Nlb) unter der Kontrolle des konstitutiven 35S-Promotors und des 35S-Terminators des CaMV.

Das natürliche Nlb-Gen besteht aus ca. 1560 nt. Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthalten ca. 1150 nt dieses Nlb-Gens, dessen Genprodukt am C-Terminus (betrifft ca. 400 nt) und am N-Terminus (betrifft 6 nt) Deletionen aufweist. Weiterhin liegt im Leserahmen eine interne Verschiebung vor, von der 14 Aminosäuren betroffen sind. Die Bildung eines funktionstüchtigen Genproduktes konnte nicht nachgewiesen werden, ist aber angesichts der deletierten Nukleinsäuresequenz des Nlb-Gens auch nicht zu erwarten. Eine Transkription der inserierten Nukleinsäuresequenz in den gentechnisch veränderten Pflanzen konnte mit Hilfe molekularbiologischer Methoden nachgewiesen werden. Das Transkript des mutierten PVY-Nlb-Gens soll den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen Resistenz gegen die Infektion durch PVY vermitteln. Voruntersuchungen haben jedoch gezeigt, dass verschiedene Linien gentechnisch veränderter Kartoffelpflanzen, die ein modifiziertes Nlb-Gen enthalten, anfällig, teilresistent oder resistent gegen eine Infektion mit PVY sein können. Ein Gefährdungspotential kann aus dieser Beobachtung nicht abgeleitet werden. Der Mechanismus ist bisher nicht aufgeklärt.

Im Fall der Infektion der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen durch homologe oder heterologe RNA-Viren und der sich daraus ergebenden Möglichkeit der Rekombination mit dem Transkript des PVY-Nlb-Gens tritt keine grundsätzlich andere Situation ein, als sie bereits jetzt in nicht gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen gegeben ist, die gleichzeitig mit PVY und anderen Viren infiziert sind. Insbesondere werden eventuelle Folgen einer Rekombination eingeschränkt durch Deletionen und einen „frameshift“ im modifizierten Nlb-Gen, die die Bildung einer funktionstüchtigen Polymerase verhindern.

Um einen Nachweis für ein Genprodukt des Nlb-Gens zu ermöglichen, wurde das modifizierte Nlb-Gen mit dem EBFP-Gen, einer Mutante des „Green Fluorescent Proteins“ (GFP) aus der Qualle *A. victoria* fusioniert. EBFP ist ein Reporter gen. Das exprimierte EBFP ist unter UV-Licht nachweisbar. Solche Reportergene werden vielfältig in Organismen und Zellkulturen eingesetzt. Es gibt keinen Hinweis dafür, dass die Genprodukte toxisch sind.

Über natürlicherweise infizierte Kartoffeln gelangen Genprodukte von Kartoffelviren in die Nahrungskette, ohne dass schädigende Wirkungen auf Tiere oder den Menschen beobachtet worden sind. Nach allgemeinem Kenntnisstand würden im Falle eines Verzehrs von Teilen der gentechnisch veränderten Kartoffeln diese Genprodukte im Verdauungstrakt von Mensch und Tier abgebaut.

b) Das *uidA*-Gen (=gus, β -Glucuronidase) aus *E. coli* mit Intron

Das *uidA*-Gen steht unter der Kontrolle des 35S-Promotors und -Terminators des CaMV. Um eine Genexpression in Bakterien zu verhindern, wurde das Gen mit einem Intron aus dem Gen ST-LS1 aus

der Kartoffel versehen. Es wurde als Reportergen zum histochemischen Nachweis einer erfolgreichen Transformation in das Kartoffelgenom eingeführt. Das Enzym β -Glucuronidase spaltet Glucuronide und wird in Geweben von Vertebraten und Invertebraten und auch in Bakterien gefunden. Auch Pflanzen besitzen eine geringe endogene β -Glucuronidase-Aktivität, die jedoch durch geeignete Verfahren unterdrückt werden kann. Nach der Zugabe eines entsprechenden Substrates kann die Enzymaktivität im Gewebe lichtmikroskopisch nachgewiesen werden. Es ist nicht zu erwarten, dass Pflanzen durch die Expression des *uidA*-Gens einen Selektionsvorteil erhalten.

c) Das *nptII*-Gen

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

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

d) Die kodierende Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase, *lacI*-Sequenzen

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden Vektoren verwendet, die von dem Plasmid pBIN19 abstammen. Bei diesen befindet sich die „multiple cloning site“ innerhalb der kodierenden Sequenz des α -Fragments der β -Galaktosidase aus *E. coli*.

Das native Enzym β -Galaktosidase spaltet β -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Lactose, die zu Galaktose und Glucose hydrolysiert wird. Als α -Teil werden die ersten 146 aminoterminalen Aminosäuren der β -Galaktosidase bezeichnet. Das α -Teil alleine ist enzymatisch nicht aktiv, eine Komplementation in geeigneten Wirten ist jedoch möglich.

Durch die Insertion der entsprechenden Kodierregionen in die „multiple cloning site“ wurde die für das α -Teil der β -Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so dass sie in dieser Form u. a. in *E. coli*-Bakterien nicht mehr für ein komplementationsfähiges α -Teil kodieren kann. Die unterbrochene Sequenz des α -Teils der β -Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein

funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert. Veränderungen in den gentechnisch veränderten Kartoffeln aufgrund des Vorhandenseins dieser Sequenz sind nicht zu erwarten.

In den gentechnisch veränderten Pflanzen befinden sich außerdem auch 5'- und 3'-Sequenzen des Repressor-Gens *lacI*. Diese 5'- und 3'-Sequenzen sind jedoch durch die *lacZ*- und M13 *ori*-Sequenzen voneinander getrennt. Eine Funktionsfähigkeit der *lacI*-Sequenzen in den gentechnisch veränderten Pflanzen ist nicht zu erwarten.

e) M13-Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen, die durch Transformation mit einem Derivat des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten zwei Fragmente aus M13mp19, nämlich ein 440 bp großes Fragment, das einen Teil eines offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfaßt sowie ein 433 bp großes Fragment, das den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält.

Sollte es in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer Transkription des Fragments des offenen Leserahmens des Strukturproteins kommen, würde dies nicht in einem funktionalen Protein resultieren, da das Fragment nur für 167 Aminosäuren von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Auswirkungen auf den Stoffwechsel der Pflanzen aufgrund der Anwesenheit dieses Fragments sind daher nicht zu erwarten.

Der Replikationsursprung von M13 bewirkt die Replikation des Phagen in *E. coli*, wenn *E. coli* mit M13-, f1- oder fd-Phagen infiziert ist. Eine Funktionsfähigkeit des Replikationsursprungs in Pflanzen ist nicht zu erwarten.

f) Das Fragment des *ocd*-Gens

Die Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten ein Fragment des *ocd*-Gens (Ornithin-Cyclodeaminase), welches sich zwischen dem 3'-Ende der translatierten Sequenz des *nptII*-Gens und der *nos*-Terminatorsequenz befindet. Da diese Sequenz als Teil der mRNA des *nptII*-Gens transkribiert wird, jedoch hinter dem Terminationskodon des *nptII*-Gens liegt, ist nicht zu erwarten, dass die Sequenz translatiert wird.

g) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der TL-DNA des Plasmids pTiBO542 aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stammes EHA 105 vorhandenen Helferplasmids pEHA 105, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, die Integration der zwischen den Borderregionen liegenden Gene in Chromosomen der Kartoffelpflanzen. Diese Borderregionen des Ti-Plasmids sind in den gentechnisch veränderten Pflanzen funktionslos und lassen keine Veränderungen in den Pflanzen erwarten.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten ins Genom integriert folgende Regulationssequenzen:

- 35S-Promotor und -Terminator des CaMV;
- Promotor und Terminator des *nos*-Gens aus *A. tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden DNA-Sequenzen für das mit der EBFP-Sequenz fusionierte mutierte Nlb-Gen und das *uidA*-Gen sowie die Expression des *nptII*-Gens in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1. (a), (b) und (c).

h) 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. Eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border wurde jedoch berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden.

Nach den dem Antrag zu entnehmenden Informationen können im vorliegenden Fall durch Integration von außerhalb der Borderregionen gelegenen DNA-Abschnitten folgende funktionale Einheiten in die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen übertragen worden sein:

- das *nptIII*-Gen (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- ein nichtfunktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- das Transposon IS1 innerhalb des *nptIII*-Gens;
- der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Da das *nptIII*-Gen (i) unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors steht, ist nicht davon auszugehen, dass es in Pflanzen exprimiert würde. Eine Auswirkung des Gens auf den pflanzlichen Stoffwechsel wäre auch im Falle einer Expression des Gens nicht zu erwarten.

Die Replikationsursprünge *oriV* (ii) bzw. *oriT* (iii) des Plasmids RK2 ermöglichen die Replikation des Plasmids in einem weiten Wirtsbereich Gram-negativer Bakterien bzw. seinen konjugativen Transfer, sofern die Mobilisierungsfunktionen durch ein Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden. Es gibt keine Hinweise dafür, dass die Replikationsursprünge von RK2, der Replikationsursprung von pMB1 (viii) oder die übrigen DNA-Abschnitte bakteriellen Ursprungs (iv, v, vi, vii) in höheren Pflanzen eine Funktion hätten. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (v) bzw. unterbrochen (vi).

i) 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 und wurden zuerst beim Mais nachgewiesen. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins zu machen. Jedoch liegen aus den bisherigen Versuchen mit den gentechnisch veränderten Pflanzen sowie aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Eine Expression des mit dem EBFP-Gen fusionierten, mutierten Nlb-Gens konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Das Wildtyp-Nlb-Gens ist ebenso wie das *uidA*-Gen in der Umwelt verbreitet und wird in der Regel von Menschen und Tieren über die Kartoffel aufgenommen. Für eine Allergenität der Genprodukte dieser Gene liegen keine Hinweise 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

Die Kartoffel befindet sich in Mitteleuropa seit mehreren hundert Jahren im landwirtschaftlichen Anbau. Eine Etablierung von Kartoffeln in natürlichen Ökosystemen wurde dabei in Europa nicht beobachtet. Kartoffeln werden zwar gelegentlich außerhalb kultivierter Flächen angetroffen, jedoch nur auf nichtnatürlichen Standorten wie Wegrändern und anderen Ruderalflächen. Da Kartoffeln nicht frostresistent sind, kommt es auch an solchen Standorten nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung. Infolge des Kartoffelanbaus können auf landwirtschaftlich genutzten Flächen in Abhängigkeit von der Höhe der Wintertemperaturen in der folgenden Kultur "Durchwuchskartoffeln" auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen hervorgegangen sind.

Es ist vorgesehen, die Knollen zu ernten und z. T. in einer gentechnischen Anlage zu analysieren oder zur Wiederauspflanzung im Folgejahr aufzubewahren. Übrig gebliebene Knollen sollen, z. B. durch Dämpfen, inaktiviert werden. Die auf dem Feld verbleibenden transgenen Pflanzenreste sollen zur Verrottung liegen bleiben. In den zwei Vegetationsperioden nach der Freisetzung sollen auf den Frei-

setzungsflächen keine Kartoffeln angebaut werden. Durchwuchs von Kartoffelpflanzen soll während dieser Zeit inaktiviert und entsorgt werden.

Kartoffelpflanzen verschiedener Sorten können blühen und Samen bilden. Es ist denkbar, dass die gentechnisch veränderten Kartoffeln durch Eintrag von fremden Kartoffelpollen befruchtet werden können, so dass eine Entstehung von Samen nicht vollständig auszuschließen, jedoch wenig wahrscheinlich ist. 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 von der Antragstellerin vorgesehene bzw. durch die gemäß der Nebenbestimmung II.9. durchzuführende Nachkontrolle erfasst. Ein Auffinden von eventuellen Durchwuchskartoffeln wird durch die vorgesehene Anbaupause von zwei Jahren und durch die durchzuführende Nachkontrolle ausreichend berücksichtigt und ist ohne Probleme möglich.

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

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

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.

Die von der Antragstellerin vorgesehene Einhaltung eines Mindestabstands von 20 m zwischen dem Freisetzungsort und dem nächsten Feld mit nichttransgenen Kartoffeln wird als ausreichend erachtet. Sollte es dennoch zu einer Pollenübertragung auf Kartoffelpflanzen kommen, die zur Erzeugung von Speisekartoffeln angebaut werden, so wäre dadurch nicht mit schädlichen Einwirkungen zu rechnen. Pflanzgut für den landwirtschaftlichen Anbau von Kartoffeln wird vegetativ vermehrt, 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 Be-

dingungen sehr gering. Im Rahmen einer Fruchtfolge würden solche Pflanzen durch die üblichen feldbaulichen Maßnahmen eliminiert werden. Selbst wenn Knollen solcher Pflanzen verzehrt würden, wäre dadurch mit keiner Gefährdung der Gesundheit zu rechnen, wie aus der unter III.1.2.1. vorgenommenen Bewertung hervorgeht.

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 mutierte Gen der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (N1b) des Potato Virus Y (PVY) Eine Übertragung des mutierten PVY-N1b-Gens in Mikroorganismen würde diesen keinen ersichtlichen Selektionsvorteil vermitteln. Ohne Selektionsdruck ist eine Ausbreitung dieses Gens unter Mikroorganismen nicht wahrscheinlich. Sollte es dennoch in den Mikroorganismen erhalten bleiben, ist wegen des mangelnden Selektionsvorteils nicht mit ökologischen Folgen zu rechnen.

Eine Rekombination des Translationsproduktes des mutierten PVY-N1b-Gens mit der RNA homologer oder heterologer Kartoffelviren in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen ist nicht auszuschließen. Solche Rekombinationen zwischen Wildtyp-Viren sind ein seltenes Ereignis. Es ist nicht zu erwarten, dass durch eine Rekombination zwischen der mutierten N1b-Nukleinsäuresequenz und einer entsprechenden Nukleinsäure eines Wildtyp-Kartoffelvirus neuartige Viren entstehen und verbreitet werden, weil die Mutationen im N1b-Gen die Bildung einer funktionstüchtigen Polymerase verhindern. Sie könnten also auch - mit weit höherer Wahrscheinlichkeit - durch horizontalen Gentransfer aus nicht gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in Mikroorganismen in der Umwelt gelangen.

b) Das *uidA*-Gen und das EBFP-Gen

Beide Gene dienen dem Nachweis von Genprodukten. Ein horizontaler Gentransfer von Pflanzen auf Mikroorganismen gilt als unwahrscheinlich. Erforderlich für eine Etablierung eines solchen Ereignisses ist in der Regel ein Selektionsdruck, der hier nicht gegeben ist.

c) Das *nptII*-Gen

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

Der Resistenzmechanismus der Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung kommt natürlicherweise bei Bodenmikroorganismen vor. APH(3')II-Enzyme wurden zudem in klinischen Isolaten von Menschen gefunden. Die weite Verbreitung von Genen, die eine Resistenz gegen Aminoglycosid-Antibiotika vermitteln, ist durch die häufige Anwendung dieser Antibiotika sowie dadurch zu erklären, dass diese Gene oft auf Plasmiden lokalisiert sind, wodurch eine effektive Übertragung durch Konjugation möglich ist. Selbst im Falle eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Kartoffeln auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

d) Weitere Sequenzen innerhalb der Borderregionen der zur Transformation verwendeten Plasmide

Das Gen für das α -Fragment der β -Galaktosidase ist unterbrochen, so dass kein funktionsfähiges Genprodukt gebildet werden kann. Dies wäre auch in Bakterien, die das Gen durch einen horizontalen Gentransfer erhalten würden, der Fall. Das gleiche gilt für die 3'- und 5'-Sequenzen des *lacI*-Gens.

Eine ähnliche Situation liegt bei dem Fragment des Gens für ein Strukturprotein des Phagen M13 und bei dem Fragment des *ocd*-Gens vor. Mit einer Funktionsfähigkeit dieser Fragmente in Bakterien ist nicht zu rechnen. Bei dem Fragment des *ocd*-Gens kommt noch hinzu, dass dieses Fragment wie unter III.1.2.1.(f) erläutert, wahrscheinlich nicht translatiert würde.

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln enthalten wahrscheinlich den Replikationsursprung von M13. M13 zählt zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen. Für diesen Replikationsursprung 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.

Die zur Regulation der übertragenen Gene in die Kartoffeln eingeführten Sequenzen stammen aus *A. tumefaciens*, und CaMV. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist anzumerken, dass *A. tumefaciens* in Böden weit verbreitet ist und eine Übertragung der entsprechenden Sequenzen aus *Agrobacterium* weitaus wahrscheinlicher ist, als eine Übertragung aus den gentechnisch veränderten Pflanzen. Die theoretische Möglichkeit eines Transfers der CaMV-Sequenzen aus den gentechnisch veränderten Pflanzen würde keine neue im Vergleich zur natürlicherweise vorliegenden Situation darstellen, weil CaMV als doppelsträngiges pflanzeninfizierendes DNA-Virus ohnehin in Pflanzen anzutreffen ist.

e) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel werden bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Border liegenden Sequenzen ins Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von Sequenzen jenseits der Border kann jedoch aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden. Im

vorliegenden Fall könnten durch Übertragung von außerhalb der Borderregionen gelegenen Sequenzen folgende DNA-Abschnitte in die gentechnisch veränderten Pflanzen integriert worden sein:

- (i) das *nptIII*-Gen aus *Streptococcus faecalis* (kodiert eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III) für Resistenz gegenüber Aminoglycosid-Antibiotika;
- (ii) der Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2;
- (iii) die *traF*-Region, enthaltend den *oriT* des Plasmids RK2;
- (iv) der *trfA*-Lokus des Plasmids RK2 (kodiert zwei Proteine, die für die Replikation des Plasmids erforderlich sind);
- (v) ein nichtfunktionales Fragment des *klaC*-Gens aus dem Plasmid RK2;
- (vi) das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 (durch Insertion der T-DNA-Region unterbrochen);
- (vii) das Transposon IS1 innerhalb des *nptIII*-Gens;
- (viii) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Das *nptIII*-Gen (i), das mit seinem eigenen Promotor in den gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten sein könnte, verleiht nach Literaturangaben nicht nur eine Resistenz gegen Kanamycin und Neomycin, sondern auch gegenüber dem Antibiotikum Amikacin. Amikacin ist in Deutschland nicht als Tierarzneimittel zugelassen, kann jedoch in der Humantherapie verwendet werden. Für die Humantherapie stellt es ein sogenanntes Reserveantibiotikum dar. Wegen des Einsatzes als Reserveantibiotikum und der damit einhergehenden nicht häufigen Anwendung sind Resistenzen gegenüber Amikacin bisher nicht weit verbreitet. Aufgrund der geringen Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzen-DNA auf Mikroorganismen und der Abwesenheit eines Selektionsdrucks auf den Freisetzungsfeldern ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die Präsenz dieses Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen wird.

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 (ii bis vi) ist somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weit aus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen. Einige der DNA-Abschnitte sind zudem unvollständig (v) bzw. unterbrochen (vi).

Das Insertionselement IS1 (vii) 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 bis zu > 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 vernachlässigbar gering.

Das pMB1-Replikon (viii) gehört zum Typ der ColE1-Plasmide, die einen auf einige Gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich haben. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterienspezies, wie z.B. *Serratia* oder *Salmonella*, replizieren. In den meisten Gram-negativen Bodenbakterien erfolgt keine Replikation. In Enterobakterien treten ColE1-Plasmide recht

häufig auf. Ein Gentransfer ausgehend von Enterobakterien auf andere Bakterien ist als weitaus wahrscheinlicher anzusehen als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Bakterien. Es ist deshalb nicht zu erwarten, dass die eventuelle Präsenz des Replikationsursprungs von pMB1 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurden sterile Kartoffelblätter bzw. -stengel mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen des binären Vektorplasmids enthielten. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Die regenerierten Pflanzen wurden durch Inkubation pflanzlicher Homogenate in geeigneten Nährmedien auf Freiheit von Agrobakterien untersucht. Nur Kartoffelpflanzen, die frei von Agrobakterien waren, wurden weiter verwendet.

Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorinduktion befähigt. In dem unwahrscheinlichen, aber theoretisch denkbaren Fall der Übertragung der eingeführten Fremdgene durch solche Agrobakterien in eine Zelle einer anderen Pflanze müsste diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen würden. Nur auf diese Weise könnten diese Gene an die Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden. Damit ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu rechnen.

Unter der Annahme, dass ein Vorhandensein geringer Mengen rekombinanter Agrobakterien in den gentechnisch veränderten Pflanzen nicht auszuschließen ist, ist ferner eine mögliche Übertragung der in den Agrobakterien enthaltenen binären Vektorplasmide durch Konjugation auf in der Umwelt vorkommende Wildtyp-Agrobakterien (*A. tumefaciens* oder *A. rhizogenes*) in Betracht zu ziehen, die dann wiederum möglicherweise die Fremdgene auf einzelne Zellen anderer Pflanzen übertragen könnten.

Im Fall einer Infektion und nachfolgenden Transformation durch Wildtyp-*A. tumefaciens* bzw. *A. rhizogenes* entsteht aus der transformierten Pflanzenzelle ein Tumor ("Wurzelhalsgalle" bzw. "hairy roots"). Die Bildung einer Pflanze aus einem solchen Tumor ist unter natürlichen Bedingungen nicht zu erwarten.

Zu berücksichtigen ist weiterhin eine Übertragung der eingeführten Gene aus Agrobakterien in andere Bodenbakterien. Auf die möglichen Auswirkungen wurde bereits unter III.1.2.4. eingegangen.