



Antrag 6786-01-0175

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum L.*) (Transformationsevents BG1BA-24, -31 und -32) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 11. Mai 2006

Hinweis zu diesem Dokument:

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
 - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
 - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
 - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
 - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
 - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
 - III.2 Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

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

(a) Die Gene für die plastidären Metabolitranslokatoren *gpt* und *ntt*

Zweck der Freisetzung ist die Überprüfung einer in Folge einer Transformation mit Genen kodierend für zwei plastidäre Metabolitranslokatoren (Glucose-6-Phosphat/Phosphat- sowie Nukleotid-Translokator) in Gewächshausversuchen festgestellten Steigerung des Ertrags und des Stärkegehalts der Knollen der erzeugten gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen gegenüber der gentechnisch nicht veränderten Ausgangssorte unter Freilandbedingungen. Diesbezüglich soll vor allem die Beeinflussung der Photoassimilatverteilung zwischen den Orten ihrer Synthese (*source*) und den Orten ihres Verbrauchs (*sink*) unter Freilandbedingungen untersucht werden, indem überprüft wird, ob sich der unter Gewächshausbedingungen gemachte Befund, dass sich die Expression der beiden plastidären Translokatoren in den Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffeln positiv auf die *sink*-Stärke der Pflanzen auswirkt, im Feldversuch bestätigt. Sollte dies der Fall sein, dann könnten weitere Versuche zur Knollenertragssteigerung durch eine gleichzeitige Erhöhung der *source*-Kapazität in den Pflanzen unternommen werden. Des Weiteren soll in dem geplanten Versuch überprüft werden, ob der erhöhte Knollenertrag der gentechnisch veränderten Pflanzen auf die artifiziellen Gewächshausbedingungen zurückzuführen ist und die gentechnisch veränderten Kartoffeln unter Freilandbedingungen möglicherweise keinen solchen Wachstumsvorteil bezüglich ihrer Knollen mehr aufweisen, oder ob im Gegenteil das Wachstum unter Feldbedingungen zu einem noch höheren Knollenfrischgewicht gegenüber der Ausgangssorte führt.

Die im Konstrukt pBinB33(Hyg)::GPT enthaltene Kodierregion des *gpt*-Gens, das für einen plastidären Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator kodiert, stammt aus der Erbse (*Pisum sativum*), wobei ihre Expression durch den B33-Promotor des Patatin Klasse I Gens aus *Solanum tuberosum* kontrolliert wird. Die Wahl des Promotors ermöglicht eine gewebspezifische Expression des Gens, da der B33-Promotor vornehmlich in den Knollen der Kartoffelpflanzen aktiv ist. Eine Expression im Sprossbereich ist darüber hinaus durch Saccharose induzierbar. Der Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator ist ein Antiporter, dessen physiologische Funktion hauptsächlich darin besteht, Glucose-6-Phosphat im Austausch gegen anorganisches Phosphat in die Plastiden heterotropher Gewebe zu importieren. Hier fungiert Glucose-6-Phosphat als Vorläufer für die energieabhängige Synthese von Stärke, wobei anorganisches Phosphat freigesetzt wird. Substrate des GPTs sind neben Glucose-6-Phosphat und anorganischem Phosphat auch Triosephosphat und 3-Phosphoglycerat, nicht aber andere Hexosephosphate wie Glucose-1-Phosphat oder Fructose-6-Phosphat.

Die im Konstrukt pBinB33(Kan)::NTT enthaltene Kodierregion des *ntt*-Gens, das für einen plastidären Nukleotid-Translokator kodiert, stammt aus *Arabidopsis thaliana*, wobei die Expression auch hier durch den B33-Promotor des Patatin Klasse I Gens aus *Solanum tuberosum* kontrolliert wird. Auch der Nukleotid-Translokator ist ein Antiporter, der die plastidäre Aufnahme von ATP im Austausch gegen ADP katalysiert und demzufolge auch als ATP/ADP-Translokator bezeichnet wird. Seine hauptsächliche Funktion ist die Versorgung von nicht-grünen Speicherplastiden mit ATP, das dort für die Stärkesynthese benötigt wird.

Zur Steuerung der Transkriptionstermination befindet sich in beiden Konstrukten der Terminator des *ocs* (Octopin-Synthase)-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* am 3'-Ende der Kodierregion des jeweiligen Metabolitranslokators.

Für die Freisetzung wurden drei Linien (BG1BA-24, -31 und -32) ausgewählt, bei denen mittels Northern Blot Analyse die Expression der beiden eingebrachten Metabolitranslokatoren gegenüber der Ausgangssorte nachgewiesen werden konnte. Unter Gewächshausbedingungen führte die Expression der beiden Gene *gpt* und *ntt*, zu denen auch Homologe in nicht

gentechnisch veränderten Kartoffelknollen existieren, in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer Erhöhung der Transportaktivitäten für Glucose-6-Phosphat und ATP, was wiederum in einer Knollenertragssteigerung sowie einer Erhöhung des Stärkegehalts in den Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen gegenüber der gentechnisch nicht veränderten Ausgangssorte resultierte. Abgesehen davon ergaben Beobachtungen im Gewächshaus keine phänotypischen Unterschiede zwischen den gentechnisch veränderten und den nicht gentechnisch veränderten Pflanzen in Hinblick auf das Wachstum, die Größe, die Blattmorphologie, die Blattfarbe und die Wurzelbildung. Auch biochemische Untersuchungen ergaben keine weiteren Auswirkungen auf die Photosynthese und den Gehalt an löslichen Zuckern.

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 grundsätzlich denkbar. Diesbezügliche Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sind jedoch weder zum Verzehr noch zur Verfütterung vorgesehen, und die Freisetzung findet auf einem umzäunten und gekennzeichneten Versuchsgelände statt, so dass keine Risiken für die Gesundheit von Tieren oder Menschen als Folge der Freisetzung zu erwarten sind.

(b) Das *hph*-Gen

Die mit dem Konstrukt pBinB33(Hyg)::GPT transformierten Pflanzen enthalten als Selektionsmarker ein *hph*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*. Die von dem *hph*-Gen kodierte Hygromycin-Phosphotransferase (HPT) inaktiviert durch Phosphorylierung spezifisch das Antibiotikum Hygromycin. Diese Substratspezifität begründet die Erwartung, dass bei fehlendem Substrat in den gentechnisch veränderten Pflanzen unter Freilandbedingungen keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen können. Überdies bietet dieses Gen den gentechnisch veränderten Pflanzen unter Freilandbedingungen keinen Selektionsvorteil, da Hygromycin im Boden nicht in höheren Konzentrationen vorliegt.

(c) Das *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-Phosphotrans-

ferase den gentechnisch veränderten Pflanzen im Freiland keinen Selektionsvorteil. Eine Toxizität des Enzyms für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder den Menschen liegt nicht vor.

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

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

(e) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

In der Regel wird bei Transformationen mit Hilfe von Agrobakterien nur die innerhalb der Borderregionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Über eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Borderregionen wurde jedoch berichtet.

Die verwendeten Transformationsplasmide pBinB33(Hyg)::GPT und pBinB33(Kan)::NTT leiten sich beide vom binären Vektor pBin19 ab und enthalten außerhalb der Borderregionen die folgenden genetischen Elemente:

- den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- die transponierbare Insertionssequenz IS1 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *traF*-Gens des Plasmids RP4 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *trfA*-Gen des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 aus *E. coli* (unterbrochen durch die T-DNA);
- den Replikationsursprung des Plasmids ColE1 (*ColE1 ori*) aus *E. coli*;
- das *npt III*-Gen aus *Streptococcus faecalis*.

Eine vom Antragsteller durchgeführte PCR-Analyse ergab, dass das *npt III*-Gen in zwei (Linie 24 und 32) von drei der zur Freisetzung beantragten Transformanten enthalten ist, was zu der Annahme führt, dass alle im Plasmid pBinB33(Hyg)::GPT bzw. pBinB33(Kan)::NTT enthaltenen Gene in die pflanzliche DNA integriert sein können. Da die Anwesenheit des *npt III*-Gens nur über einen PCR-Nachweis und nicht über eine Southern Blot Analyse geprüft wurde, kann auch für die Linie 31 nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass ein Teil des *npt III*-Gens, dessen Produkt eventuell noch Aktivität zeigen könnte, ins Pflanzengenom integriert ist. Deshalb geht die Risikobewertung aller drei Linien (24, 31 und 32) davon aus, dass alle außerhalb der Borderregionen liegenden Gene der beiden transformierten Vektoren 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.

(f) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Um-

gebung des Insertionsorts („Positionseffekt“). Unter Freilandbedingungen kann die Expressionsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, dass die Eigenschaften der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen wurden jedoch keine Beobachtungen gemacht, die auf ein solches Ereignis hindeuten.

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine mögliche Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die hier freizusetzenden gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften grundsätzlich nicht von nicht gentechnisch veränderten Pflanzen.

Es ist beim gegenwärtigen Kenntnisstand nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz eines Proteins sichere Vorhersagen über eine mögliche allergene Wirkung des Proteins abzuleiten. Aus zahlreichen Freisetzungen von Pflanzen, die das *hph*-Gen oder das *npt II*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebsspezifischer 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 in S1-Labore der Universität zu Köln (gentechnische Anlage 64-K-1.90/02) gebracht. Nicht benötigte Kartoffelknollen werden durch Autoklavieren 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 Freisetzungsfäche wird so gestaltet, dass es auf der jeweiligen Fläche zu einem Nach-

bau von Kartoffeln nach frühestens drei Jahren kommt. Innerhalb dieser zweijährigen Anbaupause ist laut Nebenbestimmung II.11. nach Beendigung der Freisetzung ein einjähriger Nachkontrollzeitraum für die Kontrolle auf Durchwuchskartoffeln vorgegeben, der jeweils um ein Jahr zu verlängern ist, wenn im Jahr des Beobachtungszeitraumes gentechnisch veränderte Durchwuchskartoffeln auftreten.

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.

Der unter Gewächshausbedingungen beobachtete erhöhte Knollenertrag der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen könnte sich aufgrund erhöhter Knollenzahl im Vergleich zur untransformierten Ausgangssorte in einem erhöhten Nachauflauf nach frostarmen Wintern auswirken. Auch unter Berücksichtigung dieses Faktors ist jedoch nicht davon auszugehen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Vergleich zu konventionellen Kulturkartoffeln veränderte pflanzenökologische Eigenschaften aufweisen und natürliche Ökosysteme besiedeln können. 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 sowohl Selbst- als auch Fremdbefruchtung statt. Innerhalb eines blühenden Kartoffelfeldes findet in erster Linie Selbstbefruchtung statt; eine Fremdbefruchtung ist hier selten und 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 Be-

dingungen sehr gering. Solche Pflanzen würden auf landwirtschaftlich genutzten Flächen im Rahmen einer Fruchtfolge durch die üblichen feldbaulichen Maßnahmen eliminiert werden.

III.1.2.4. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung der eingeführten Fremdgene von den gentechnisch veränderten Pflanzen über horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in den Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Beweise für eine unter natürlichen Bedingungen stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und ihrer Expression in Mikroorganismen liegen nicht vor. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen jedoch folgern, dass auch eine Übertragung pflanzlichen genetischen Materials auf Bodenbakterien prinzipiell möglich sein kann, wenngleich davon auszugehen ist, dass ein solcher Gentransfer ein sehr seltenes Ereignis darstellen würde.

Soweit anzunehmen ist, dass ein genetischer Austausch zwischen taxonomisch so weit voneinander entfernten Organismen wie Pflanzen und Bakterien tatsächlich stattfindet, wäre zu folgern, dass das Vorkommen eines solchen Austauschs von heterologem Erbmateriale allein betrachtet kein Sicherheitskriterium sein kann, da als Folge eines solchen Austauschs immer die Aufnahme von jedwedem heterologem Erbmateriale, also jedweder pflanzlicher DNA, möglich wäre.

(a) Die Gene für die plastidären Metabolitranslokatoren *gpt* und *ntt*

Das in dem Konstrukt pBinB33(Hyg)::GPT vorhandene *gpt* (Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Translokator)-Gen stammt aus der Erbse (*Pisum sativum*) und das in dem Konstrukt pBinB33(Kan)::NTT enthaltene *ntt* (Nukleotid-Translokator)-Gen stammt aus *Arabidopsis thaliana*; d. h. beide Gene kommen in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen.

(b) Die Antibiotika-Resistenzgene *hph* und *npt II*

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

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

Die durch die Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase II inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1. (c) bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringerer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es war somit zu prüfen, ob durch einen möglichen horizontalen Gentransfer des *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 die Gene *hph* und *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 ZKBS wurden das *hph*-Gen und 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 *npt III*

Das *aphA III* (= *npt III*)-Gen, welches das Enzym 3'-5'-Aminoglycosid-Phosphotransferase Typ III kodiert, wurde aus *Streptococcus faecalis* isoliert. Das Gen, das mit seinem eigenen Promotor in zwei (Linie 24 und 32) von drei der zur Freisetzung beantragten Transformanten nachweislich enthalten ist, 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, wird jedoch in der Humantherapie verwendet. Für den Einsatz in der Humantherapie stellt es ein wichtiges Reserveantibiotikum dar. Resistenzen gegenüber Amikacin sind bisher nicht weit verbreitet und eine weitere Verbreitung ist nicht erwünscht.

Das Wissenschaftliche Gremium der EFSA hat in seiner Stellungnahme vom 02. April 2004 festgestellt, dass Antibiotikum-Resistenzgene der Gruppe III, in die auch das *npt III*-Gen eingestuft wurde, angesichts ihrer gegenwärtigen Bedeutung in der klinischen Humantherapie aus Vorsorgeaspekten in Pflanzen, die für das Inverkehrbringen und für Freisetzungen vorgesehen sind, nicht mehr enthalten sein sollten.

Die Stellungnahme der EFSA wurde im Zusammenhang mit der Umsetzung des Artikels 4 Abs. 2 der Richtlinie 2001/18/EG erarbeitet. Danach müssen GVO, die Gene enthalten, die eine Resistenz gegen in der ärztlichen oder tierärztlichen Behandlung verwendete Antibiotika vermitteln, bei einer Umweltverträglichkeitsprüfung besonders berücksichtigt werden, und zwar im Hinblick auf die Identifizierung und schrittweise Einstellung der Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in GVO, die schädliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit oder die Umwelt haben können. 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 für Freisetzungen zugelassenen GVO bis zum 31. Dezember 2008 erfolgen.

Die ZKBS stellte zum vorliegenden Antrag fest, dass das Inverkehrbringen von gentechnisch veränderten Organismen, die das *aphA* III (= *npt* III)-Gen enthalten, auf Grund des Standes von Wissenschaft und Technik nicht mehr hingenommen werden kann. Sie wies aber auch darauf hin, dass für Freisetzungsversuche solche gentechnisch veränderten Organismen derzeit noch toleriert werden.

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen sollen nur auf einer begrenzten Fläche für die Dauer von zwei Vegetationsperioden (2006 und 2007) 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 Freisetzungsf lächen ist nicht davon auszugehen, dass die Präsenz des *npt* III-Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.

(d) Regulationssequenzen

Auch bei einer Übertragung der in den beiden Konstrukten verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *A. tumefaciens* und der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) selbst. *A. tumefaciens* ist in der Umwelt weit verbreitet, und die genannten Sequenzen befinden sich in Wildtyp-Agrobakterien auf Ti-Plasmiden, die durch Konjugation zwischen verschiedenen Rhizobiaceen ausgetauscht werden können.

(e) Sequenzen des *lacI*-Gens und des *lacZ*-Gens aus *E. coli*

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

(f) M13-Sequenzen

pBin19 und Derivate enthalten innerhalb der T-DNA zwei Abschnitte aus dem Phagen M13, nämlich einen 440 bp großen Abschnitt, der einen Teil des offenen Leserahmens eines Strukturproteins von M13 umfasst sowie einen 433 bp großen Abschnitt, der den Replikationsursprung des Phagen M13 enthält. Da der Phage M13 zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen gehört, ist für die genannten Nukleinsäureabschnitte somit die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch Übertragung zwischen Bakterien weitaus größer als die Wahrscheinlichkeit einer Verbreitung durch horizontalen Gentransfer von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf Mikroorganismen. Sollte es zu einer Expression des Genabschnitts für das Strukturprotein kommen, so würde dies nicht zu einem funktionsfähigen Protein führen, da der Abschnitt nur für 167 von insgesamt 423 Aminosäuren des kompletten Phagenproteins kodiert. Mit einer Funktionsfähigkeit dieses Teils des Strukturproteins in Bakterien ist nicht zu rechnen.

(g) Weitere außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln können folgende genetische Elemente enthalten, die auf den verwendeten pBin19 Derivaten außerhalb der Borderregionen liegen:

- den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli*;

- Nukleotide des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*;
- die transponierbare Insertionssequenz IS1 aus *E. coli*;
- Nukleotide des *traF*-Gens des Plasmids RP4 aus *E. coli*;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *trfA*-Gen des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das *tetA*-Gen des Plasmids RK2 aus *E. coli* (unterbrochen durch die T-DNA);
- den Replikationsursprung des Plasmids ColE1 (*ColE1 ori*) 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 unterbrochen oder unvollständig (*klaC*, *traF*, *tetA*).

Plasmide, die zum ColE1-Typ gehören, haben einen auf einige gram-negative Bakterien begrenzten Wirtsbereich. Im Wesentlichen kann das Replikon in *E. coli* und nahe verwandten Bakterienarten 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 ColE1 im Pflanzenchromosom zu einer Erhöhung der Gesamtfrequenz des horizontalen Gentransfers beiträgt.

Das 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 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.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen diente ein *Agrobacterium*-vermitteltes binäres Transformationssystem. Die Transformanten wurden auf Abwesenheit von Agrobakterien getestet. Es wurden nur solche Pflanzen weiterverwendet, die frei von Agrobakterien sind.

Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm GV2260 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 Plasmide 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.