



Antrag 6786-01-0079

Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.) (Nachkommen von je fünf unabhängigen Linien aus zwei Transformationsereignissen) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde, Berlin, den 21. April 1998

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 Gen für die zytosolische Fruktose-1,6-Bisphosphatase aus *Solanum tuberosum* in 'Antisense'-Orientierung sowie das Gen für die anorganische Pyrophosphatase aus *E. coli* in 'Sense'-Orientierung

Die in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthaltene Kodierregion für die zytosolische Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) unter der Kontrolle des CaMV-35S-Promotors wird konstitutiv, d. h. nicht gewebespezifisch, exprimiert. Die Kodierregion der FBPase wurde in umgekehrter Orientierung ('Antisense') bezogen auf den Promotor angeordnet. In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird dadurch die Bildung einer Antisense-RNA bewirkt, die das Transkript des endogenen FBPase-Gens inaktiviert und so die Bildung der FBPase verhindert. Durch Inhibierung der zytosolischen FBPase in den transgenen Kartoffelpflanzen kommt es zu einer Verminderung des Saccharosegehalts. Ein Anstieg des Gehalts an toxischen Verbindungen ist nicht zu erwarten.

Die in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen enthaltene Kodierregion für die anorganische Pyrophosphatase (PPase) unter der Kontrolle des Promotors des FBPase-Gens wird gewebespezifisch vornehmlich in photosynthetisch aktiven Mesophyllzellen exprimiert. Die Expression des PPase-Gens aus *E. coli* führt zur Bildung dieses Enzyms in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen. Durch Entfernung des zytoplasmatischen Pyrophosphates wird im Stoffwechsel der transgenen Kartoffelpflanzen bevorzugt Saccharose gebildet. Eine Überführung des löslichen Zuckers in sekundäre Pflanzenstoffe kann nicht ausgeschlossen werden. Es ist allerdings nicht zu erwarten, daß davon die Zusammensetzung der Kartoffelknollen betroffen ist.

Als Folge der gentechnischen Veränderungen wird die Saccharosebiosyntheseleistung in den transgenen Kartoffelpflanzen entweder durch die gezielte Ausschaltung der Expression der FBPase-Gens gemindert oder durch die Expression der heterologen PPase gesteigert. Die Knollen der transgenen Kartoffelpflanzen wurden nicht u. a. auf Veränderungen des Stärke- oder Saccharosegehalts im Vergleich zu nicht transgenen Kartoffelknollen untersucht. Jedoch ist aufgrund der Eigenschaften der durch die eingeführte DNA kodierten Enzyme zu vermuten, daß keine sicherheitsrelevanten Veränderungen stattgefunden haben.

Die geernteten Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen werden nach Versuchsende in eine entsprechende Anlage gebracht und sind nicht zum Verzehr oder zur Verfütterung vorgesehen. Selbst bei einem unbeabsichtigten Verzehr durch Tiere oder Menschen wären jedoch keine schädlichen Einwirkungen auf deren Gesundheit 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. Das in der Humanmedizin therapeutisch bedeutende Gentamicin und sonstige 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 Kartoffeln 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) 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 des PL3-Gens 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 wahrscheinlich 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.

(d) M13-Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten wahrscheinlich 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.

(e) Das Fragment des *ocd*-Gens

Die Pflanzen, die durch Transformation mit Derivaten des Vektors pBIN19 erzeugt wurden, enthalten wahrscheinlich 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.

(f) Bordersequenzen aus Ti-Plasmiden und Regulationssequenzen

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten Sequenzen der linken und der rechten Borderregion der TL-DNA des Plasmids pTiT37 aus *A. tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirkten, abhängig von den Genprodukten der *vir*-Region des in dem zur Transformation verwendeten *Agrobacterium*-Stamm vorhandenen Helferplasmids pGV2260, 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:

- Promotorregion des FBPase-Gens aus Kartoffeln,
- 35S-Promotor und -Terminator des Cauliflower mosaic virus (CaMV),
- Promotor und Terminator des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- Terminator des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden DNA-Sequenzen für die zytosolische Fruktose-1,6-Bisphosphatase aus Kartoffeln in Antisense-Orientierung sbzw. für die anorganische Pyrophosphatase aus *E. coli* in Sense-Orientierung sowie die Expression des

nptII-Gen in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Expression dieser Sequenzen in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) und (b).

(g) 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 Borderregionen wurde jedoch im Einzelfall berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden. In der Risikobewertung werden deshalb auch jene Bereiche der zur Transformation der Kartoffeln verwendeten

Vektoren berücksichtigt, die jenseits der T-DNA-Borderregionen lokalisiert sind. Hierbei handelt es sich insbesondere um folgende Sequenzen:

- (i) das *nptIII*-Gen (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 nicht-funktionales 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.

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).

(h) 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 Stärke der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation pflanzeneigener Gene am bzw. in der Nähe des Insertionsorts kommen. Beeinflussungen pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Vorgänge sind möglich. Während der bisherigen Arbeiten mit den gentechnisch veränderten Pflanzen im Gewächshaus und - bei einer der Linien - im Freiland 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 Freisetzungen im Ausland von Pflanzen, die das *nptII*-Gen unter der Kontrolle nicht-gewebespezifischer Promotoren exprimieren, keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

Die Expression der DNA-Sequenz für die zytosolische Fruktose-1,6-Bisphosphatase in Antisense-Orientierung führt dazu, daß das pflanzeigene Protein in geringerer Konzentration bzw. gar nicht auftritt. Für eine Allergenität dieses Proteins wie auch für die anorganische Pyrophosphatase 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 Ruderflächen. Da Kartoffeln nicht frostresistent sind, kommt es auch an solchen Standorten nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung.

Infolge Kartoffelanbaus können auf landwirtschaftlich genutzten Flächen „Durchwuchskartoffeln“ auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen hervorgegangen sind. Kartoffelknollen sind frostepfindlich. Ihre Überdauerung wird daher in erster Linie durch die Wintertemperaturen beeinflusst.

Die Wahrscheinlichkeit einer Überdauerung der gentechnisch veränderten Pflanzen durch nach der Ernte möglicherweise im Boden verbliebene Knollen wird durch die Maßnahmen gemäß der Nebenbestimmung II.7. minimiert. Um restliche im Boden verbliebene Knollen zu beseitigen, ist die Versuchsfläche im Anschluß an die Knollenernte sowie im Frühjahr des folgenden Jahres jeweils ca. 15 bis 20 cm tief aufzulockern. Dabei gefundene Knollen sind zu entsorgen.

Einige der freizusetzenden Kartoffelsorten blühen und bilden Samen, die selten unter Freilandbedingungen keimfähig sind. 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.7. durchzuführende Nachkontrolle erfaßt. Eine mögliche Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderung ist nicht wahrscheinlich. Während der Nachkontrolle sind auf den zu kontrollierenden Flächen keine Pflanzen oder nur solche Pflanzen anzubauen, welche die Nachkontrolle nicht behindern. Ein Auffinden von Durchwuchskartoffeln wird dadurch ohne Probleme möglich.

Aus den genannten Gründen ist daher weder eine Etablierung noch eine unkontrollierte 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 artifizierender 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 Abstands von 20 m zwischen dem Freisetzungsvorhaben und nächsten Kartoffelanbauten 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 Bedingungen 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 integriert in Chromosomen der Empfängerorganismen. Untersuchungen zur Transformationsfähigkeit von Bodenbakterien unter natürlichen Bedingungen lassen folgern, daß 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.

Das eingeführten Gene einschließlich der Regulationssequenzen stammen aus *Solanum tuberosum*, *E. coli* bzw. *Agrobacterium tumefaciens*, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Sie könnten also auch - mit weit höherer Wahrscheinlichkeit - durch horizontalen Gentransfer aus nicht gentechnisch veränderten Organismen in Mikroorganismen in der Umwelt gelangen.

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

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.(e) 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.

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 nicht-funktionales 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 Freisetzungsfleichen 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 weitaus 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 die Explantate der beiden Kartoffelsorten mit Agrobakterien inokuliert, welche die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen binärer Vektorplasmide enthielten. Nach erfolgter Transformation wurden die regenerierten Kartoffelpflanzen auf Freiheit von Agrobakterien getestet. 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 Agrobakterien, die aus den freigesetzten gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen stammen, in eine Zelle einer anderen Pflanze müßte diese Zelle spontan zu einer ganzen, fertilen Pflanze regenerieren, damit die Fremdgene in Keimzellen gelangen und so an die Nachkommen der Pflanze weitergegeben werden können. 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. rhizoge-*

nes) 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.