



**Antrag 6786-01-0041**

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten  
Tabakpflanzen (*Nicotiana tabacum L.*) (Nachkommen der Transformanten XynZ**

**Nr. 34 und XynZ Nr. 46) im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,**

**durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde,**

**Berlin, den 04. April 1996**

**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 Xylanase-Gen

Die gentechnisch veränderten Tabakpflanzen enthalten eine verkürzte Form des Xylanase-Gens *xynZ* aus *Clostridium thermocellum* unter der Kontrolle des 35S-Promotors des CaMV und der Octopin-Synthase-Terminationsregion von *Agrobacterium*. Das rekombinante *xynZ*-Gen wurde mit der Nukleinsäuresequenz für das Signalpeptid des Proteinase Inhibitors II der Kartoffel fusioniert, wodurch das Genprodukt in den Apoplasten transportiert wird.

Xylan ist ein Bestandteil der Hemicellulose pflanzlicher Zellwände. Es kommt besonders in Sekundärwänden vor sowie in Primärwänden von Monokotylen. In Primärwänden von Dikotylen ist Xylan mengenmäßig weniger bedeutend. Xylan ist aus 1,4- $\beta$ -Polyxylose aufgebaut, verzweigt und mit Arabinose, Glucuronsäure und Methylglucuronsäure substituiert. Der Abbau von Xylan erfolgt zunächst durch die Aktivität von Xylanasen, die die glycosidischen Bindungen zwischen nicht-substituierten Xylose-Resten hydrolysieren. Die dadurch entstehenden verzweigten Oligosaccharide werden dann durch andere Enzyme zu den entsprechenden Monomeren abgebaut. Xylanasen kommen bei Bakterien, Pilzen und auch Pflanzen vor. Sie werden auf der Basis von Sequenzhomologien der katalytischen Domänen in neun Familien (A bis H) eingeteilt. Die Familie F, zu der auch die Xylanase aus *C. thermocellum* gehört, umfaßt sowohl bakterielle als auch pilzliche Xylanasen. Die Xylanase aus *C. thermocellum* zeichnet sich dadurch aus, daß ihr Temperaturoptimum bei ca. 70°C liegt. Des Weiteren verfügt sie über eine hohe Substratspezifität für Xylan, da sie nicht Cellulose hydrolysiert, wie es bei anderen Xylanasen beobachtet wird.

Das vollständige *xynZ*-Gen aus *C. thermocellum* hat eine Länge von 2511 Nukleotiden. Deletionsanalysen haben jedoch ergeben, daß der C-terminale Bereich für die Xylanase-Aktivität ausreichend ist. Aus diesem Grund wurden zur Erzeugung des rekombinanten Xylanase-Gens die 3'-terminalen 1025 Bp des Gens mit den o.g. Regulationssequenzen und der Nukleinsäuresequenz für das Signalpeptid kombiniert und mittels *Agrobacterium* in Tabak übertragen. Durch den Transport in den Apoplasten wird die Xylanase aus der Protease-reichen intrazellulären Umgebung entfernt und somit vor Abbau geschützt.

Der Anteil der rekombinanten Xylanase in den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen beträgt nach Angaben des Antragstellers ca. 4% vom Gesamtprotein. Die Enzymaktivität und das Temperaturoptimum des rekombinanten Enzyms entsprechen dem von *C. thermocellum* gebildeten Enzym. In Gewächshausversuchen konnte trotz der Anwesenheit der Xylanase in den gentechnisch veränderten Pflanzen keine Veränderung des Pflanzenwachstums, der Pathogenanfälligkeit sowie der Zellwand-zusammensetzung festgestellt werden.

Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, daß sich unter Freilandbedingungen Auswirkungen der rekombinanten Xylanase auf die Pflanzen bemerkbar machen. Die Xylanase

XynZ zeichnet sich zwar durch ihr hohes Temperaturoptimum und ihre Substratspezifität aus, und weiterhin ist bei Dikotylen der Xylan-Anteil relativ gering; außerdem kommen Xylanasen auch natürlicherweise bei Pflanzen vor (Familie E Xylanasen). Andererseits besitzt die Xylanase XynZ auch bei 25°C noch eine Aktivität von ca. 20% der Maximalaktivität, und der Xylanase-Anteil ist in den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen besonders hoch. Es ist somit nicht auszuschließen, daß insbesondere bei höheren Außentemperaturen und starker Sonneneinstrahlung aufgrund der Aktivität der Xylanase eine leichte Veränderung der Zellwandzusammensetzung der gentechnisch veränderten Tabakpflanzen erfolgt. Die Folge wäre jedoch insbesondere unter den Bedingungen im Freiland eine Verminderung der Fitness der gentechnisch veränderten Pflanzen. Schädliche Auswirkungen für die Rechtsgüter des § 1 Nr. 1 GenTG lassen sich hieraus nicht ableiten.

(b) Das *nptII*-Gen

Das in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragene *nptII*-Gen kodiert das Enzym Neomycin-Phosphotransferase und 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 Tabakpflanzen 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  $\alpha$ -Teils der  $\beta$ -Galaktosidase, *lacI*-Sequenzen

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen wurde der Vektor pBIN19 verwendet, bei dem sich die „multiple cloning site“ innerhalb der kodierenden Sequenz des  $\alpha$ -Fragments der  $\beta$ -Galaktosidase aus *E. coli* befindet.

Das native Enzym  $\beta$ -Galaktosidase spaltet  $\beta$ -D-Galaktoside in Galaktose und die entsprechende Alkoholverbindung. Das physiologisch wichtigste Substrat ist Lactose, die zu Galaktose und Glucose hydrolysiert wird. Als  $\alpha$ -Teil werden die ersten 146 aminoterminalen Ami-

nosäuren der b-Galaktosidase bezeichnet. Das a-Teil alleine ist enzymatisch nicht aktiv, eine Komplementation in geeigneten Wirten ist jedoch möglich.

Durch die Insertion des Xylanase-Gens in die „multiple cloning site“ wurde die für das a-Teil der b-Galaktosidase kodierende Sequenz unterbrochen, so daß sie in dieser Form u. a. in *E. coli*-Bakterien nicht mehr für ein komplementationsfähiges a-Teil kodieren kann. Die unterbrochene Sequenz des a-Teils der b-Galaktosidase steht unter der Kontrolle eines bakteriellen Promotors. Ein funktionsfähiges Genprodukt wird durch diese Sequenz nicht kodiert. Veränderungen in den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen 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 wurden durch Transformation mit einem Derivat des Vektors pBIN19 erzeugt und 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 Tabakpflanzen 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

Des weiteren enthalten die Pflanzen wahrscheinlich ein Fragment des *ocd*-Gens (Ornithin-Cyclodeaminase), welches sich zwischen dem 3'-Ende der translatierten Sequenz des *nptII*-Gens und der NOS-Terminationssequenz 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 T-DNA des Plasmids pTiT37 aus *Agrobacterium tumefaciens*. Diese Sequenzen bewirken, abhängig von den Genprodukten der vir-Regionen des in dem zur Trans-

formation verwendeten *Agrobacterium*-Stammes vorhandenen Helferplasmids pGV2260, das nicht in die Pflanzen übertragen wurde, die Integration der zwischen den Borderregionen liegenden Gene in Chromosomen der Tabakpflanzen. Diese Borderregionen der Ti-Plasmide sind in den gentechnisch veränderten Pflanzen funktionslos und lassen keine Veränderungen in den Pflanzen erwarten.

Die gentechnisch veränderten Pflanzen enthalten ins Genom integriert jeweils folgende in Pflanzen funktionale Regulationssequenzen:

- den 35S-Promotor des Cauliflower mosaic virus (CaMV),
- den Promotor des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*,
- die Terminationsregionen des Nopalinsynthase-Gens und des Octopinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*.

Die Promotor- und Terminationssequenzen regeln die Expression der zwischen ihnen liegenden kodierenden Sequenzen des Xylanase-Gens und des *nptII*-Gens in den gentechnisch veränderten Pflanzen. Ausführungen zu den Auswirkungen der Bildung dieser Proteine in den Pflanzen finden sich unter III.1.2.1.(a) und (b).

(g) 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 wurde jedoch im Einzelfall berichtet und kann aufgrund der im Antrag enthaltenen Angaben nicht ausgeschlossen werden.

Nach den dem Antrag zu entnehmenden Informationen könnten im vorliegenden Fall durch Integration von außerhalb der Border gelegenen Sequenzen folgende DNA-Abschnitte in die gentechnisch veränderten Pflanzen integriert worden sein:

- (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 Insertionselement 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 daher 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 Xylanase-Ausbeute von den aufgrund der Untersuchungen unter Gewächshausbedingungen herrührenden Erwartungen abweicht. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten. Auch im Hinblick auf die übrigen übertragenen Eigenschaften kann aus einer veränderten Expressionsstärke kein Risiko für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren abgeleitet werden.

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

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, auf und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung 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 keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor.

### III.1.2.2. Bewertung der Fähigkeit der gentechnisch veränderten Pflanzen, im Freiland zu überdauern oder sich zu etablieren

*N. tabacum* zählt zu den einjährigen Pflanzen. Tabak ist frostempfindlich und kann Temperaturen unter  $-3^{\circ}\text{C}$  nur kurzfristig überstehen. Da vegetative Pflanzenteile durch Frost vernichtet werden, vermehrt sich *N. tabacum* in unseren Breitengraden ausschließlich über Samen. In Deutschland verunkrautet *N. tabacum* nicht, und eine Etablierung außerhalb landwirtschaftlicher Nutzflächen findet nicht statt.

Die Versuchsplanung sieht vor, daß die gentechnisch veränderten Organismen nicht als Samen, sondern als Pflanzen ausgebracht werden sollen und daß die Infloreszenzen vor Blühbeginn entfernt werden, so daß kein Pollen freigesetzt wird und es nicht zu einer Samenbildung an den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen kommen wird. Die Ernte der gentechnisch veränderten Tabakpflanzen soll von Hand durchgeführt werden. Das geerntete Pflanzenmaterial soll zum Teil für weitere Untersuchungen in eine gentechnische Anlage verbracht werden. Das restliche Material soll zerkleinert und innerhalb des Institutsgeländes auf einer gekennzeichneten Fläche kompostiert werden. Da im Laufe des Versuchs keine gentechnisch veränderten Samen auf die Freisetzungsf lächen gebracht werden oder dort entstehen, ist aufgrund der Frostempfindlichkeit der vegetativen Pflanzenteile nicht mit einem erneuten Aufwuchs in den Folgejahren zu rechnen. Trotzdem soll in der auf die Freisetzung folgenden Saison auf den Versuchsf lächen kein Tabak angebaut werden, und die Flächen sollen während zwei Jahren nach Beendigung der Freisetzung auf auflaufende Tabakpflanzen kontrolliert werden. Durchwuchspflanzen sollen ggf. entfernt werden.

Eine Überdauerung oder Etablierung der gentechnisch veränderten Tabakpflanzen ist somit nicht zu erwarten.

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

*N. tabacum* ist überwiegend selbstbefruchtend. Der Anteil der Fremdbefruchtung beträgt ca. 8% bis 10%. Die Fremdbestäubung erfolgt vornehmlich durch Insekten. Zu den natürlichen Verbreitungsgebieten von *Nicotiana* zählen Amerika, Australien, die pazifischen Inseln und - mit einer Art vertreten - Afrika. Als Kultur- und Zierpflanzen werden jedoch *N. tabacum* sowie andere *Nicotiana*-Arten auch in Deutschland angebaut. *N. rustica* tritt gelegentlich verwildert auf, wurde in der Umgebung von Gatersleben jedoch selten beobachtet. Unter natürlichen Bedingungen werden außerdem keine fertilen Hybride zwischen *N. tabacum* und *N. rustica* gebildet. Auch für die in Europa vorkommenden entfernter verwandten Wildarten *Solanum nigrum* und *Solanum dulcamara* wurden keine Kreuzungen mit *N. tabacum* beobachtet.

Der Antragsteller sieht vor, die Infloreszenzen vor Blühbeginn zu entfernen. Dies soll durch tägliches Begehen der Versuchsflächen durch fachkundiges Personal sichergestellt werden. Da zwischen dem Erscheinen der sichtbaren Blütenknospen und der Reifung der Blüten mehrere Tage liegen und eine Freisetzung von Pollen erst nach Öffnung der reifen Blüten zu erwarten ist, sind tägliche Kontrollen ausreichend, um sich bildende Blüten rechtzeitig erkennen und entfernen zu können. Es ist somit nicht zu erwarten, daß Pollen von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf andere Pflanzen übertragen werden können.

Um der Möglichkeit Rechnung zu tragen, daß Blüten eventuell nicht rechtzeitig entfernt werden könnten, hat die ZKBS in ihrer Stellungnahme einen Isolationsabstand von 200 m zu blühenden Tabakpflanzen empfohlen. In der Nebenbesimmung II.6. wird deshalb festgelegt, daß, falls die rechtzeitige Entfernung der Infloreszenzen nicht sichergestellt sein sollte, ein Isolationsabstand von 200 m zu blühenden Tabakpflanzen einzuhalten ist. Durch diese Maßnahme wird erreicht, daß eine Pollenausbreitung in jedem Fall hinreichend begrenzt ist. Selbst wenn entgegen der Erwartung Pollenübertragungen auf andere Pflanzen vorkommen sollten, wäre dies aufgrund der Eigenschaften der übertragenen Gene (s. Abschnitt III.1.2.1.) nicht mit einer Gefährdung für die Schutzgüter des § 1 Nr. 1 GenTG verbunden.

#### 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 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.

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.

Xylanasen sind bei Mikroorganismen weit verbreitet. Sie kommen insbesondere bei Bakterien und Pilzen vor, die pflanzliches Material als Nahrungsquelle nutzen. Eine Übertragung der rekombinanten Xylanase auf diese Mikroorganismen würde ihnen keine neuartigen Eigenschaften vermitteln. Die Xylanase XynZ hat aufgrund ihres Temperaturoptimums von ca. 70°C bei unseren klimatischen Verhältnissen nur eine geringe Aktivität und verleiht deswe-



gen den in Frage kommenden Mikroorganismen keinen bedeutenden Selektionsvorteil. Des weiteren ist ein Austausch von Xylanasen zwischen Mikroorganismen weitaus wahrscheinlicher als ein horizontaler Gentransfer von den gentechnisch veränderten Tabakpflanzen. Mit einer Funktionsfähigkeit des DNA-Abschnitts für das Signalpeptid des Proteinase-Inhibitors II der Kartoffel in Mikroorganismen ist ebenfalls nicht zu rechnen.

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 Tabakpflanzen auf Mikroorganismen würde somit die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht.

Das Gen für das a-Fragment der b-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 Tabakpflanzen 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 Tabakpflanzen eingeführten Sequenzen stammen aus *Agrobacterium tumefaciens* und CaMV. Bezüglich eines horizontalen Gentransfers dieser Sequenzen auf Mikroorganismen ist anzumerken, daß *Agrobacterium 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 diesen 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 der T-DNA 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 Insertionselement IS1 innerhalb des *nptIII*-Gens;
- (viii) der Replikationsursprung des Plasmids pMB1.

Für das *nptIII*-Gen (i) gilt wie für das *nptII*-Gen (siehe oben), daß der entsprechende Resistenzmechanismus in Bakterien weit verbreitet ist.

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.

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 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 Ursprungstransformanten, von denen die zur Freisetzung beantragten gentechnisch veränderten Pflanzen abstammen, wurden verwundete Blätter einer Sterilkultur von *N. tabacum* cv. Samsun mit Agrobakterien inokuliert, die die zu übertragenden Gene zwischen den Borderregionen eines binären Vektorplasmids enthielten. Der verwendete *Agrobacterium*-Stamm ist, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *Agrobacterium tumefaciens*, „disarmed“ („entwaffnet“), d. h. er ist nicht mehr zur Tumorinduktion befähigt. Nach erfolgter Transformation wurde zur Eliminierung der Agrobakterien eine Antibiotikabehandlung durchgeführt. Die freizusetzenden Pflanzen sind über Samen vermehrt worden. Auch durch diese Vermehrung über Saatgut wären die eingesetzten Agrobakterien aus den gentechnisch veränderten Pflanzen entfernt worden