



**Antrag 6786-01-0157**

**Zusammenfassung der Risikobewertung von gentechnisch veränderten Kartoffeln**

**(*Solanum tuberosum*; Sorte Desireé) B33-Apy1-RNAi 1331 (3 Linien)**

**im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,**

**durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde**

**Berlin, den 22. März 2005**

**Hinweis zu diesem Dokument:**

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

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

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

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

**(a) Das RNAi-Konstrukt des Apyrase-Gens aus *Solanum tuberosum***

In den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe eines RNAi-Konstrukts die Aktivität des kartoffeleigenen Enzyms Apyrase reduziert.

Apyrasen sind Enzyme, die ATP über ADP zu AMP umwandeln, ohne damit eine endergonische Reaktion anzutreiben. Diese Enzyme sind in Geweben von Tieren, Pflanzen (u. a. *Arabidopsis thaliana*, Leguminosen, Kartoffeln) und Pilzen nachgewiesen worden und haben offenbar überwiegend regulative Funktionen.

Doppel-Knockout-Mutationen beider Apyrase-Gene von *A. thaliana* führen durch Inhibition der Pollenkeimung zu männlich-sterilen Pflanzen. Apyrasen spielen eine Rolle bei der Bildung der Wurzelknöllchen von Leguminosen sowie vermutlich bei der Phosphataufnahme.

Für pflanzliche Apyrasen ist eine Regulation von Transportern, die unter anderem den Fremdstofftransport aus der Pflanzenzelle erleichtern, gezeigt worden. Bei der Hemmung der Apyrase durch spezifische Hemmstoffe steigt die Empfindlichkeit der Pflanzen gegenüber verschiedenen Herbiziden sowie die Konzentration applizierter Herbizide in den Pflanzen. Eine Überexpression der Apyrase psNTP9 aus *Pisum sativum* in *A. thaliana* erhöht die Resistenz der Pflanzen gegenüber Herbiziden und Phytohormonen.

Die Apyrase-Aktivität in Kartoffelknollen ist sehr hoch und wahrscheinlich im Zellwandbereich lokalisiert. Es wird vermutet, dass die Apyrase-Aktivität zusammen mit anderen Enzymen, die das ATP/ADP/AMP-Verhältnis beeinflussen, eine regulierende Wirkung auf die Stärkebiosynthese in den Kartoffelknollen hat.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die Aktivität der Apyrase in den Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen mit Hilfe eines RNAi-Konstrukts reduziert. Durch das RNAi-Konstrukt wird die RNA eines Teils des Apyrase-Gens so in Sense- und Antisense-Orientierung kodiert, dass Sense- und Antisense-RNA durch eine hinreichend lange Zwischensequenz (RNA des Pdk-Introns aus *Flaveria trinervia*) getrennt sind. Die Synthese der RNAi erfolgt im vorliegenden Fall unter der Kontrolle des B33-Promotors spezifisch in den Kartoffelknollen. Der Sense- und der Antisense-Anteil der RNAi bilden einen Doppelstrang, dessen Einzelstränge durch eine Haarnadelschleife verbunden sind. Der RNA-Doppelstrang wird in der Pflanzenzelle von spezifischen Enzymen erkannt und in kleine Fragmente zerlegt. Diese binden an die mRNA des betreffenden Gens (Apyrase-Gen) und vermitteln den Abbau dieser RNA durch die gleichen Enzyme.

Die zur Freisetzung ausgewählten Transformanten weisen eine um ca. 25% reduzierte Apyrase-Aktivität in den Knollen auf. Unter Gewächshausbedingungen war der Knollenertrag von zwei der drei Transformanten im Vergleich zur Ausgangssorte deutlich erhöht.

Eine Veränderung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in Bezug auf mögliche toxische oder gesundheitsschädliche Inhaltsstoffe ist aufgrund der gezeigten Auswirkungen der Apyraseaktivität auf unterschiedliche Stoffwechselforgänge möglich. Diesbezügliche Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sollen jedoch in dem beantragten Freisetzungsvorhaben nicht zur Herstellung von Lebensmitteln oder Futtermitteln verwendet werden und die Freisetzung findet auf einem abgegrenzten und gekennzeichneten Versuchsgelände statt, so dass im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung keine Risiken für die Gesundheit von Tieren oder Menschen als Folge der Freisetzung zu erwarten sind.

#### (b) Das *npII*-Gen

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

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

zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme. In der Tiermedizin finden Kanamycin und Neomycin jedoch breite Anwendung.

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

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

Das zur Transformation der Kartoffelpflanzen eingesetzte Plasmid ist ein Derivat des binären Vektors pART27, der vollständig sequenziert wurde.

Innerhalb der T-DNA enthält das Plasmid neben dem Apyrase-RNAi-Konstrukt und der Expressionskassette des *nptII*-Gens Nukleotide des T7-Promotors, des SP6-Promotors und des *lac*-Operons bzw. *lacZ*-Gens aus *E. coli*. Diese sind in Pflanzen nicht funktional.

(d) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

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

Das Transformationsplasmid B33-Apy1-RNAi ist ein Derivat des Vektors pART27. Dieser enthält außerhalb der Borderregionen

- den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli*, der für triparentale Paarungen benötigt wird;
- das Insertionselement IS1 aus *E. coli*;
- das *traJ*-Gen aus dem Plasmid RK2, das als Regulationsfaktor die Expression der Mobilisierungsgene für die Bakterienkonjugation beeinflusst;
- einen DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologien zum *trfA*-Gen des Plasmids RK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- eine zu pBIN19 (EMBL PPU09365), Position 4561 bis 5601, homologe Sequenz;
- den ColE1-Replikationsursprung des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das Tn7-Transposon mit dem *aadA*-Gen, das Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin verleiht;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*.

Eine von der Antragstellerin durchgeführte PCR-Analyse ergab, dass die pBIN19-Sequenz (EMBL PPU09365) in allen drei Transformanten enthalten ist. Diese Sequenz ist als „shows similarity to tetA GenBank Accession Number L13842“ annotiert. Der Teil der Sequenz L13842, der die Homologie zum *tetA*-Gen enthält umfaßt 42 Nukleotide (Nukleotid-Position 1- 42) und ist in dem Vektor pART27 nicht enthalten, so dass dieser keine Tetrazyklinresistenz vermitteln kann. Für die Positionen 233 bis 1327 von L13842, die zu pART27 Position 6511 bis 7606 (Minusstrang) homolog sind, ist überwiegend keine Funktion bekannt und kein offenes Leseraster annotiert. Die gentechnisch veränderten Kartoffeln enthalten daher kein Tetrazyklinresistenzgen.

Die Antragstellerin hat mit den zur Freisetzung beantragten Kartoffellinien auch eine PCR-Reaktion mit Primern durchgeführt, die spezifisch für das *aadA*-Gen sind. Dabei zeigte sich bei allen drei Transformanten ein positives Ergebnis.

Für die übrigen, außerhalb der Borderregionen liegenden Sequenzen wurde kein Nachweis ihrer An- bzw. Abwesenheit in den gentechnisch veränderten Pflanzen durchgeführt. Der Risikoabschätzung wird daher zugrunde gelegt, dass sie in den Pflanzen enthalten 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.

(e) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

Die Expressionsstärke von Genen, die mittels gentechnischer Methoden in das Genom von Pflanzen integriert werden, ist abhängig vom Insertionsort im Chromosom bzw. von der Umgebung des Insertionsorts („Positionseffekt“). Unter Freilandbedingungen kann die Expressionsstärke zudem durch Umwelteinflüsse, z. B. durch die Temperatur, beeinflusst werden. Im vorliegenden Fall könnte dies dazu führen, dass die Eigenschaften der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Freiland nicht in gleichem Maße verändert sind wie unter Klimakammer- oder Gewächshausbedingungen. Risiken für die Umwelt oder die Gesundheit von Menschen oder Tieren sind daraus nicht abzuleiten.

Durch die Insertion der Fremdgene kann es zu Beeinflussungen der Expression oder Regulation 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 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 zu machen. Aus zahlreichen Freisetzung von Pflanzen, die das *npII*-Gen unter der Kontrolle nicht gewebespezifischer Promotoren exprimieren, liegen jedoch keine Hinweise auf eine erhöhte Allergenität der Pflanzen vor. Pollen von Kartoffelpflanzen wird ohnehin nur in geringem Umfang durch den Wind verbreitet und spielt als Auslöser von Pollenallergien generell keine nennenswerte Rolle.

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

Kartoffeln befinden sich in Mitteleuropa seit mehreren hundert Jahren im landwirtschaftlichen Anbau. Auf landwirtschaftlich genutzten Flächen können in Abhängigkeit von den Temperaturen im Winter nach Kartoffelanbau im Folgejahr Durchwuchskartoffeln auftreten, die aus nach der Ernte im Boden verbliebenen Knollen oder Samen hervorgegangen sind. Eine Etablierung von Kartoffeln in natürlichen Ökosystemen wurde jedoch in Europa nicht beobachtet, da Kartoffeln gegenüber Wildpflanzen konkurrenzschwach und außerdem nicht

frostresistent sind. Kartoffeln werden zwar gelegentlich außerhalb kultivierter Flächen angetroffen, jedoch nur auf nicht-natürlichen Standorten wie Wegrändern und anderen Ruderalflächen. Auch an solchen Standorten kommt es wegen der fehlenden Frosthärte der Kulturkartoffeln nicht zu einer dauerhaften Ansiedlung.

Die Knollen der gentechnisch veränderten Kartoffeln werden nach der Ernte gewogen und für weitere Untersuchungen oder als Rückstellproben in eine gentechnische Anlage gebracht. Nicht benötigte Kartoffelknollen werden durch Dämpfen inaktiviert. Das Kartoffelkraut bleibt zur Verrottung auf der Versuchsfläche liegen oder wird durch Dämpfen vernichtet.

Nach der Ernte ist vorgesehen, die Versuchsfläche flach zu eggen, um sie einzuebnen. Die Fruchtfolge auf der Versuchsfläche wird so gestaltet, dass nach der Freisetzung gentechnisch veränderter Kartoffeln auf einer Fläche für mindestens zwei Vegetationsperioden keine Kartoffeln angebaut werden. In dem auf die Freisetzung folgenden Jahr wird die Fläche auf Durchwuchskartoffeln kontrolliert. Die Kontrolle erfolgt so lange, bis auf der Fläche, auf der gentechnisch veränderte Kartoffeln angebaut wurden, für eine Vegetationsperiode keine Kartoffelpflanzen mehr festgestellt werden. Danach wird auf der Fläche mindestens eine weitere Vegetationsperiode lang kein Kartoffelanbau vorgenommen.

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.

Unter Gewächshausbedingungen wiesen zwei der drei Transformanten im Vergleich zur Ausgangssorte einen erhöhten Knollenertrag auf. Der Knollenertrag unterliegt jedoch auch bei konventionellen Kartoffelpflanzen in Abhängigkeit von der Sorte und den Umweltbedingungen erheblichen Schwankungen, ohne dass daraus eine veränderte Konkurrenzfähigkeit gegenüber Wildpflanzen oder eine gesteigerte Invasivität resultiert.

Auch unter Berücksichtigung eines möglicherweise erhöhten Knollenertrags ist nicht davon auszugehen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Vergleich zu konventionellen Kulturkartoffeln veränderte pflanzensoziologische Eigenschaften aufweisen und natürliche Ökosysteme besiedeln können. Selbst wenn es zu einer Vertragung von Beeren, Samen oder Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen durch Tiere kommen würde, was unwahrscheinlich ist, wäre daher keine Etablierung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in der Umwelt zu erwarten.

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

Versuche zur Kreuzung von Kartoffeln mit in Mitteleuropa vorkommenden Solanaceen waren erfolglos. Unter Freilandbedingungen fand keine Einkreuzung von gentechnisch veränderten Kartoffeln in *Solanum nigrum* (Schwarzer Nachtschatten) statt. Auch nach künstlicher Pollenübertragung auf *S. nigrum* wurden keine lebensfähigen Samen erhalten. Eine Regeneration einiger Hybriden, die sich allerdings als steril erwiesen, war nur mit Hilfe artifizieller Methoden ("embryo rescue") unter Bedingungen möglich, die in der Natur nicht auftreten. Kartoffeln und *Solanum dulcamara* (Bittersüßer Nachtschatten) erwiesen sich als streng bilateral inkompatible Arten; bei Kreuzungsversuchen kam es nicht zu einer Befruchtung der Samenanlagen. Auch mit der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) ist die Kartoffel nicht kreuzbar. Die Vermehrung von Kartoffeln erfolgt in der landwirtschaftlichen Praxis vegetativ über Knollen.

Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen auf andere Kartoffelpflanzen eingegangen. Pollen von

Kartoffelpflanzen können durch Insekten oder durch den Wind übertragen werden. Eine Übertragung durch den Wind geschieht jedoch nur über kurze Entfernungen. Bei Kartoffeln findet in erster Linie Selbstbefruchtung statt, eine Fremdbefruchtung bereits innerhalb eines blühenden Kartoffelfeldes ist selten. Sie geschieht am ehesten zwischen benachbarten Pflanzen.

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 aufzulaufen würden, ist, wie weiter oben bereits ausgeführt wurde, unter den gegebenen klimatischen Bedingungen 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) Das RNAi-Konstrukt des Apyrasegens aus der Kartoffel

Die in dem Konstrukt vorhandenen Sequenzen des Apyrasegens stammen aus der Kartoffel, kommen also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen. Dieses gilt auch für die Sequenz des Pdk-Introns aus *Flaveria trinervia*. Es ist auch nicht zu erwarten, dass das RNAi-Konstrukt im Fall eines horizontalen Gentransfers in Mikroorganismen in diesen eine Funktion hätte.

##### (b) Das *npII*-Gen

Die durch die Neomycin-Phosphotransferase inaktivierten Antibiotika sind, wie unter Punkt III.1.2.1. bereits dargestellt, in der Humanmedizin nur von geringerer Bedeutung, werden in der Tiermedizin jedoch vielfältig angewendet. Es war somit zu prüfen, ob durch einen möglichen horizontalen Gentransfer des *npII*-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 „GMO-Panel“ der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat das *npII*-Gen in die Gruppe derjenigen Gene eingeordnet, für die bezüglich der Sicherheit kein Grund besteht, ihre Verwendung zu verbieten oder einzuschränken, und zwar weder für Feldversuche noch zum Zweck des Inverkehrbringens. Von der ZKBS wurde das *npII*-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) Nukleotide des *lacZ*-Gens aus *E. coli*

Das *lacZ*-Gen stammt aus *E. coli* und ist daher in der Umwelt weit verbreitet. Von der Anwesenheit von Teilen des *lacZ*-Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen ist daher kein Gefährdungspotential zu erwarten.

(d) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln können folgende genetische Elemente enthalten, die auf dem verwendeten Transformationsplasmid außerhalb der Borderregionen liegen:

- den *oriT* des Plasmids RP4 aus *E. coli*, der für triparentale Paarungen benötigt wird;
- das Insertionselement IS1 aus *E. coli*;
- das *traJ*-Gen aus dem Plasmid RK2, das als Regulationsfaktor die Expression der Mobilisierungsgene für die Bakterienkonjugation beeinflusst;
- einen DNA-Abschnitt mit Sequenzhomologien zum *trfA*-Gen des Plasmids RK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*;
- eine zu pBIN19 (EMBL PPU09365), Position 4561 bis 5601, homologe Sequenz;
- den ColE1-Replikationsursprung des Plasmids RK2 aus *E. coli*;
- das Tn7-Transposon mit dem *aadA*-Gen, das Resistenz gegen die Antibiotika Streptomycin und Spectinomycin verleiht;
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids RK2 aus *E. coli*.

Das *aadA*(Strep/SpecR)-Gen stammt aus dem Plasmid R538-1 von *E. coli* und kodiert für eine Streptomycin-Adenyltransferase. Streptomycin und Spectinomycin werden nur begrenzt in der Humanmedizin eingesetzt, besitzen aber durchaus noch für die Behandlung der Tuberkulose (Streptomycin) oder der Gonorrhoe (Spectinomycin) nennenswerte humanmedizinische Bedeutung. Bakterien mit einer Resistenz gegenüber Streptomycin sind

in der Umwelt verbreitet. Das *aadA*-Gen wurde daher von der ZKBS in die Gruppe II der Antibiotika-Resistenzgene eingestuft, die (a) in Mikroorganismen verbreitet sind und (b) deren relevante Antibiotika nur noch in Teilbereichen der Human- bzw. Veterinärmedizin therapeutische Anwendung finden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass - wenn überhaupt - das Vorhandensein dieser Antibiotika-Resistenzgene im Genom transgener Pflanzen nur sehr geringe Auswirkung auf die Verbreitung dieser Antibiotika-Resistenzgene in der Umwelt zur Folge hat. Das Wissenschaftliche Gremium für gentechnisch veränderte Organismen (GMO-Panel) der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) hat in seinem Gutachten über die Verwendung von Antibiotikaresistenzgenen als Markergene in gentechnisch veränderten Pflanzen vom 2. April 2004 das *aadA*-Gen in die Gruppe derjenigen Gene eingeordnet, die auf experimentelle Freilandversuche beschränkt werden und nicht in gentechnisch veränderten Pflanzen vorliegen sollten, die in Verkehr gebracht werden sollen.

Die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen sollen nur auf einer begrenzten Fläche für einen begrenzten Zeitraum 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 Freisetzungsfeldern wäre nicht davon auszugehen, dass die Präsenz des *aadA*-Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus bei Mikroorganismen führen würde.

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 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 extrem 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 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.

Für die zu pBIN19 (EMBL PPU09365), Position 4561 bis 5601, homologe Sequenz wurde gezeigt, dass sie kein Tetrazyklinresistenzgen enthält.