



Antrag 6786-01-0186

**Zusammenfassung der Risikobewertung gentechnisch veränderten Kartoffel
(*Solanum tuberosum*) EH92-527-1 mit verändertem Kohlenhydratmetabolismus
im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens,
durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde**

Berlin, den 25. Mai 2007

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 Fragment der kodierenden Region eines Kartoffel-Stärkesynthasegens („granule bound starch synthase“, GBSS) in antisense-Orientierung

Das Fragment der kodierenden Region eines Kartoffel-Stärkesynthasegens („granule bound starch synthase“, GBSS) in antisense-Orientierung wird unter der Kontrolle des kartoffeleigenen *gbss*-Promotors vorwiegend in den Kartoffelknollen exprimiert. In den gentechnisch veränderten Pflanzen wird durch die gentechnische Veränderung bewirkt, dass das endogene Transkript des *gbss*-Gens inaktiviert wird und so die Bildung des Enzyms GBSS verhindert wird.

Infolge der Abnahme an GBSS-Protein wird in den Knollen eine Stärke mit einem geringeren Amyloseanteil synthetisiert („Amylopektin-Stärke“). Die Reduktion des Amyloseanteils wurde von der Antragstellerin durch Jodfärbung der Stärkekörner und spektrophotometrisch bestimmt.

Die gentechnisch veränderten Kartoffeln sollen im Rahmen des zur Genehmigung beantragten Freisetzungsvorhabens nicht zur Herstellung von Lebensmitteln oder Futtermitteln verwendet werden. Gefahren für die Gesundheit von Menschen und Tieren oder für die Umwelt sind im Rahmen der beabsichtigten Versuchsdurchführung durch die Veränderung der Zusammensetzung der Stärke in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen nicht zu erwarten. Neue Proteine werden infolge dieser gentechnischen Veränderung in den Pflanzen nicht gebildet.

- (b) Das *nptII*-Gen

Das *nptII*-Gen kodiert für eine Neomycin-Phosphotransferase. Es wurde als Markergen zur Selektion transformierter Pflanzenzellen in die gentechnisch veränderten Pflanzen übertragen.

Die Neomycin-Phosphotransferase ist eine Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II (APH(3')II), welche die ATP-abhängige Phosphorylierung der 3'-Hydroxygruppe 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.

Aufgrund der Substratspezifität der Neomycin-Phosphotransferase ist davon auszugehen, dass unter Freilandbedingungen in den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen bei fehlendem Substrat keine neuen Stoffwechselprodukte entstehen. Eine Toxizität des Enzyms für Pflanzen, Tiere, Mikroorganismen oder den Menschen ist nicht beschrieben.

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

Das zur Transformation verwendete Plasmid pHoxwG enthält innerhalb der T-DNA neben den Expressionskassetten des *nptII*-Gens und des *gbss*-Genfragments Fragmente des Vektors M13mp19 mit Polylinkersequenzen sowie Fragmente aus dem Plasmid pJRD184. Diese Sequenzen 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 Border-Regionen liegende DNA ins Pflanzengenom integriert. Eine Übertragung von DNA-Abschnitten jenseits der Border ist jedoch beschrieben.

Das Plasmid pHoxwG ist ein Derivat des Vektors pBIN19. Dieser enthält außerhalb der Border-Regionen:

- das *aphAIII* (= *nptIII*)-Gen aus *Streptococcus faecalis* (= *Enterococcus faecalis*), unterbrochen durch das Transposon *is1*, jedoch funktionsfähig in prokaryoten Systemen,
- das *tetA*-Gen des Plasmids pRK2, unterbrochen durch die T-DNA,
- das *trfA*-Gen des Plasmids pRK2 für die Replikation in *E. coli* und in *A. tumefaciens*,
- ein Fragment des *klaC*-Gens aus *Klebsiella aerogenes*.
- ein *traF*-Fragment, welches den *oriT* des Plasmids RP4 umfasst, aus *E. coli*,
- den Replikationsursprung *oriV* des Plasmids pRK2,
- den Replikationsursprung der pUC-Vektoren (*ColE1 ori*) aus *E. coli*.

Die Kartoffellinie EH92-527-1 wurde mittels PCR und Southern Blot-Analyse auf Anwesenheit von Vektor-„Backbone“-Sequenzen untersucht. Dabei wurden keine Vektorsequenzen außerhalb der T-DNA nachgewiesen.

(e) Positionseffekte und Kontextänderungen; Allergenität

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

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

Bewegliche genetische Elemente (transponierbare Elemente), die durch Transposition im Genom Effekte auf am Zielort vorhandene Pflanzengene ausüben können, kommen natürlicherweise in Pflanzen vor. Inaktivierungen von Genen bzw. Änderungen der Regulation von Genen treten auch durch eine Reihe weiterer natürlicher Vorgänge auf, z. B. Punktmutationen, Deletionen oder Translokationen, und werden üblicherweise in der Pflanzenzüchtung genutzt. Eine Beeinflussung pflanzlicher Stoffwechselwege durch solche Ereignisse ist daher jederzeit auch in nicht gentechnisch veränderten Pflanzen möglich. Insofern unterscheiden sich die gentechnisch veränderten Pflanzen in ihren diesbezüglichen Eigenschaften nicht grundsätzlich 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. Es ist im Rahmen des zur Genehmigung beantragten Freisetzungsvorhabens nicht vorgesehen, die gentechnisch veränderten Kartoffeln als Lebensmittel oder Futtermittel zu verwenden. Pollen von Kartoffelpflanzen wird 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 Tempera-

turen 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 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 Versuchspflanzen sollen maschinell geerntet, in geschlossene und gekennzeichnete Behälter verpackt und für anschließende Untersuchungen oder zur Lagerung in entsprechende S1-Anlagen gebracht werden. Überschüssiges Knollenmaterial, das nicht zur Wiederauspflanzung verwendet werden soll, wird durch geeignete Methoden, z. B. Fermentation in einer Biogasanlage, inaktiviert. Das Kartoffelkraut soll zum Verrotten auf den Freisetzungsf lächen verbleiben.

Kartoffelpflanzen können blühen und Beeren bilden. Dass unter den mitteleuropäischen Klimabedingungen Kartoffelsamen überwintern, und dass aus ihnen Pflanzen aufwachsen, ist jedoch nicht wahrscheinlich. Es ist vorgesehen, die oberirdischen Teile der Kartoffelpflanzen vor der Ernte mechanisch oder chemisch abzutöten. Dadurch wird einem Heranreifen von Samen entgegengewirkt. Sollten Knollen oder Samen im Boden verbleiben, würden aus diesen aufwachsende Pflanzen durch die Nachkontrolle erfasst. Die Fruchtfolge wird so gestaltet, dass es auf den einzelnen Freisetzungsf lächen im folgenden Jahr nicht zu einem Nachbau von Kartoffeln kommt. Falls aus bei der Ernte nicht erfassten Knollen oder aus Samen gentechnisch veränderte Kartoffelpflanzen auflaufen, können diese erkannt und durch in der Landwirtschaft übliche Maßnahmen inaktiviert werden. In diesem Fall wird die Nachkontrolle verlängert und die Freisetzungsf läche ein weiteres Jahr auf Durchwuchs kontrolliert. Während der Nachkontrolle nach Beendigung der Freisetzung sind auf den zu kontrollierenden Flächen keine Pflanzen oder nur solche Pflanzen anzubauen, welche die Nachkontrolle nicht behindern.

In bisherigen Versuchen der Antragstellerin zeigten die gentechnisch veränderten Kartoffellinien keine signifikanten Habitusveränderungen. Pflanzenwachstum und Ertrag wichen nicht signifikant von konventionellen Vergleichslinien ab. Bei Versuchen zur Frosttoleranz mit Kartoffeln der Linie EH92-527-1 wurde festgestellt, dass die gentechnisch veränderten Kartoffeln und Vergleichssorten vergleichbare Überlebensraten aufwiesen. Selbst wenn es zu einer Veränderung der Frostempfindlichkeit der Knollen als Folge der gentechnischen Veränderung gekommen wäre, wäre dies durch die vorgesehene Anbaupause für Kartoffeln, die durchzuführende Nachkontrolle und durch die vorgesehenen Isolationsmaßnahmen ausreichend berücksichtigt.

Es ist nicht davon auszugehen, dass die gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen im Vergleich zu konventionellen Kulturkartoffeln veränderte pflanzenökologische Eigenschaften aufweisen und natürliche Ökosysteme besiedeln können. Selbst wenn es zu einer Vertragung von Beeren, Samen oder Knollen der gentechnisch veränderten Pflanzen durch Tiere käme, wäre daher eine Etablierung der gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen in der Umwelt 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

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.

Im Folgenden wird daher nur auf eine mögliche Pollenübertragung von den gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen auf andere Kartoffelpflanzen eingegangen. Die Vermehrung von Kartoffeln erfolgt in der landwirtschaftlichen Praxis vegetativ über Knollen. Pollen von Kartoffelpflanzen können durch Insekten oder durch den Wind übertragen werden. Eine Übertragung durch Wind erfolgt jedoch nur über kurze Entfernungen.

Die zur Freisetzung vorgesehenen gentechnisch veränderten Kartoffelpflanzen zeigten in bisherigen Versuchen keine signifikanten Habitusveränderungen gegenüber konventionellen Vergleichslinien. Der in dem zur Genehmigung beantragten Versuch vorgesehene Abstand von mindestens 10 m zwischen den Freisetzungsflächen und landwirtschaftlichen Nutzflächen mit nicht gentechnisch veränderten Kartoffeln wird als ausreichend angesehen. Sollte es dennoch zu einer Pollenübertragung auf Kartoffelpflanzen kommen, so wäre 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, ist, wie weiter oben bereits ausgeführt, 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 durch horizontalen Gentransfer auf Mikroorganismen

Die eingeführten Sequenzen sind stabil in die Chromosomen der Empfängerorganismen integriert. Nachweise für eine unter natürlichen Bedingungen stattfindende Übertragung genetischer Information aus Pflanzen und deren 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 stattfinden kann, 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 heterologen Erbmaterial, also jedweder pflanzlichen DNA, möglich wäre.

- (a) Das Fragment der kodierenden Region eines Kartoffel-Stärkesynthasegens („granule bound starch synthase“, GBSS)

Das Genfragment stammt aus Kartoffeln, kommt also in der Umwelt ohnehin häufig vor. Ein horizontaler Gentransfer in Mikroorganismen könnte daher mit weit höherer Wahrscheinlichkeit aus nicht gentechnisch veränderten Organismen erfolgen.

(b) Das *nptII*-Gen

Der Resistenzmechanismus der Inaktivierung von Aminoglycosid-Antibiotika durch Phosphorylierung wurde bei Mikroorganismen in verschiedenen Umweltmedien nachgewiesen. 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 zwischen Mikroorganismen durch Konjugation möglich ist.

Selbst im unwahrscheinlichen Fall eines horizontalen Gentransfers von den gentechnisch veränderten Kartoffeln auf Mikroorganismen würde die Gesamtfrequenz dieses Resistenzmechanismus nicht erkennbar erhöht. Eine Beeinträchtigung des therapeutischen Einsatzes der betroffenen Antibiotika durch das Vorhandensein des *nptII*-Gens in den gentechnisch veränderten Kartoffeln ist nicht zu erwarten.

(c) Sequenzen aus M13mp19 und pJRD184

Das Transformationsplasmid pHoxwG enthält innerhalb der T-DNA Fragmente des Vektors M13mp19 mit Polylinkersequenzen. Vom Klonierungsvektor pJRD184 sind ebenfalls DNA-Fragmente mit Klonierungssequenzen vorhanden. Der Phage M13 zählt zu den F-spezifischen *E. coli*-Phagen. Die M13mp19-Polylinkersequenzen dienen in Verbindung mit den pJRD184-Klonierungssequenzen der Integration von Nukleotidsequenzen in den Vektor. Für die prokaryotischen DNA-Fragmente ist 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.

(d) Regulationssequenzen

Bei einer Übertragung der in dem Konstrukt verwendeten Regulationssequenzen ist eine Erhöhung der Gesamtfrequenz der entsprechenden DNA-Abschnitte nicht zu befürchten. Diese Regulationssequenzen stammen aus *A. tumefaciens* und der Kartoffel. *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 Rhizobiacen ausgetauscht werden können.

(e) Außerhalb der T-DNA gelegene Sequenzen

Die Kartoffellinie EH92-527-1 wurde mittels PCR und Southern Blot-Analyse auf Anwesenheit von Vektor-„Backbone“-Sequenzen untersucht. Es wurden keine Vektorsequenzen außerhalb der T-DNA nachgewiesen.

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

Zur Erzeugung der gentechnisch veränderten Pflanzen diente ein *Agrobacterium*-vermitteltes binäres Transformationssystem. Es wurde gezeigt, dass die zur Freisetzung vorgesehenen Linien keine Backbone-Sequenzen des zur Transformation verwendeten Vektors enthalten. Es ist daher davon auszugehen, dass die Pflanzen frei von den zur Transformation verwendeten Agrobakterien sind.

Die verwendeten *Agrobacterium*-Stämme sind, im Gegensatz zu den weit verbreiteten Wildformen von *A. tumefaciens*, "disarmed" ("entwaffnet"), d. h. sie sind 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, wäre 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.