

Antibiotikaresistenz-Marker in gentechnisch veränderten (GV) Nutzpflanzen

- *Was sind Antibiotikaresistenz-Marker und warum werden sie eingesetzt?*
- *Die regulatorischen Rahmenbedingungen für die Sicherheitsbewertung von GV Nutzpflanzen*
- *Risikobewertung der Antibiotikaresistenz-Gene in GV Nutzpflanzen*
- *Gibt es Alternativen und können diese Gene wieder entfernt werden?*

Die Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen als Marker-Gene bei der Entwicklung von gentechnisch veränderten (GV) Nutzpflanzen hat in der Öffentlichkeit beträchtliche Bedenken ausgelöst. Diese Informationsschrift gibt einen Überblick darüber, was dies für Gene sind und warum sie eingesetzt werden, wie die Sicherheit von GM Nutzpflanzen reguliert wird und ob es Alternativen zur Verwendung dieser Gene gibt. Ziel dieser Informationsschrift ist es, ausgewogene Informationen bereitzustellen und die öffentliche Debatte zu fördern. Diese Informationsschrift resultiert aus den miteinander verknüpften Beiträgen von Wissenschaftlern, Vertretern von Industrie, Regierungs-Organisationen und anderen Organisationen aus ganz Europa. Der Zweck dieser Schrift ist, Informationen zur Verfügung zu stellen; sie repräsentiert nicht die Ansichten oder Politik der Europäischen Föderation Biotechnologie oder einer anderen Gruppe.

Einführung

Die Kombination von Antibiotikaresistenz-Genen und Antibiotika ist generell ein wichtiges Werkzeug in der Gentechnik; dies gilt insbesondere für die Pflanzen-Biotechnologie. Eine Schlüsselaufgabe in der Gentechnik ist die Identifizierung und Selektion derjenigen Zellen, in die ein neues Gen eingefügt wurde. Antibiotikaresistenz-Gene versetzen Zellen in die Lage, selektiv bestimmte Antibiotika zu inaktivieren und schützen sie als Konsequenz daraus gegen diese Antibiotika. Ein Antibiotikaresistenz-Gen kann daher genutzt werden, um ein anderes Gen zu „etikettieren“, das eine interessierende Eigenschaft trägt. In der Praxis wird das Antibiotikaresistenz-Gen mit dem Gen, das die erwünschte Eigenschaft trägt, vor der Einführung in die Empfängerzelle - ob Bakterie, Hefe, tierischen oder pflanzlichen Ursprungs - verknüpft. Diese Zellen werden dann in Gegenwart des Antibiotikums inkubiert. Die einzigen Zellen, die sich unter diesen Bedingungen vermehren können, sind diejenigen, die das Antibiotikaresistenz-Gen, verbunden mit dem Gen für die gewünschte Eigenschaft, enthalten.

Die Identifizierung der „transgenen Zellen“ wäre ohne diesen Selektionsprozess äußerst langwierig, wenn nicht unmöglich, da nur ein sehr geringer Teil der Zellpopulation die eingefügten Gene einbaut (eine von mehreren

Tausend Zellen) und auf die eigentlich interessierende Eigenschaft meist nicht so einfach getestet werden kann. In der Gentechnik ist der Selektionsprozess eine Notwendigkeit. Dies ist der Grund, warum Antibiotikaresistenz-Gene in den vergangenen Jahren in vielen verschiedenen Gebieten der Biotechnologie breite Verwendung gefunden haben.

Neuere Genehmigungen der Kommerzialisierung von GV Nutzpflanzen, die Antibiotikaresistenz-Marker enthalten, haben in Europa Bedenken hinsichtlich eines Risikos der Verbreitung von Antibiotikaresistenz-Genen unter zuvor anfälligen Mikroorganismen hervorgerufen; diese könnten dadurch resistent gegen die verwendeten Antibiotika werden. Die diesbezüglichen öffentlichen Bedenken sind weit verbreitet und das Thema wird wiederholt von den Medien aufgebracht. Als Konsequenz daraus haben Regierungen in der Europäischen Union ein „auslaufen lassen“ von GV Nutzpflanzen, die Antibiotikaresistenz-Marker enthalten, empfohlen - im Gegensatz zu den Empfehlungen mehrerer nationaler und europäischer wissenschaftlicher Komitees.

Was sind Antibiotikaresistenz-Marker und warum werden sie eingesetzt

Antibiotika und Antibiotikaresistenz in der Natur Bakterien sind Mikroorganismen, die überall in der Umwelt sowie in Pflanzen, Tieren und Menschen vorkommen. Wir sind ihnen permanent ausgesetzt und nehmen sie zum Beispiel mit unserer Nahrung auf. Mikroorganismen, die dasselbe Habitat bevölkern, stehen im Wettbewerb um Nährstoffe. Einige haben die Fähigkeit zur Antibiotika-Produktion entwickelt, möglicherweise, um ihre Wettbewerber zu eliminieren. Antibiotika inhibieren das Zellwachstum, indem sie essentielle Stoffwechselprozesse blockieren. Bakterien-Stämme, die ein bestimmtes Antibiotikum produzieren, müssen daher, um sich vor einer Selbstzerstörung zu schützen, selbst resistent gegen dieses Antibiotikum sein. Im evolutionären Wettlauf der Mikroorganismen wird der Produktion neuer Antibiotika daher von der Entwicklung neuer Resistenzmechanismen begleitet, dies sowohl bei den produzierenden als auch bei den Ziel-Organismen. Es gibt in der Natur eine breite Palette von Antibiotika. Ziel-Organismen werden häufig dadurch resistent, dass sie Resistenz-Gene erwerben, die bereits in dem umgebenden Bakterien-Pool vorkommen. Dies wird durch die Tatsache erleichtert, dass

EUROPÄISCHE FÖDERATION
BIOTECHNOLOGIE

EFFB
ARBEITSGRUPPE FÜR DIE
ÖFFENTLICHE
AKZEPTANZ DER BIOTECHNOLOGIE

Information

Für weitere Auskünfte über die Informationsschriften und andere Veröffentlichungen sowie die Tätigkeitsbereiche der Arbeitsgruppe für die Öffentliche Akzeptanz der Biotechnologie der Europäischen Föderation Biotechnologie, wenden Sie sich bitte an:

Prof Dr Richard Braun (*Vorsitzender*)
Bio-Link
Postfach 208
CH-3000 Bern 11
Tel & fax: +41 31 8320000
Email: rdbraun@bluewin.ch

Dr. David J Bennett (*Sekretär*)
Secretariat, EFB, Task Group on Public Perceptions of Biotechnology
Oude Delft 60
NL-2611 CD Delft
Tel: +31 15 2127800
Fax: +31 15 2127111
Email: david.bennett@efbpublic.org
<http://efbweb.org/ppb>

© Copyright EFB Task Group on Public Perceptions of Biotechnology, 2001.

Diese Informationsschrift dient Informationszwecken und gibt nicht die Ansichten der Europäischen Föderation Biotechnologie oder einer anderen Institution wieder. Sie darf nur zu Forschungs- und Lehrzwecken vervielfältigt werden und muß in diesem Fall eine entsprechende Erwähnung des Urhebers und einen diesem Abschnitt entsprechenden Hinweis bezüglich der Kopierrechte enthalten. Zu anderen Zwecken darf die Publikation auch nicht ausschnittsweise ohne die Erlaubnis des Urhebers vervielfältigt werden.

Die Arbeitsgruppe dankt der Europäischen Kommission, Generaldirektion Forschung, für die gewährte Unterstützung und Finanzierung dieser und anderer Ausgaben.



Informationsschrift

10

September 2001

Übersetzung des englischen
Originaltextes

selbst unterschiedlichste Bakterien spezifische Mechanismen entwickelt haben, um einander Resistenzgene auszutauschen. Die Anwesenheit eines Antibiotikums bedeutet einen Vorteil für ein resistentes Bakterium; daher nimmt unter diesen Bedingungen die Resistenz-Entwicklung und -Verbreitung zu.

Die Entdeckung der Wirkung von Antibiotika Anfang des 20. Jahrhunderts hatte einen enormen Einfluß auf die Medizin. Allerdings hat die Nutzung von Antibiotika durch den Menschen deren weltweite Verbreitung drastisch beschleunigt und als Konsequenz daraus auch die Verbreitung resistenter Mikroorganismen gefördert. Gesteigerte Verwendung von Antibiotika in der klinischen und in der Veterinärmedizin ist die Hauptursache für das zunehmende Auftreten von Antibiotika-Resistenzen in Bakterien. Darüber hinaus wurden und werden Antibiotika extensiv als Tierfutter-Zusatz verwendet, was eine Selektion resistenter Bakterien in gesunden Tieren verursacht hat. Zudem wurden Antibiotika verbreitet auf Nutzpflanzen, Obstplantagen, Weinreben etc. gesprüht, um diese vor Krankheitserregern zu schützen.

Heute ist die Resistenz gegenüber Antibiotika so weit verbreitet, dass einige Antibiotika der ersten Generation nicht mehr verwendbar sind. Multiple Antibiotika-Resistenz bei pathogenen Stämmen von *Staphylococcus* und *Mycobacterium tuberculosis*, besonders in Krankenhäusern, veranlasst Mediziner zu besonderer Sorge.

In Relation zur gesamten Antibiotika-Verwendung wird die Bedeutung der Nutzung von Antibiotika-Resistenzmarkern in transgenen Pflanzen in einem Zitat aus der belgischen Internetseite zur Biologischen Sicherheit („Belgium Biosafety Server“) beispielsweise so eingeschätzt: „Ein solches Szenario verdreht das Gesamtbild des Antibiotika-Missbrauchs, indem es einen sehr kleinen Aspekt der Problematik des Managements der Antibiotika-Nutzung hervorhebt. Desweiteren ist ein solches „modisches“ Szenario letztlich gefährlich für das Gesundheitswesen, da es das Bild von einem einzelnen Baum hervorruft, der den Wald verdeckt - zumindest in der öffentlichen Wahrnehmung. Auf der anderen Seite ist es politisch und technisch einfacher, die Verwendung dieser Antibiotikaresistenz-Marker in transgenen Pflanzen auf Basis des Vorsorgeprinzips zu verbieten, als den Futtermittelmarkt zu regulieren und die landwirtschaftlichen Praktiken zu kontrollieren“ (http://biosafety.ihe.be/ARGMO/GMO_Plants.html)

Antibiotikaresistenz-Marker als Werkzeuge in der Pflanzen-Biotechnologie

Seit Mitte der 80er Jahre sind moderne Methoden in der Biotechnologie entwickelt worden, um Nutzpflanzen durch die Einführung von genetischem Material mit vorteilhaften Eigenschaften zu verbessern.

Es werden zwei Typen von Antibiotikaresistenz-Marker (ARM)-Genen in transgenen Pflanzen verwendet.

1 Gene, die durch bakterielle Promotoren gesteuert werden. Diese Gene wurden im ersten Stadium des Zusammenbaus von DNA-Stücken, die für den Transfer in Pflanzenzellen bestimmt waren, verwendet. Der Zweck dieser Gene war, auf die Amplifikation dieser DNA-Konstrukte in den Empfänger-Bakterien hin zu selektionieren. Zu dieser Kategorie gehört das Gen, das Resistenz gegen Ampicillin verleiht.

Gentechnisch veränderte Pflanzen, die diese Gene enthalten, stammen aus der ersten Generation dieser Technologie; heutige Technologien ermöglichen die Entfernung dieser Gene vor Beginn des Pflanzen-Transformationsprozesses.

2 Gene, die eine Selektion derjenigen Pflanzenzellen erlauben, die das Stück DNA aufgenommen haben, welches die gewünschte Eigenschaft trägt. Das Einbringen eines Gens in eine Pflanzenzelle ist ein sehr ineffizienter Prozess. Nur wenige Tausend der vielen Millionen verwendeter Zellen nehmen normalerweise das gewünschte Gen auf. Der Transfer eines Antibiotikaresistenz-Markergens zusammen mit dem interessierenden Gen ermöglicht, dass die wenigen Zellen selektioniert werden, die beide Gene aufgenommen haben, und daher in Anwesenheit des entsprechenden Antibiotikums im Wachstumsmedium überleben und sich vermehren können. Ausgehend von diesen Zellen werden dann gentechnisch veränderte Pflanzen herangezogen und der Marker wird nicht länger benötigt.

Die für die Entwicklung einer gentechnisch veränderten Nutzpflanze mit einer neuen Eigenschaft benötigte Zeit beträgt normalerweise mehr als 10 Jahre. Sicherheitsaspekte werden auf jeder Stufe der Produktentwicklung beachtet. Dies beginnt mit der Auswahl der geeigneten Proteine und Gene, die in die Pflanze eingebaut werden sollen, gefolgt von Experimenten, um den möglichen Einfluß des Verzehrs der GV Nutzpflanzen auf die menschliche Gesundheit zu bewerten und dann mehrjährigen Feldversuchen, um potentielle Einflüsse dieser gentechnisch veränderten Pflanzen auf die Umwelt zu untersuchen.

Die bei der Entwicklung gentechnisch veränderter Nutzpflanzen verwendeten Antibiotikaresistenz-Marker wurden von Wissenschaftlern nach verschiedenen Sicherheits-Kriterien ausgewählt. Diese beinhalten, dass die Markergene in der natürlichen Mikroorganismen-Population häufig vorkommen (die meisten wurden aus im menschlichen Darm allgemein verbreiteten Bakterien isoliert) und dass sie Resistenz nur gegenüber einer engen Auswahl spezifischer Antibiotika bewirken, die in der Human- und Veterinärmedizin nur begrenzt Anwendung finden.

Der am meisten verwendete Antibiotikaresistenz-Marker für die Selektion transformierter Pflanzenzellen ist das *nptII*-Gen, auch *aph(3⁺)-II* genannt, das Resistenz gegenüber den Antibiotika Neomycin und Kanamycin verleiht. Dieses Gen ist in 10 der 14 GV Pflanzen mit Antibiotikaresistenz-Markergenen enthalten, die in der EU zur Vermarktung eingereicht sind. Es wurde beispielsweise verwendet, um Tomaten mit verzögerter Reife sowie Herbizid-tolerante und Insekten-geschützte Mais- und Baumwollsorten zu entwickeln. Die Wahl, dieses Antibiotikaresistenz-Markergens zu verwenden wurde dadurch angetrieben, dass die Antibiotika Kanamycin und Neomycin in der medizinischen Therapie unbedeutend sind und dadurch, dass durchschnittlich 20-40% der natürlich im menschlichen oder tierischen Verdauungstrakt vorkommenden Bakterien bereits resistent gegen Kanamycin sind. Kanamycin/Neomycin-resistente Bakterien sind in der Natur ubiquitär verbreitet; ihr Anteil hängt von der Quelle ab, aus der die Bakterien isoliert werden - der höchste wurde in Schweinedung gefunden.

Regulatorische Rahmenbedingungen und regulatorische Entscheidungen in den USA und in der EU

Bevor eine gentechnisch veränderte Nutzpflanze auf dem Markt eingeführt werden kann, müssen in der Europäischen Union mehrere Genehmigungen nach nationaler und europäischer Gesetzgebung eingeholt werden. Die beiden für die Kommerzialisierung wichtigsten Teile der Gesetzgebung sind die Richtlinie 90/220/EEC zur Freisetzung in die Umwelt und Markteinführung von GVOs und die Regularie 258/97 zu neuartigen Nahrungsmitteln und Nahrungsinhaltsstoffen. Die hauptsächlichen Entscheidungsprozesse sind unter beiden Teilen der Gesetzgebung sehr ähnlich. Der Entscheidungsprozess zu GV Nutzpflanzen nach der Richtlinie 90/20/EEC ist in der Abbildung 1 dargestellt.

Die Debatte über die Sicherheit von Antibiotikaresistenz-Markern begann in der EU 1996 während des Genehmigungsverfahrens für den von Novartis entwickelten Mais CG176, der ein Gen für Ampicillin-Resistenz enthält. Das britische Beratungs-Komitee zu neuartigen Nahrungsmitteln und Prozessen („Advisory Committee On Novel Foods and Processes“ ACNFP) spielte eine Hauptrolle darin, Argumenten gegen die Genehmigung dieses Produkts stattzugeben, da das Gen, wenn es in Bakterien exprimiert wird, Resistenz gegen das klinisch wichtige Antibiotikum Ampicillin verleiht. Basierend auf den in Großbritannien geäußerten Bedenken erhielt der Antrag der Kommission zur Markteinführung dieses Produktes nicht die erforderliche Mehrheit der Mitgliedsstaaten und beim Rat der Umweltminister. Da die Mitgliedsstaaten darin scheiterten, eine Entscheidung zu treffen, autorisierte die Kommission das Produkt nach zusätzlicher Beurteilung durch drei wissenschaftliche Komitees der Kommission zur Markteinführung. Jedes der drei Komitees kam zu dem Schluß, dass mit der Kommerzialisierung dieses Produktes keine signifikanten Bedenken hinsichtlich Nahrungsmitteln, Futtermitteln oder der Umwelt verbunden seien. Die französische Regierung genehmigte den Anbau des Produktes unter der Bedingung des Monitorings einer gesteigerten Insekten-Resistenz und eines potentiellen Transfers des Ampicillin-Resistenzgens auf Mikroorganismen. Die bisherigen Monitoring-Versuche scheiterten, da Ampicillin-Resistenz in bis zu 10% der Bakterien in der Umwelt vorkommt und ein Gen, das potentiell von einer GV Maispflanze auf ein Bakterium in der Umwelt übertragen würde, nicht von dem Gen unterschieden werden könnte, das in der Bakterienpopulation schon weit verbreitet ist. Aufgrund der fehlenden Marktakzeptanz für GV Nutzpflanzen ist der GV Mais in Frankreich auf nicht mehr als 500 Hektar angebaut worden.

Durch regulatorische Entscheidungen, die auf der Richtlinie 90/220/EEC basieren, welche im Oktober 2002 durch die Richtlinie 2001/18/EEC ersetzt werden wird, wurde die Markteinführung von GV Maispflanzen mit dem *nptII*-Antibiotikaresistenz-Marker bewilligt. Vier weitere neuere Anträge mit *nptII* erhielten nicht die notwendige Unterstützung durch die qualifizierte Mehrheit und seitdem wurden drei Anträge zurückgestellt. Die Mitgliedsstaaten und die Kommission sollen sicherstellen, dass GVOs, die Gene enthalten, welche Resistenz gegenüber in der medizinischen oder veterinärmedizinischen Therapie eingesetzten Antibiotika exprimieren, in einer Bewertung des Umweltrisikos besonders berücksichtigt werden; dies mit Blick auf Identifizierung und „auslaufen lassen“ von Antibiotikaresistenz-Markern in GVOs, welche

Abbildung 1

1 Berichterstatter („Rapporteur“) Prüfung (90+ Tage)

2 Prüfung durch Mitgliedsstaat (60 Tage)

Bedenken

keine Bedenken

3 Wissenschaftliches Komitee zu Pflanzen

4 Vorschlag der Kommission

5 Mitgliedsstaaten-Votum

<62/87

+62/87

6 Rat der Umweltminister

0/87

<62/87

+62/87

7 Kommission

Ablehnung

Annahme

Der Bewerber stellt ein technisches Dossier mit allen für die Sicherheitsbewertung der GV Pflanze relevanten Informationen zusammen. Das Dossier wird zur Beurteilung bei der „kompetenten Autorität“ eingereicht - einer Regierungsagentur mit Expertise in der Risikobewertung - eines der Mitgliedsstaaten, definiert als Berichterstatter („Rapporteur“). Der Rapporteur reicht auf Basis einer detaillierten Prüfung des technischen Dokuments den Vorschlag ein, das Produkt zu vermarkten oder es abzulehnen. Der Vorschlag des Rapporteurs, das Produkt zu vermarkten wird danach an die Europäische Kommission gesendet, welche es an alle Mitgliedsstaaten weiterleitet. Wenn einer der Mitgliedsstaaten Bedenken gegen den Vermarktungsvorschlag hat, muss die Kommission einen neuen Vorschlag entwerfen auf Basis des Vorschlags des Rapporteurs, der Bedenken des Mitgliedsstaates und einer Prüfung durch das „wissenschaftliche Komitee zu Pflanzen“, einem wissenschaftlichen Beratungsorgan für die Europäische Kommission. Der Vorschlag der Kommission ist dann Gegenstand eines Mitgliedsstaaten-Votums. Wenn einen „qualifizierte Mehrheit“ der Mitgliedsstaaten den Vorschlag der Kommission unterstützt, wird das Produkt angenommen. Falls dies nicht der Fall ist, wird die Entscheidung dem Rat der Umweltminister übergeben. Der Rat kann den Vorschlag der Kommission einstimmig ablehnen oder durch eine qualifizierte Mehrheit annehmen. Wenn mindestens einer der Mitgliedsstaaten den Vorschlag der Kommission unterstützt, aber keine qualifizierte Mehrheit erreicht wird, wird die Entscheidung zurück an die Europäische Kommission gegeben.

einen nachteiligen Einfluß auf die menschliche Gesundheit und die Umwelt haben könnten. Markergene mit klinischer Bedeutung werden bis 2005 auslaufen.

Sicherheitsbewertung und Antibiotikaresistenz in GV Nutzpflanzen

Die Sicherheitsbewertung von Nutzpflanzen, die Antibiotikaresistenz-Marker enthalten, wurde bereits eingehend durch Experten von international anerkannten wissenschaftlichen Einrichtungen und wissenschaftlichen Komitees in der Europäischen Union und von Regierungsexperten aus Kanada, Japan, Schweiz, den USA und weiteren Ländern besprochen. Die Experten bewerteten die Sicherheit von Nutzpflanzen, die das *nptII*-Markergen enthalten, welches Resistenz gegenüber Kanamycin und Neomycin verleiht, das *aad*-Gen, welches Resistenz gegenüber Streptomycin und Spectinomycin verleiht, sowie das *bla*-Gen, das Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht. Sie kamen zu dem Schluß, dass das Risiko eines Gentransfers von der transgenen Nutzpflanze, die diese Gene enthält, auf die Mikroorganismen-Population vernachlässigbar ist. Sollte ein solcher Transfer vorkommen, hätte er keine Auswirkungen auf die derzeit hohe Verbreitungsrate von Antibiotikaresistenzen in der Mikroorganismen-Population. Das Wissenschaftliche Komitee der Europäischen Kommission zu Pflanzen lieferte eine Einschätzung zur Sicherheit eines Bt-insektengeschützten Mais-Produkts, welches das *nptII*-Gen enthält.

Ihre Schlussfolgerungen basieren auf den folgenden Beobachtungen:

1 Die Antibiotikaresistenz-Marker, die in der Pflanzen-Biotechnologie verwendet werden,

wurden aus natürlich vorkommenden Bakterien gewonnen. Speziell das *nptII*-Gen wurde aus Bakterien aus dem menschlichen Darm isoliert. Die Marker in zugelassenen Produkten sind bereits weit verbreitet, da es effektive natürliche Transfer-Mechanismen gibt, die Gene direkt zwischen bakteriellen Zellen hin und her befördern. Dieser Prozess ist für die Bakterien vorteilhaft. Einige Bakterien-Populationen können so als Reservoir für bestimmte Antibiotikaresistenz-Gene wirken, die dann als Antwort auf entsprechenden Selektionsdruck schnell verbreitet werden können.

2 Die Antibiotika Kanamycin und Neomycin, die durch *nptII* inaktiviert werden, werden in der Humantherapie selten verwendet, da sie durch weniger toxische Antibiotika mit größerer Wirksamkeit ersetzt worden sind.

3 Es gibt keinen bekannten Mechanismus für den Transfer von Genen von Pflanzen auf Bakterien. Theoretisch könnte auf Feldern mit GV-Nutzpflanzen ein Gentransfer auf Boden-Mikroorganismen stattfinden. Jedoch konnten solche Ereignisse bislang nicht nachgewiesen werden. Sowohl bakterielle als auch pflanzliche DNA zeigte im Boden durch Bindung an die Oberfläche von Bodenpartikeln eine Persistenz von Wochen oder Monaten. Der Zeitraum der Verfügbarkeit von Pflanzen-DNA, ein bedeutender Faktor in der Bestimmung der Wahrscheinlichkeit eines Gentransfers, ist daher im Boden wahrscheinlich höher als im Darm. Obwohl bestimmte Bakterien die Fähigkeit zur spontanen Aufnahme nackter DNA haben, müssten zahlreiche Barrieren überwunden werden, bevor intakte Gene aus Pflanzen aus einer natürlichen Umgebung aufgenommen werden und in Bakterien

funktionell und dauerhaft erhalten bleiben. Ein solches Ereignis konnte unter natürlichen Bedingungen noch nie gezeigt werden. Selbst wenn ein Transfer mit sehr geringer Frequenz stattfände, würde dies die Zahl der antibiotikaresistenten Bakterien, die bereits in der Natur vorkommen, nicht signifikant erhöhen können.

4 Die Rate für einen DNA-Transfer zwischen Bakterien liegt in der Natur unter optimalen Bedingungen im Bereich von 10^{-2} bis 10^{-5} . Die geschätzte Frequenz der Aufnahme des *nptII*-Genmarkers aus einer transgenen Pflanze durch Bakterien beträgt unter optimalen Bedingungen dagegen nur 10^{-17} und wird daher als insignifikant klein angesehen. Das *nptII*-Gen entspricht nur 0,00004% des gesamten Maisgenoms und würde mit dem Rest der DNA um einen Aufnahme durch die Bakterien konkurrieren. Die Verfügbarkeit freier GV DNA pflanzlicher Herkunft im Pansen oder im Verdauungstrakt wird weiter eingeschränkt durch eine schnelle Verdauung durch Pankreas-Flüssigkeiten und durch saure Speichelflüssigkeit. Die Beteiligung des *nptII*-Gens aus transgenen Pflanzen am Gesamt-Pool der kanamycinresistenten Bakterien erscheint noch unbedeutender im Vergleich zu dem großen Pool an bereits in Bakterien vorkommenden Genen, die Resistenz gegenüber Kanamycin verleihen und dem hohen Grad an Gentransfer, der beständig in Bakterien-Populationen vorkommt. Daher ist es für ein Bakterium um mehrere Größenordnungen wahrscheinlicher, ein Resistenzgen von einem anderen Bakterium aufzunehmen als über die DNA einer GV Pflanze.

5 Antibiotikaresistenz-Marker verleihen nur Resistenz gegenüber bestimmten Antibiotika. Antibiotikaresistenz-Marker führen nicht zu einer Produktion von Antibiotika. Es werden daher durch solche Markergene in mit biotechnologischen Methoden erzeugten Pflanzen keine Antibiotika gebildet.

Gibt es Alternativen zu Antibiotikaresistenz-Markern und können sie wieder entfernt werden?

Alternativen zu Antibiotikaresistenz-Markern

Alternative selektionierbare Marker für Pflanzen fallen in zwei Kategorien. Einige Marker verleihen Resistenz gegenüber Chemikalien, die keine Antibiotika sind, wie Herbizide oder letale Konzentrationen der Aminosäuren Lysin und Threonin. Die Enzyme, die Resistenz gegenüber hohen Konzentrationen von Lysin und Threonin verleihen, können in die Aminosäure-Biosynthese eingreifen und - wenn sie auf hohem Niveau exprimiert werden - eine abnormale Entwicklung der Pflanze verursachen. Die entsprechenden Gene sind daher nicht als Markersysteme geeignet. Die Präsenz von Herbizidtoleranz-Markern kann unerwünscht sein. Glyphosat ist in gemäßigttem Klima mit milden Wintern das effektivste Herbizid zur Kontrolle von Kartoffelsaat aus den Vorjahren. Daher wären glyphosatresistente Kartoffeln in diesen Regionen nicht geeignet. Des weiteren würden Pflanzen, die Herbizidtoleranz-Marker enthalten und nicht als herbizidtolerante Nutzpflanzen registriert sind, zum Missbrauch von Herbiziden verleiten.

Andere alternative Markersysteme beruhen auf dem Wachstum von Pflanzenzellen in Anwesenheit ungewöhnlicher Nährstoffe wie Cytokinin, Glucuroniden, Xylose und Mannose, die ein Wachstum nicht transformierter Zellen nicht gestatten. Beispielsweise nutzen Pflanzen

Mannose normalerweise nicht als Zuckerquelle. Das Einbringen eines Gens, welches den Metabolismus von Mannose in Pflanzenzellen und die nachfolgende Kultivierung auf Medien mit Mannose als einziger Zuckerquelle ermöglicht, würde nur solchen Zellen das Wachstum erlauben, die das Gen enthalten.

Wenn diese Systeme, die sich noch in der Entwicklungsphase befinden, zuverlässig und in großem Umfang in einem weiten Bereich verschiedener Umgebungen arbeiten, müssen Risikobewertungen durchgeführt werden, um folgende Punkte abzuschätzen: einen potentiellen ökologischen Einfluß von Pflanzen, die auf einem neuen Substrat wachsen können, die Bedeutung für den gesamten pflanzlichen Metabolismus und die Konsequenzen für die menschliche oder tierische Ernährung durch gesteigerten Gehalt an Metaboliten, die in den entsprechenden konventionellen Pflanzen eventuell nicht vorkommen.

Entfernung der Marker

Es ist nicht möglich, Markergene zu entfernen, wenn sie erst einmal in des Pflanzengenom eingebaut sind, solange nicht bei der Transformation ein bestimmter Entfernungs-Mechanismus zusammen mit dem Markergen und dem interessierenden Gen eingebaut wurde. Wie bereits oben erwähnt ist es möglich, den Einbau von solchen Antibiotikaresistenz-Markern in Pflanzenzellen zu vermeiden, die nur für den Zusammenbau und die Amplifikation von DNA-Konstrukten in Bakterien verwendet werden und daher nicht für den Pflanzen-Schritt im Transformations-Prozess benötigt werden.

Die Entfernung von Markergenen, die von Pflanzen-Promotoren gesteuert werden und für die Selektion von Pflanzenzellen verwendet werden, im Vorfeld der Kommerzialisierung ist sowohl für die Konsumenten als auch für die Industrie zu einem Ziel geworden. Extensive Forschung mit dieser Zielsetzung wird sowohl von der Industrie als auch von akademischen Institutionen durchgeführt. Unter den untersuchten Technologien sind:

- 1 Die Nutzung von Meganukleasen (z.B.: Cre/lox-System). Dies sind Enzyme, die spezifisch lange DNA-Sequenzen erkennen. Diese Erkennungs-Sequenzen werden auf beiden Seiten des Antibiotikaresistenz-Markers, der in die Pflanzenzelle eingebaut werden soll, eingefügt. Sobald die transformierten Zellen mit dem entsprechenden Antibiotikum selektiert worden sind, wird die Meganuklease in die Pflanzenzelle eingeführt und ermöglicht die Excision des Antibiotikaresistenz-Markers. Diese Technologie hat sich bereits als sehr effizient in bestimmten Pflanzen erwiesen, aber als schwierig zu handhaben in anderen Pflanzen, möglicherweise weil die Meganukleasen Zielsequenzen in dem Pflanzengenom selbst erkennen.
- 2 Die Anwesenheit von homologen DNA-Sequenzen auf beiden Seiten des Antibiotikaresistenz-Markergens kann eine zufällige Rekombination und Eliminierung dieses Gens ermöglichen. Dieser Prozess der homologen Rekombination kommt mit geringer Frequenz vor und kann pflanzenspezifisch sein.
- 3 Es ist möglich, die interessierende Eigenschaft und den Antibiotikaresistenz-Marker auf verschiedenen DNA-Konstrukten einzuführen. Nach der Transformation integriert jedes Molekül in einem anderen Chromosom. In diesem Fall ist es möglich, die

interessierende Eigenschaft und das Markergen in der nächsten Generation voneinander zu trennen. Die Frequenz einer Integration in zwei verschiedenen Chromosomen kann im Vergleich zur Integration an selben Ort recht gering sein. Die an der Regulation dieser Frequenzen beteiligten Faktoren sind noch nicht verstanden.

Von Forschern werden große Anstrengungen unternommen, um diese Technologien zu entwickeln. Einige Produkte, die die eine oder andere dieser Strategien verwenden, sind bereits in der Pipeline. Aber heute kann noch keine dieser Techniken routinemäßig für jede Nutzpflanze verwendet werden. Die Entwicklung dieser Technologien wird wahrscheinlich in erster Linie auf Laboratorien mit einer starken Infrastruktur beschränkt sein. Diese Laboratorien sollten in der Lage sein, eine größere Zahl transgener Pflanzenlinien mit dem Antibiotikaresistenz-Markergen zu entwickeln, als für das nachfolgende Screening auf die Eliminierung der Markergene benötigt werden.

Modifizierung regulatorischer Elemente von Markergenen

Die Bedenken gegenüber Antibiotikaresistenz-Markergenen beziehen sich hauptsächlich auf Transfer und Expression in Bakterienzellen. Eine Technik, die eine solche Expression vermeiden könnte, müsste in Betracht gezogen werden. Die Gene, die für eine Selektion in Pflanzen verwendet werden, werden bereits von pflanzlichen Promotor-Sequenzen kontrolliert, was eine ausreichende Expression in Bakterien unwahrscheinlich macht. Die Einführung einer Intron-Sequenz in das Markergen würde die Expression auf Pflanzenzellen beschränken und eine Expression in Bakterien definitiv verhindern. Introns sind DNA-Sequenzen, die natürlicherweise die codierenden Sequenzen in tierischen und pflanzlichen Zellen unterbrechen. Diese sind mit einem Mechanismus ausgestattet, der die Entfernung der Introns während der Transkription ermöglicht, während Bakterien nicht entsprechend ausgestattet sind und daher Gene, die Introns enthalten, nicht lesen können.

Antibiotikaresistenz-Markergene wie das *npIII*-Gen, das Resistenz gegenüber Kanamycin verleiht, sind in allen relevanten Aspekten wie Funktionalität, biochemischen Eigenschaften und Verbreitung in der Bakterien-Population sehr gut untersucht. Ihre Sicherheit wurde gut untersucht und bewertet. Unter diesen Bedingungen ist es wahrscheinlich, das der

gleiche Grad an Vertrauen, wie er für das *npIII*-Gen besteht, für ein anderes Selektionssystem nur schwer und langwierig zu erzielen ist. Alle noch verbleibenden mit einem solchen Gen verbundenen Bedenken könnten durch die Einführung eines Introns getilgt werden.

Schlussfolgerungen

Wissenschaftliche Experten stimmen darin überein, dass die Hauptursache für die Verbreitung von Antibiotikaresistenz in der übermäßigen Verwendung von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin liegt. In der Öffentlichkeit sind Bedenken gegenüber GV Nutzpflanzen mit Antibiotikaresistenz-Markern jedoch weit verbreitet, insbesondere seitdem das Thema wiederholt in den Medien aufgebracht wurde. Mehrere Regierungen in der Europäischen Union haben das „auslaufen lassen“ von GV Nutzpflanzen, die einen Antibiotikaresistenz-Marker enthalten, empfohlen. Jedoch wird das Risiko einer Gefährdung der Wirksamkeit von Antibiotika als verschwindend gering erachtet. Die meisten Alternativen sind noch in der Entwicklungsphase, nicht weit verfügbar und werden in Entwicklungsländern nur schwer durchführbar sein.

Auch wenn Antibiotikaresistenz-Marker oder andere Marker sich nicht als gefährlich erweisen - wie es allgemein der Fall ist - wäre es auf lange Sicht vorzuziehen, wenn transgene Pflanzen nur die Gene tragen, die für die Leistung der Nutzpflanzen nötig sind und nicht die selektionierbaren Marker.

Alternative Marker und Systeme zur Marker-Entfernung sind als Antwort auf die öffentlichen Bedenken erforscht worden und um die Palette der in der pflanzlichen Biotechnologie verfügbaren Werkzeuge zu erweitern. Da der zeitliche Aufwand für die Entwicklung neuer, alternativer Methoden bei verschiedenen Nutzpflanzen unterschiedlich ist, wird es notwendig sein, einen schrittweisen Übergang zu solchen Technologien zuzulassen. Auch wird entscheidend sein, eine Sicherheitsbewertung solcher neuen Systeme durchzuführen, bevor sie in zu kommerzialisierenden Produkten zugelassen werden. Das Ersetzen der Technologie, die Antibiotikaresistenz-Markergene wie *npIII* verwendet, wird dann wünschenswert, wenn bei der neuen Technologie mindestens der gleiche Grad an wissenschaftlicher Kenntnis und Vertrauen in die Verwendung sichergestellt ist wie bei dem *npIII*-Gen und den Produkten, die dies Gen enthalten.

Literatur

Opinion of the scientific committee on plants regarding the submission for placing on the market of genetically modified insect resistant lines notified by the Pioneer Genetic SARL Company, 1998 (http://Europa.eu.int/comm/dg24/health/sc/scp/out10_en.html)

Zentral-Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS, Deutschland), *Stellungnahme der ZKBS zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen* (<http://yellow-fever.rki.de/GENTEC/ZKBS/ZKBS.HTM/ALLGSTELL/99/ANTIBIOIKA.HTM&1>)

WHO Food Safety Unit. *Health aspects of marker genes in genetically modified plants*, 1993. Bericht eines WHO Workshops.

OECD, Environment Directorate Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on chemicals. Working group on harmonization of regulatory oversight in biotechnology, Draft response to the G8, 2000

FAO/WHO *Safety aspects of genetically modified food of plant origin*. Bericht einer gemeinsamen FAO/WHO Experten Konsultation zu biotechnologisch hergestellten Nahrungsmitteln. 2000

Nordische Arbeitsgruppe zu Nahrungsmittel-Toxikologie und Risikobewertung. S. Kärenlampi. *Health effects of marker genes in genetically engineered food plants*. 1996. TemaNord 1996:530. Abteilung für Biochemie und Biotechnologie, Universität von Kuopio, Postfach 1627, FIN-70211 Kuopio, Finnland