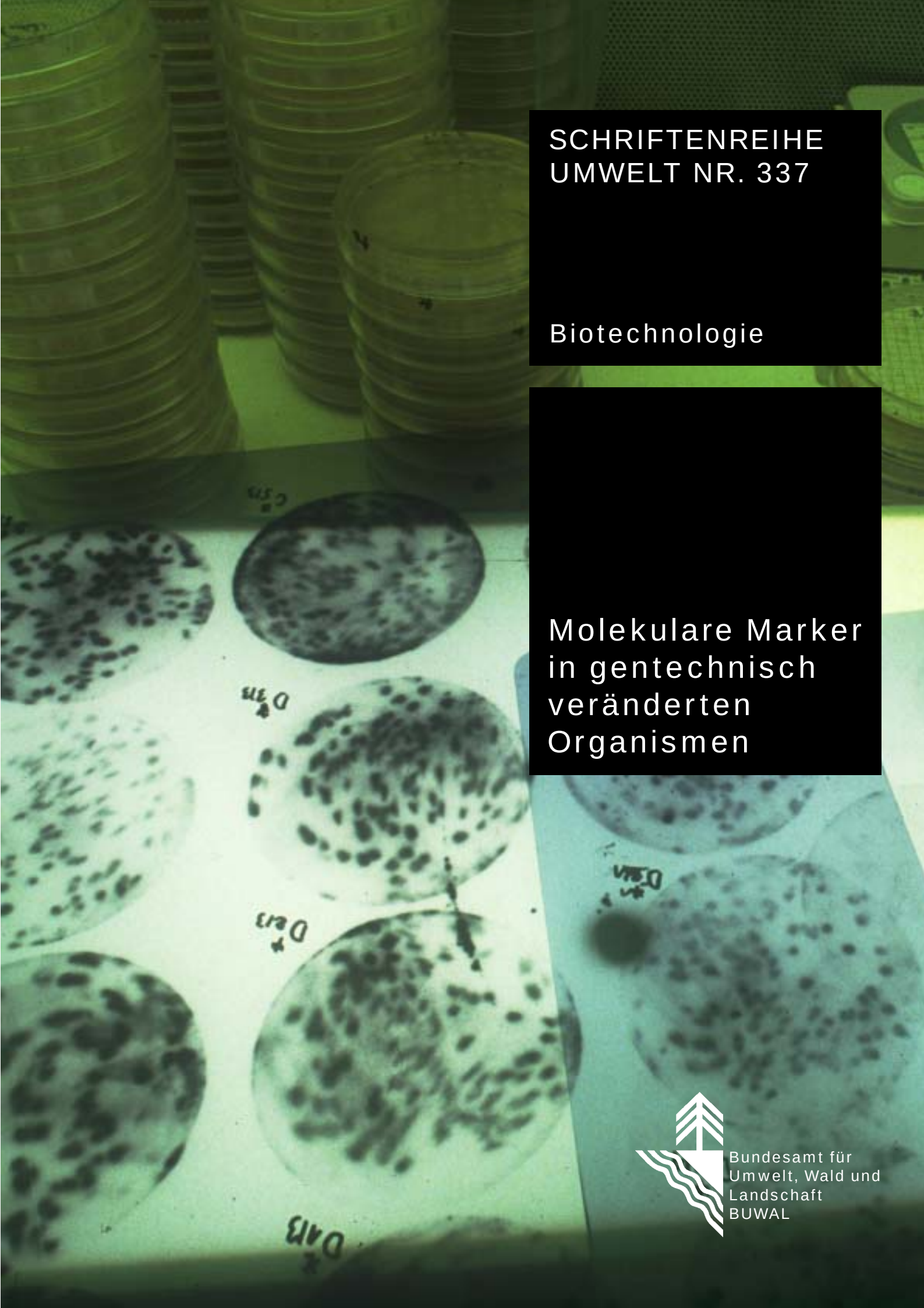

SCHRIFTENREIHE UMWELT NR. 337

Biotechnologie

Molekulare Marker in gentechnisch veränderten Organismen

Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft
BUWAL

SCHRIFTENREIHE
UMWELT NR. 337

Biotechnologie

Molekulare Marker in gentechnisch veränderten Organismen

Vergleich bezüglich
Anwendungsmöglichkeiten
und Risikobewertung

Avec résumé en français
Con riassunto in italiano
With summary in English

Herausgegeben vom Bundesamt
für Umwelt, Wald und Landschaft
BUWAL
Bern, 2002

Herausgeber Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft BUWAL

Autor Valentin Küng
Küng – Biotech + Umwelt, Höheweg 17, 3006 Bern

Begleitung BUWAL Hans Hosbach, Sektion Biotechnologie und Stoffflüsse
Andrea Raps, Sektion Biotechnologie und Stoffflüsse

Dank Herausgeber und Autor danken jenen Personen, die zu fachspezifischen Fragen kompetent Auskunft gegeben und auf massgebende Publikationen hingewiesen haben. Dies sind namentlich Herr PD Dr. Christof Sautter vom Institut für Pflanzenwissenschaften der ETH-Zürich, Frau Dr. Gabriele Neuhaus von Novartis-Seeds, Basel; Frau PD Dr. Regina Vögeli-Lange von Novartis-Seeds, Basel; Herrn Prof. Joachim Frey, Institut für Veterinär-Bakteriologie der Universität Bern, Herrn Dr. Jürg Schmid von der Versuchsstation des Institutes für Pflanzenwissenschaften der ETH-Zürich, Eschikon Lindau, Herrn Dr. Eric Wyss vom Forschungsinstitut für biologischen Landbau, Frick, und Herr PD Dr. Michael Altmann, Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Universität Bern.

Titelbild Wolfgang Kunz/Bilderberg

Bezugsquelle Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft
Dokumentation
3003 Bern
Fax + 41 (0)31 324 02 16
E-Mail: docu@buwal.admin.ch
Internet: www.buwalshop.ch

Bestellnummer SRU-337-D

Preis CHF 10.-- (inkl. MWSt)

© BUWAL 2002

Inhaltsverzeichnis

Abstracts **5**

Vorwort **7**

Zusammenfassung **9**

Résumé **11**

Compendio **13**

Summary **15**

1 Einleitung **17**
1.1 Auftrag 17
1.2 Schwerpunkte 17
1.3 Aufbau 18
1.4 Begriffe 19

2 Übersicht zu Markersystemen und Aspekte der Risikobewertung **21**
2.1 Definition, Bedeutung und praktische Anforderungen 21
2.2 Gruppierung aufgrund der molekularen Funktionsweise 22
2.3 Umweltrelevante Informationen für die Risikobewertung 23
2.4 Bedeutung der Eingriffstiefe für die Risikobewertung 24

3 Vergleichende Bewertung von Markersystemen **25**
3.1 Gruppierung nach Grad der Gefährdung von Mensch und Umwelt 25
3.2 Vergleich bezüglich Anwendungsmöglichkeiten und Risikobewertung 27
3.3 Vergleich bezüglich Aufwand für die Risikobewertung 28

4 Schlussfolgerungen **31**
4.1 Empfehlungen für Markersysteme zur Minimierung der Gefährdung von Mensch und Umwelt 31
4.2 Begründung der einzelnen Forderungen 32
4.3 Ziel der Minimierung der Gefährdung von Mensch und Umwelt 34

5 Stand der Technik für das Entfernen von Markern **37**
5.1 Vielfalt und Spezifität der molekulargenetischen Möglichkeiten 37
5.2 „Gene targeting“ / „Gene replacement“ / „Gene knock-out technology“ 37
5.2.1 Das Cre-*lox*P-Rekombinationssystem 38
5.2.2 Flp-*FRT* Rekombinationssystem 40
5.2.3 Markerfreiheit durch Verlust des entsprechenden Gens 40
5.3 Markerfreie Systeme bei Pflanzen 40

6 Charakterisierung verschiedener Markersysteme **43**
6.1 Antibiotikaresistenzmarker 43
6.1.1 Antibiotikaresistenzmarker in Pflanzen 43
6.1.2 Risikobewertung von Antibiotikaresistenzmarkern 47
6.1.3 Vielfalt der Antibiotika und der medizinisch relevanten Wirkstoffe 48
6.1.4 Substanzklasse, Wirkungsebene, Resistenzmechanismus und -spektrum 49

6.2 Herbizidtoleranzmarker ... 50
6.3 Schwermetalltoleranzmarker ... 53
6.4 Erweiterter Metabolismus als Selektionsmarker ... 54
6.4.1 Verwirrlicher Gebrauch des Begriffes „Positive Selektion“ ... 55
6.4.2 Nutzbarmachen von zusätzlichen Kohlenstoffquellen – „Positech“ von *Novartis* ... 55
6.5 Farbstoffmarker ... 56
6.6 Lumineszenzmarker ... 57
6.7 Fluoreszenzmarker ... 57
6.8 Nukleotidmarker ... 58
6.9 Auxotrophiemarker ... 59
6.10 Oberflächenmarker ... 60

7 Hintergrund zur Risikobewertung ... 61
7.1 Aufgabe und Bedeutung molekularer Marker ... 61
7.1.1 Nachweismarker ... 61
7.1.2 Reportergene ... 61
7.1.3 Selektionsmarker ... 62
7.2 Praktische Anforderungen an molekulare Marker ... 63
7.2.1 Zweckmässigkeit ... 63
7.2.2 Rahmenbedingungen aufgrund des verwendeten biologischen Systems ... 64
7.2.3 Aspekte der Biosicherheit ... 64
7.3 Umweltrelevante Informationen für die Risikobewertung nach FrSV ... 65
7.3.1 Auszug aus der revidierten EU-Richtlinie 90/220/EWG, Anhang II gemäss 94/15 EG ... 67

8 Stellungnahmen, Entscheide und Revision der EU-Freisetzungsrichtlinie ... 71
8.1 Markergene in neuartigen Lebensmitteln in der EU ... 71
8.2 Antibiotikaresistenzmarker in der revidierten Freisetzungsrichtlinie der EU ... 71
8.3 Stellungnahme der ZKBS zu Antibiotikaresistenzen ... 72

9 Weiterführende Informationsquellen ... 75
9.1 Internetadressen zu Markersystemen ... 75
9.2 Informationen zu Antibiotikaresistenzmarkern ... 75
9.3 Primärliteratur und Informationen zu einzelnen Genen, Sequenzen und Proteinen ... 76
9.4 Internetadressen für Patentinformationen ... 76

10 Zitierte Literatur ... 77

Abstracts

Molecular markers are used to select or prove the presence of genetically modified organisms (GMOs) and to make cellular processes visible. As exogenous gene sequences they must be evaluated from the point of view of biosafety. It is particularly important to use environmentally sound markers in field trials of GMOs, or when putting GMOs on the market. The present study describes the systems currently in use, their mechanisms and possibilities for application, and the current status of the technology in terms of removing markers that are no longer required. These details are supplemented by excerpts from Statements and references to further literature and web sites. The report provides a useful aid for comparing and evaluating marker systems in terms of their properties with relevance for human beings and the environment.

Keywords:
deliberate release,
antibiotic resistance,
biological safety

Molekulare Marker werden zur Selektion und zum Nachweis von gentechnisch veränderten Organismen (GVO) und zum Sichtbarmachen von Zellprozessen verwendet. Als zusätzliche Gensequenzen sind sie dabei unter dem Aspekt der Biosicherheit zu beurteilen. Vor allem bei Freisetzungen und besonders beim Inverkehrbringen von GVOs ist es wichtig, umweltverträgliche Marker zu verwenden. Die vorliegende Studie beschreibt die derzeit angewandten Systeme, deren Einsatzmöglichkeiten und Wirkmechanismen sowie den Stand der Technik in Hinblick auf das Entfernen von Markern, wenn diese nicht mehr benötigt werden. Diese Angaben werden ergänzt mit Auszügen aus Stellungnahmen und Verweisen auf weiterführende Literatur und Internet-Seiten. Damit ist der Bericht ein nützliches Hilfsmittel, um Markersysteme bezüglich ihrer für Mensch und Umwelt relevanten Eigenschaften miteinander vergleichen und beurteilen zu können.

Stichwörter:
Freisetzungen,
Antibiotikaresistenz,
biologische Sicherheit

Les marqueurs moléculaires sont utilisés pour la sélection et la détection des organismes génétiquement modifiés (OGM) et pour mettre en évidence des processus cellulaires. En tant que séquences de gènes supplémentaires, il y a lieu de les évaluer sous l'angle de la sécurité biologique. Il est important d'utiliser des marqueurs sans effets sur l'environnement, notamment lors des disséminations d'OGM dans l'environnement, et plus particulièrement lors de leur mise dans leur commerce. La présente étude décrit les différents systèmes utilisés, leurs possibilités d'application et leurs mécanismes d'action, ainsi que l'état actuel de la technologie permettant l'élimination des marqueurs lorsque ceux-ci ne sont plus nécessaires. Ces informations sont complétées par des citations extraites de prises de position ainsi que par des références à des publications et à des sites Internet renfermant des données plus détaillées. Ce rapport constitue donc un outil utile pour comparer et évaluer les caractéristiques importantes des systèmes de marqueurs du point de vue de leurs effets sur l'homme et l'environnement.

Mots-clés:
disséminations dans l'environnement, resistance aux antibiotiques, sécurité biologique

I marcatori molecolari vengono utilizzati per selezionare e per identificare organismi geneticamente modificati (OGM), nonché per evidenziare i processi cellulari. In quanto sequenze supplementari di geni, essi vanno valutati dal punto di vista della biosicurezza. Nel caso di emissioni deliberate nell'ambiente, e segnatamente della messa in commercio di OGM, è importante utilizzare dei marcatori inoffensivi dal punto di vista ambientale. Il presente studio descrive i vari sistemi utilizzati, le loro possibilità di applicazione e i loro meccanismi d'azione come pure lo stato attuale della tecnica che permette di eliminare i marcatori quando questi non sono più necessari. Esso viene completato con citazioni tratte da pareri nonché da riferimenti a pubblicazioni e siti Internet contenenti informazioni più dettagliate. Il rapporto è quindi un elemento utile per paragonare e valutare le caratteristiche rilevanti dei sistemi di marcatura dal punto di vista dei loro effetti sull'uomo e l'ambiente.

Parole chiave:
emissioni deliberate nell'ambiente, resistenza all'antibiotico, biosicurezza

Vorwort

Die Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen als molekulare Marker in der biotechnologischen Pflanzenzüchtung ist seit Beginn des kommerziellen Einsatzes sehr umstritten. Es wird befürchtet, dass durch die massenhafte Freisetzung transgener Pflanzen via horizontalem Gentransfer die Verbreitung dieser Gene innerhalb des Bakterienreiches gefördert wird und damit die Verwendung von Antibiotika – die einzige Therapieform für Bakteriosen – zusätzlich gefährdet wird. Zwar gibt es keine wissenschaftlichen Belege für diese Befürchtung, dennoch hat die Gesetzgebung in der Europäischen Union nun in diesem sensiblen Bereich ihre Verantwortung als Schutzinstanz übernommen und Regelungen in Kraft gesetzt, die die schrittweise Einstellung der Verwendung dieser Gene bis Ende 2008 sicherstellen sollen. Auch in der Schweiz sind analoge Regelungen vorgesehen.

Die Diskussion um die Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen macht deutlich, dass die Beurteilung von molekularen Markern bei der Risikobewertung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen eine wichtige Rolle spielt. Nachdem nun unbedenkliche Alternativen zu Antibiotikaresistenz-Genen gefragt sind, ist eine Evaluation der möglichen Markersysteme in Bezug auf Sicherheit und Umweltverträglichkeit notwendig. Denn für die Konstruktion gentechnisch veränderter Organismen (GVO) sind molekulare Marker ein unerlässliches Instrument, weil mit ihrer Hilfe erfolgreich transformierte Organismen aus der grossen Menge der übrigen Organismen selektioniert werden können. Auf der anderen Seite können molekulare Markersysteme aber auch der biologischen Sicherheit dienen, indem sie es ermöglichen, auf relativ einfache Weise bestimmte gentechnisch veränderte Organismen nachzuweisen und ihr Vorkommen in einem Betrieb oder in der Umwelt zu ermitteln. Molekulare Marker sind somit gerade aus der Sicht des Umweltschutzes nicht bloss überflüssige Fremd-DNA, die es unbedingt zu eliminieren gilt, sondern gleichzeitig auch zusätzliches Erbmaterial mit nützlicher Funktion.

Mit der vorliegenden Studie soll nun ein Überblick über die heute gebräuchlichen Systeme und ihre Wirkungsmechanismen gegeben werden und die Möglichkeiten und Grenzen aufgezeigt werden, unerwünschte molekulare Markersysteme zu ersetzen oder ganz zu eliminieren. Die vorliegende Studie will mit einer einfachen Klassierung der verschiedenen Systeme unter dem Blickwinkel des Umweltschutzes den Vollzugsbehörden Unterstützung in ihrer verantwortungsvollen Aufgabe liefern sowie auch den Gesuchstellern solcher Vorhaben eine Hilfe anbieten.

Philippe Roch, Direktor

Zusammenfassung

Ausgangslage und Zielsetzung

Markersysteme erlauben es, einen Organismus – oder Zellen davon – von einem anderen Organismus zu unterscheiden. Sie haben zudem eine wichtige Funktion bei der Konstruktion von gentechnisch veränderten Organismen (GVO).

Die vorliegende Studie liefert aus dem Fokus der Biosicherheit eine Übersicht zu den verschiedenen Markersystemen und deren Einsatzmöglichkeiten und Eigenschaften. Und sie beschreibt den Stand der Technik, wie molekulare Marker nach deren Verwendung wieder aus dem gentechnisch veränderten Organismus eliminiert werden können.

Biologische Sicherheit

Aus Gründen der biologischen Sicherheit muss ein GVO gegenüber seinem Wildtyp unterscheidbar sein; dieser Nachweis des GVO erfolgt mit Hilfe eines Markers. Wo die Unterscheidbarkeit mit Hilfe der primär erwünschten, transgenen Eigenschaft machbar ist, braucht es keinen zusätzlichen Marker mehr. Diejenigen transgenen Eigenschaften eines Organismus, die für die vorgesehene Verwendung eines GVO nicht mehr benötigt werden, sind deshalb zu entfernen.

Entfernen von Markern

Es gibt molekulargenetische Techniken, welche relativ gezielte Eingriffe in ein Genom ermöglichen und die Entfernung von nicht mehr benötigten Markern erlauben. Bei Pflanzen steht die Technik für die gezielte Veränderung des Genoms und insbesondere das Eliminieren oder Ersetzen ganzer Gene in den Anfängen. Aktuelle Forschungsergebnisse zeigen aber, dass es auch bei den schwieriger zu transfomierenden Pflanzen wie beim Weizen möglich ist, Pflanzen ohne Marker und mit einer gezielten Integration des Gens für die gewünschte Eigenschaft zu konstruieren. Voraussetzung ist, dass das spätere Entfernen von Genen bereits bei deren Integration ins Genom vorausgeplant wurde.

Risikobewertung

Die Risikobewertung für das Inverkehrbringen eines gentechnisch veränderten Organismus ist am aufwändigsten, weil es sich dabei um die Marktzulassung und damit um die potenziell grösste Verbreitung in der Umwelt handelt. Bei der Risikobewertung wird ein „Fall-zu-Fall“ und ein „Schritt-für-Schritt“-Vorgehen praktiziert. Der Aufwand für eine Risikobewertung steigt, je mehr Effekte der Fremd-DNA in einem rekombinanten Organismus abzuschätzen sind. Im Hinblick auf einen Freisetzungsversuch oder ein Inverkehrbringen eines gentechnisch veränderten Organismus ist deshalb die jeweils geringste notwendige Veränderung anzustreben, um den gewünschten Phänotyp zu erzielen. Ein Markersystem darf bei einer Freisetzung oder dem Inverkehrbringen eines gentechnisch veränderten Organismus keine Gefährdung für Mensch und Umwelt darstellen.

Empfehlungen

Es gilt: Je weniger Fremd-DNA vorhanden und je besser sie charakterisiert ist, desto

- geringer ist der Aufwand für die Risikobewertung
- zuverlässiger wird das Resultat der Bewertung
- geringer ist das Risiko für Mensch und Umwelt.

Anzustreben ist:

1. Eine vollständige Charakterisierung der inserierten Marker-DNA
2. Eine Reduktion der Fremd-DNA auf die notwendigen Sequenzen, d.h. auf die primär erwünschten, transgenen Eigenschaften inklusive der Möglichkeit des Nachweises des GVO

3.a Kein Fitnessvorteil des GVO durch die Marker-DNA unter nicht-spezifischen, selektiven Umweltbedingungen und

3.b Kein Fitnessvorteil durch (Gentransfer übertragene) Marker-DNA in einem anderen Organismus bei nicht-spezifischen, selektiven Umweltbedingungen

4. Zuverlässige Nachweisbarkeit des GVO und Unterscheidbarkeit von seinem Wildtyp
5. Eine hohe genetische Stabilität
6. Keine oder auf ein Minimum reduzierte Mobilisierbarkeit der Marker-DNA
7. Eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger.

Quintessenz

Bei einem Freisetzungsversuch und insbesondere für ein Inverkehrbringen ist es aus Sicht der Biosicherheit anzustreben, dass bei einem gentechnisch veränderten Organismus nur jene Fremdgene eingeführt werden, welche charakterisiert und für die primär erwünschte, transgene Eigenschaft notwendig sind.

Résumé

Point de la situation et objectifs

Les systèmes de marqueurs permettent de distinguer un organisme – ou des cellules issues de celui-ci – d'un autre organisme. Ils ont en outre une fonction prépondérante lors de la construction d'organismes génétiquement modifiés (OGM).

La présente étude passe en revue les différents systèmes de marqueurs ainsi que leurs possibilités d'application et leurs caractéristiques sous l'angle de la biosécurité. Elle décrit en outre l'état actuel de la technologie permettant d'éliminer des marqueurs biologiques des organismes génétiquement modifiés une fois qu'on n'en a plus besoin.

Sécurité biologique

Un OGM doit, pour des raisons de sécurité biologique, pouvoir être distingué de son espèce sauvage; cette identification s'effectue à l'aide d'un marqueur. Partout où la distinction s'avère possible à l'aide de la caractéristique transgénique première que l'on désire obtenir, il n'est pas nécessaire d'ajouter un marqueur. Les caractéristiques transgéniques d'un organisme qui ne sont plus nécessaires pour l'utilisation prévue d'un OGM doivent donc être éliminées.

Elimination des marqueurs

Il existe des techniques de génétique moléculaire permettant d'intervenir de manière relativement ciblée sur le génome et de retirer les marqueurs dont on n'a plus besoin. Chez les plantes, la technique de modification ciblée du génome, et notamment l'élimination ou le remplacement de gènes entiers, en est à ses débuts. Les résultats des recherches actuelles montrent toutefois qu'il est possible, même dans le cas de plantes relativement difficiles à transformer comme le blé, de construire des plantes sans marqueurs dans lesquelles le gène codant pour la caractéristique souhaitée a été intégré de manière ciblée. La condition préalable est qu'il faut avoir prévu d'avance, lors de l'insertion des gènes dans le génome, leur élimination ultérieure.

Evaluation du risque

L'évaluation du risque pour la mise dans le commerce d'un organisme génétiquement modifié est l'évaluation la plus complète et la plus longue à réaliser du fait qu'il s'agit d'une autorisation de mise sur le marché et, partant, de la propagation potentiellement la plus importante dans l'environnement. On procède à l'évaluation du risque par une démarche au « cas par cas » et « pas à pas ». Le temps nécessaire à ce type d'évaluation augmente proportionnellement au nombre d'effets induits par des ADN étrangers qu'il y a lieu d'évaluer dans l'organisme recombinant. Dans l'optique d'une dissémination expérimentale ou de la mise dans le commerce d'un organisme génétiquement modifié, il faut donc chercher à introduire le minimum de modifications nécessaires pour obtenir le phénotype souhaité. Un système de marqueurs ne doit présenter aucun danger pour l'homme et l'environnement lors d'une dissémination expérimentale ou de la mise dans le commerce de l'organisme génétiquement modifié).

Recommandations

La règle qui s'applique est: moins il y a d'ADN étranger et mieux celui-est caractérisé, plus

- l'évaluation du risque est simple à réaliser
- le résultat de l'évaluation est fiable
- le risque pour l'homme et l'environnement est faible

L'objectif doit être:

1. une caractérisation complète de l'ADN des marqueurs insérés;
2. la limitation de l'ADN étranger aux séquences nécessaires, à savoir les caractéristiques transgéniques souhaitées en premier lieu, y compris la possibilité d'identifier l'OGM;

3.a aucun avantage conféré par l'ADN marqueur à l'OGM dans des conditions environnementales sélectives, non spécifiques; et

3.b aucun avantage conféré par l'ADN marqueur transmis par transfert génétique à un autre organisme dans des conditions environnementales sélectives, non spécifiques;

4. une identification fiable de l'OGM et une différenciation possible d'avec l'espèce sauvage;
5. une stabilité génétique élevée;
6. aucune mobilisation des ADN marqueurs ou une mobilisation réduite au strict minimum;
7. le donneur et le receveur doivent être proches du point de vue phylogénétique.

Quintessence

Dans l'optique d'une dissémination expérimentale d'un organisme génétiquement modifié, et plus particulièrement de sa mise en circulation, il y a lieu de viser, du point de vue de la biosécurité, à n'introduire que des gènes étrangers caractérisés et nécessaires à exprimer la caractéristique transgénique première souhaitée.

Compendio

Situazione di partenza e obiettivi

I sistemi di marcatura consentono di distinguere un organismo - o cellule provenienti da esso - da un altro organismo. Essi hanno, inoltre, una funzione importante nella costruzione di organismi geneticamente modificati.

Il presente studio esamina, dal punto di vista della biosicurezza, i diversi sistemi di marcatura nonché le loro possibilità di applicazione e caratteristiche. Inoltre, descrive lo stato attuale della tecnica che permette di eliminare, una volta utilizzati, i marcatori molecolari dagli organismi geneticamente modificati.

Biosicurezza

Un OGM deve, per ragioni di biosicurezza, essere distinguibile rispetto al suo ceppo selvatico; l'identificazione viene effettuata grazie ad un marcatore. Ove la distinzione può essere operata usando la caratteristica transgenica primaria desiderata, non è necessario aggiungere un ulteriore marcatore. Le caratteristiche transgeniche di un organismo che non sono più necessarie per l'utilizzazione prevista di un organismo vanno quindi eliminate.

Eliminazione dei marcatori

Esistono tecniche di genetica molecolare che consentono di intervenire in maniera relativamente mirata su un genoma e di eliminare i marcatori che non sono più necessari. Per quanto riguarda le piante, la tecnica di modificazione mirata del genoma, e segnatamente l'eliminazione o la sostituzione di geni interi, è ancora agli inizi. Tuttavia, i risultati attuali delle ricerche indicano che è possibile, anche nel caso di piante relativamente difficili da trasformare come il frumento, produrre piante senza marcatori, inserendo in maniera mirata il gene per la caratteristica desiderata. A condizione, però, di aver previsto l'eliminazione dei geni già al momento del loro inserimento nel genoma.

Valutazione del rischio

La valutazione del rischio per la messa in commercio di un organismo geneticamente modificato richiede più tempo dal momento che riguarda la commercializzazione e quindi, la diffusione potenzialmente maggiore nell'ambiente. La valutazione del rischio viene effettuata "caso per caso" e "passo per passo". Il tempo necessario per una valutazione del rischio aumenta proporzionalmente al numero di effetti del DNA estraneo che occorre esaminare in un organismo ricombinante. Nell'ottica di un'emissione sperimentale o di una messa in commercio di un organismo geneticamente modificato occorre quindi cercare di introdurre il minor numero di modifiche necessarie al fine di ottenere il fenotipo auspicato. Un sistema di marcatura non deve costituire, in occasione di un'emissione deliberata nell'ambiente o di una messa in commercio di un organismo geneticamente modificato (OGM), alcun pericolo per l'essere umano e l'ambiente.

Raccomandazioni

La regola da applicare è la seguente: minore è la quantità di DNA estraneo e migliore è la sua caratterizzazione

- più la valutazione del rischio è facile da realizzare
- più il risultato della valutazione è affidabile
- minore è il rischio per l'uomo e l'ambiente

L'obiettivo da conseguire è il seguente:

1. una caratterizzazione completa del DNA marcatore inserito;
2. una limitazione del DNA estraneo alle sequenze necessarie, ossia alle caratteristiche transgeniche primarie desiderate, ivi compresa la possibilità di identificare l'OGM;

3.a nessun vantaggio per l'OGM da parte del DNA marcatore in condizioni ambientali selettive, non specifiche; e

3.b nessun vantaggio conferito (mediante trasferimento genetico) dal DNA marcatore ad un altro organismo in condizioni ambientali selettive non specifiche;

4. identificazione attendibile dell'OGM e differenziazione rispetto al suo ceppo selvatico;
5. una stabilità genetica elevata;
6. nessuna mobilitazione o una mobilitazione ridotta al minimo del DNA marcatore ;
7. una stretta relazione filogenetica tra donatore e ricevente.

Elementi essenziali

Nell'ottica di un'emissione sperimentale e in particolare di una messa in commercio ci si deve prefiggere, dal punto di vista della biosicurezza, di introdurre negli organismi geneticamente modificati solo i geni estranei che sono caratterizzati e necessari ad esprimere la caratteristica transgenica primaria desiderata.

Summary

Starting point and aims

Marker systems allow one organism – or cells from it – to be distinguished from those of another. They have therefore an important function in the construction of genetically modified organisms. The present study delivers an overview of the various marker systems and their applications and properties from the point of view of biosafety. In addition it describes the status of the technology with which molecular markers can be eliminated from a genetically modified organism after use.

Biological safety

For reasons of biological safety a GMO must be distinguishable from its wildtype; proving the presence of the GMO is performed using a marker. Where the differentiation can be made using the primarily desired transgenic properties, no additional marker is required. The transgenic properties of an organism that are not required for the planned use of a GMO should therefore be removed.

Removal of markers

There are molecular genetic techniques that make relatively targeted interventions into the genome possible, and permit the removal of markers that are no longer required. In plants, the technology for the targeted modification of the genome and particularly the elimination or replacement of whole genes, is still in its infancy. Current research results indicate, however, that even for plants that are more difficult to transform, such as wheat, it is possible to construct plants without markers and with the targeted integration of the gene for the desired characteristics. It is a prerequisite to plan for the later removal of genes already at the time of their integration into the genome.

Risk assessment

A risk assessment for bringing a genetically modified organism into circulation is extremely costly, because it concerns the release onto the market and thereby the potential broadest spread throughout the environment. The risk assessment uses a ”case by case” and ”step by step” procedure. The cost of a risk assessment increases, the more effects of the foreign DNA in a recombinant organism there are to evaluate. In terms of a field trial or bringing a genetically modified organism onto the market, there should therefore be the least modification necessary to produced the desired phenotype. A marker system must not present a danger to human beings or the environment in the release or putting on the market of a genetically modified organism.

Recommendations

The smaller the amount of foreign DNA present and the better characterised it is,

- the smaller the costs of the risk assessment
- the more reliable the result of the assessment
- the smaller the risk for human beings.

The goal is:

1. Complete characterisation of the inserted marker DNA.
2. A reduction in the foreign DNA to the sequences required, i.e. to the transgenic characteristics desired primarily, including the possibility of proving the presence of the GMO

3.a No selective advantage for the GMO through the marker DNA under nonspecific selective environmental conditions and

3.b No selective advantage through (genetically transmitted) marker DNA to another organism under nonspecific selective environmental conditions.

Reliability in proving the presence of the GMO and differentiation from its wildtype

4. High genetic stability
5. No mobilisation of the marker DNA; or mobilisation reduced to a minimum.
6. A close phylogenetic relationship between donor and recipient.

Essentials

For field trials of genetically modified organism, and in particular for bringing GMOs onto the market, the aim from the biosafety perspective is to introduce only those foreign genes which are characterised and necessary for the primarily desired transgenic characteristic.

1 Einleitung

1.1 Auftrag

Für die molekularbiologische Konstruktion von GVO sind bestimmte Selektionsmarker notwendig. Gewisse Marker gelten je länger je mehr als unerwünscht. Mit dieser Studie soll eine Übersicht über die Möglichkeiten geschaffen und eine Bewertung der verschiedenen Markersysteme vorgenommen werden.

Ziel der Arbeit ist es, die verschiedenen Markersysteme bezüglich ihrer für Mensch und Umwelt relevanten Eigenschaften zu beurteilen. Zu diesem Zweck sind aufzuzeigen:

- wozu Markersysteme nötig sind
- welche Möglichkeiten für Markersysteme bestehen und gebraucht werden
- welche Eigenschaften die verschiedenen Markersysteme aufweisen
- welche Kriterien zur Beurteilung verwendet werden können
- welche Eigenschaften aus Sicht der Gefährdung von Mensch und Umwelt unerwünscht oder nicht tolerierbar sind
- wie und zu welchem Zeitpunkt Markersysteme eliminiert oder ersetzt werden können.

Die verschiedenen Möglichkeiten für Markersysteme sind miteinander zu vergleichen.

1.2 Schwerpunkte

Die vorliegende Studie setzt folgende Schwerpunkte:

- Sie gibt eine Übersicht über die verschiedenen Markersysteme, ihre Einsatzmöglichkeiten und Eigenschaften.
- Sie liefert Grundlagen, um Markersysteme bezüglich ihrer für Mensch und Umwelt relevanten Eigenschaften beurteilen und miteinander vergleichen zu können.
- Davon ausgehend werden Anforderungen und Kriterien zur Beurteilung von Markersystemen abgeleitet.
- Sie beschreibt den Stand der Technik, wie Marker nach deren Verwendung wieder eliminiert werden können.

Als Prämissen gelten folgende Feststellungen:

- Ein ins Genom eingefügter Marker ist Teil der gentechnischen Veränderung. Ein Markergen wird als Spezialfall eines Fremdgens in einem GVO be-

trachtet. Die Überlegungen zu Markergenen lassen sich teilweise auch auf andere Fremdgene in einem GVO übertragen.

- Weil jede Risikobewertung kontextabhängig ist, werden keine absoluten Forderungen oder abschliessenden Klassierungen der Markersysteme vorgenommen. Es handelt sich um ein relatives System, das in erster Linie Vergleiche erlaubt.
- Bei einer Risikobewertung ist der Verwendungszweck eines GVO mitzuberücksichtigen, wobei im wesentlichen zwischen einer Kultivierung im geschlossenenen System, einem Freisetzungsversuch und einem Inverkehrbringen von lebenden Organismen zu unterscheiden ist.

1.3 Aufbau

Die verschiedenen Aspekte, welche für eine vergleichende Bewertung von Markersystemen von Bedeutung sind, werden in Kapitel 2 zusammengefasst und in den Kapiteln 6 und 7 vertieft. In der Praxis richtet sich die Auswahl von molekularen Markern nach den Kriterien der Zweckmässigkeit, Anwendbarkeit und der Risikobewertung. Die Berücksichtigung aller drei Aspekte erlaubt es, das optimale Markersystem auszuwählen. Das Kapitel 3 ist das zentrale Kapitel dieser Studie und erlaubt die vergleichende Bewertung der Markersysteme untereinander.Einen tabellarischen Vergleich zur Beurteilung verschiedener Markersysteme bezüglich dieser Kriterien befindet sich in Kapitel 3.2. In Kapitel 3.1 werden fünf Stufen der molekularbiologischen Eingriffstiefe und die Verbindung zur Risikobewertung definiert. Kapitel 3.3 bietet eine Übersicht zur Klassierung der verschiedenen Markersysteme aus dem Blickwinkel der Biosicherheit und dem für eine Risikobewertung erforderlichen Aufwand.
In Kapitel 4 und speziell in Kapitel 4.1 sind die Empfehlungen an ein Markersystem, welche zu einer Minimierung der Gefährdung von Mensch und Umwelt beitragen können, zusammengefasst. Hier sind die wichtigsten Überlegungen aufgezeigt, die für eine fallweise Beurteilung der Risikobewertung von molekularen Markern anzustellen sind.
Nicht mehr benötigte oder unerwünschte Markergene können aus einem Genom entfernt werden. In Kapitel 5 findet sich ein Übersicht zum Stand der molekularbiologischen Techniken, die ein gezieltes Entfernen von DNA-Sequenzen aus einem Genom erlauben.
Kapitel 6 bietet einen ausführlichen Überblick über die verschiedenen Systeme molekularer Marker. Markersysteme lassen sich einerseits aufgrund ihrer Anwendungsmöglichkeiten und andererseits aufgrund ihrer molekularbiologischen Funktionsweise definieren. Die molekulare Funktionsweise eines Markersystems ist jeweils relevant für die Bewertung der Gefährdung von Mensch und Umwelt.
In Kapitel 7.1 und 7.2 sind die wichtigsten Anforderungen an ein Markersystem aus Sicht der Anwendung beschrieben.
Das Kapitel 8 bietet eine Auswahl von Stellungnahmen und Entscheiden vor allem in Zusammenhang mit Antibiotikaresistenzmarkern.

Eine Studie zu einem komplexen und sich entwickelnden Thema wie das der molekularen Marker kann nie abschliessend sein. In Kapitel 9 sind deshalb neben der zitierten Literatur in Kapitel 10 weitere Informationsquellen für eine vertiefte Beschäftigung mit dem Thema aufgelistet und kommentiert.

1.4 Begriffe

Die Begriffe **molekulare Marker**, **Marker** und **Markersysteme** werden in dieser Studie synonym gebraucht.

Es besteht eine Verbindung zwischen den Begriffen des „**biologischen Risikos**“ und der „**Biosicherheit**“. Sie beziehen sich auf je eine Seite, welche zur selben Medaille gehören. Dies lässt sich mit dem nachfolgenden Satz transparent machen: Eine Risikobewertung kann zum Ziel haben, das biologische Risiko zu bestimmen und durch bestimmte Massnahmen zu minimieren, um so die Biosicherheit zu erhöhen.
Das heisst, dass mit der Benutzung des Begriffes „biologisches Risiko“ die negativen Auswirkungen durch eine bestimmte biologische Eigenschaft im Fokus stehen und durch die Verwendung des Begriffes „Biosicherheit“ die Minimierung des biologischen Risikos etwa durch eine bestimmte Massnahme betont wird.

Der Begriff des **biologischen Systems** wird hier zusammenfassend für den biologischen Kontext, in den ein Marker eingefügt wird, verwendet. Der Empfängerorganismus (Prokaryont, Pflanze, Tier etc.) und die entsprechende Kompatibilität von Empfänger und Marker sind wichtige Aspekte des biologischen Kontextes.

2 Übersicht zu Markersystemen und Aspekte der Risikobewertung

2.1 Definition, Bedeutung und praktische Anforderungen

Definition

Molekulare Marker sind Merkmale auf Basis der Erbinformation (betrifft Genotyp und Phänotyp) und erlauben es, einen Organismus – oder Zellen davon – von einem anderen Organismus zu unterscheiden.
Das ist erstens möglich mittels eines bereits zum Organismus gehörenden, spezifischen Gens bzw. einer DNA-Sequenz (*intrinsic marker*) oder zweitens mit Hilfe eines zusätzlichen, gentechnisch eingefügten Markergens oder drittens aufgrund des Fehlens oder des Defekt-Seins eines Gens (Auxotrophie-Mutante).
Die Unterscheidung ist auf molekularer Ebene (Nachweis von DNA-Sequenzen oder Proteinen) oder als Ergebnis von exprimierten Genen auf phänotypischer Ebene (direkt sichtbar) möglich.

Diese Definition macht deutlich, dass es in der Praxis fast beliebig viele Marker gibt. Etwas begrenzter ist die Auswahl, wenn die Unterscheidbarkeit zusammen mit einer Selektionsmöglichkeit kombiniert wird. Selektionsmarker kommen in der Molekularbiologie am häufigsten zur Anwendung.

Von der Aufgabe her, die Markersysteme zu erfüllen haben, lassen sich drei unterschiedliche Aufgaben und damit Anwendungsbereiche definieren:

- Nachweisbarkeit (von Zellen oder Organismen)
- Sichtbarmachen molekularer oder zellulärer Prozesse (z.B. Genexpression)
- Gezielte Selektion bzw. Auslese einer spezifischen Gruppe von Zellen oder Organismen (z.B. von Transformanten)

Es lässt sich somit zwischen Nachweismarkern, Reportergenen und Selektionsmarkern unterscheiden, wobei je nach Markersystem eine mehrfache Zuordnung möglich ist. Jedes Markersystem ist ein Nachweismarker, weil dafür auch nicht-exprimierte oder nicht-kodierende DNA-Sequenzen verwendet werden können. Reportergene machen physiologische Abläufe sichtbar; im Gegensatz zu Nachweismarkern werden sie exprimiert. Selektionsmarker schliesslich erlauben die Auslese von Zellen oder Organismen unter selektiven Wachstumsbedingungen. Als Übersicht eignen sich die beiden Broschüren von Jansson (2000 und 1998); vergleiche auch Kapitel 7.1.

Bei der Auswahl eines Markersystems sind unterschiedliche Anforderungen, die es erfüllen muss und soll, gegeneinander abzuwägen.

Abbildung 1: Kriterien an ein Markersystem

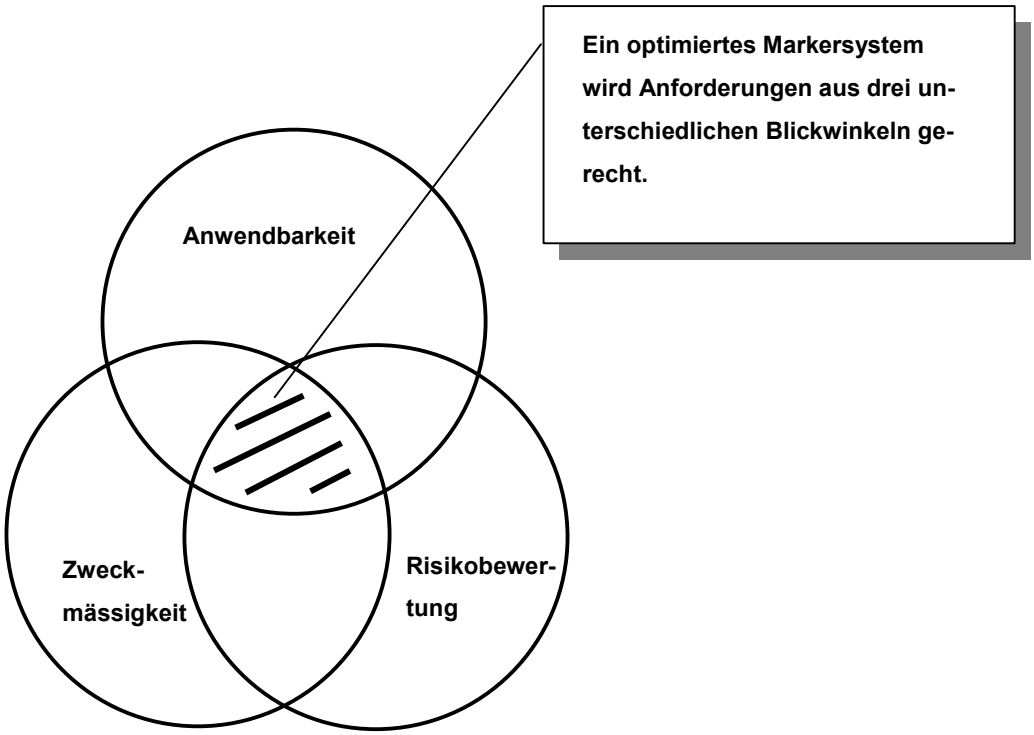

Abbildung 1 stellt dar, dass die Anforderungen an ein optimiertes Markersystem von drei Seiten her bestimmt werden. Zu berücksichtigen sind die:

1. Anforderungen aufgrund der Zweckmässigkeit (experimenteller Ansatz)
2. Anforderungen aufgrund der Anwendbarkeit (biologisches System)
3. Anforderungen aufgrund der Risikobewertung (Eingriffstiefe, Charakterisierung etc.).

Die Tabelle 2 auf Seite 27 vergleicht die verschiedenen Markersysteme unter Berücksichtigung der drei oben genannten Anforderungen.

2.2 Gruppierung aufgrund der molekularen Funktionsweise

Eine Unterscheidung verschiedener Markersysteme ist auch aufgrund ihrer molekularbiologischen Funktionsweise möglich.

Im wesentlichen lassen sich unterscheiden die:

- Resistenzmarker (Selektionsmarker):
  - Antibiotikaresistenzmarker
  - Herbizidtoleranzmarker
  - Schwermetalltoleranzmarker
- Erweiterter Metabolismus als Selektionsmarker
- Farbstoffmarker
- Lumineszenzmarker
- Fluoreszenzmarker
- Nukleotidmarker
- Auxotrophiemarker
- Oberflächenmarker

Resistenzmarker sind grösstenteils identisch mit Selektionsmarkern und werden am meisten verwendet, weil sie eine Selektion eines Organismus, im speziellen von Transformanten, ermöglichen.
Die meisten Resistenzmarker, „der erweiterte Metabolismus als Selektionsmarker“, Farbstoffmarker und Lumineszenzmarker sind metabolische Marker. Damit wird betont, dass die Funktion dieser Systeme auf einer enzymatischen Reaktion beruht.

2.3 Umweltrelevante Informationen für die Risikobewertung

Von zentraler Bedeutung für die Risikobewertung von Markergenen sind die Angaben zu nachfolgenden Aspekten:

1. Charakterisierung / Eigenschaften der gentechnisch eingefügten (Marker-) DNA und des GVO
2. Identifikation von potenziell „kritischen“ Eigenschaften (Resistenzen, unbekannte DNA, nicht benötigte DNA)
3. Selektionsvor- und -nachteil / möglicher Fitnessgewinn
4. Unterscheidbarkeit, Nachweis, Monitoring
5. Genetische Stabilität / Rekombinationsfreudigkeit
6. Mobilisierbarkeit, Gentransfer
7. Phylogenetische Verwandtschaft bzw. Distanz von Spender und Empfänger.

2.4 Bedeutung der Eingriffstiefe für die Risikobewertung

Bei der Einführung eines Markersystems in einen Organismus sind die molekularbiologischen Veränderungen in einem biologischen System unterschiedlich weitreichend. Für den Vergleich von verschiedenen Markersystemen wird die Eingriffstiefe in den Organismus, welche durch das Markersystem entsteht, abgeschätzt. Die Eingriffstiefe wird zum Kriterium für die Einstufung eines Markersystems bezüglich seiner biologischen Sicherheit. Als Definition für die Eingriffstiefe gilt:

Eingriffstiefe Je weitreichender die molekulargenetischen Veränderungen im Genom einer Zelle oder einem Organismus sind, umso grösser ist die Eingriffstiefe. Aus Sicht der Risikobewertung sind hier nur die neu hinzugefügten (nicht die entfernten) Gene von Bedeutung.

Für den Zusammenhang zwischen Eingriffstiefe und Risikobewertung gilt:

Eingriffstiefe und Risikobewertung Mit der zunehmenden Eingriffstiefe ins Genom und in die Physiologie eines Organismus werden die daraus resultierenden Effekte komplexer und schwieriger abzuschätzen. Dies bedeutet die grundsätzliche Zunahme der Unsicherheit und damit auch des Aufwandes für die Risikobewertung.

Umgekehrt gilt ebenso: Je geringer die Eingriffstiefe bzw. die Abweichung vom Wildtyp, umso weniger aufwändig ist grundsätzlich die Risikobewertung und umso geringer sind die Unsicherheiten bezüglich Aussagen zur Biosicherheit, also zur biologischen Gefährdung von Mensch und Umwelt.

Bezogen auf die Markersysteme gilt, dass der Grad der prinzipiellen Unsicherheit bei einer Risikobewertung zunimmt, je undefinierter das eingesetzte Markersystem ist. Zwar kann auch der Einsatz eines definierten Markersystems aus Sicht der Biosicherheit fragwürdig erscheinen, etwa der Einsatz eines Antibiotikaresistenzmarkers bei einem oralen Lebendimpfstoff. Dies lässt sich aber in der Risikobewertung argumentativ begründen.

3 Vergleichende Bewertung von Markersystemen

Im vorhergehenden Kapitel 2.4 wurde der Begriff der Eingriffstiefe und der Zusammenhang mit der Risikobewertung erläutert. In diesem Kapitel werden die verschiedenen Markersysteme gemäss ihrer molekularbiologischen Basis unterschieden und aus dem Blickwinkel der Risikobewertung miteinander verglichen.

3.1 Gruppierung nach Grad der Gefährdung von Mensch und Umwelt

Die Tabelle 1 auf Seite 9 erlaubt eine qualitative Differenzierung verschiedener Markersysteme. Sie stützt sich auf die Eingriffstiefe in Genom und Physiologie eines Organismus, und die Aufteilung geschieht aus dem Blickwinkel der Biosicherheit.

In Tabelle 1 wird die Eingriffstiefe für das Genom und die Zellphysiologie graduell abnehmend aufgeteilt. Die Aufteilung ist qualitativ und reicht von der Insertion eines Operons mit mehreren eventuell nicht charakterisierten Genen (beispielsweise für eine Schwermetallresistenz) bis zur Deletion eines Gens, wo keine Fremd-DNA integriert wird (beispielsweise für einen Auxotrophiemarker).

Tabelle 1: Klassierung der Markersysteme nach Unsicherheit bei der Risikobewertung

Eingriffstiefe			Markersystem	Unsicherheit bei der Risiko-bewertung (abnehmend)
Grad der molekularen Veränderung	**Ebene Genom (DNA)**	**Ebene Phänotyp, Eigenschaft (Protein)**		
Grad 5	mehrere externe Gene exprimiert (Genkassette, Operon)	Mehrere Enzyme (Enzymkaskade) exprimiert Zellwandänderungen	Antibiotikaresistenz Herbizidtoleranz Schwermetalltoleranz	
Grad 4	ein bis zwei externe expri-mierte Gene [1)]	Protein: z.B. Enzym für Antibiotika- oder Herbizidresistenz (Veränderung der Zellphysiologie möglich)	Antibiotikaresistenz Herbizidtoleranz Schwermetalltoleranz Erweiterter Metabolismus Farbstoffmarker Lumineszenzmarker	
Grad 3	externes, exprimiertes Gen	keine Veränderung der Zellphysiologie[3)]	Fluoreszenzmarker [4)]	
Grad 2	externe, nicht funktionelle [2)] Sequenz	keine Veränderung der Zellphysiologie [3)]	Nukleotidmarker (Nachweismarker)	
Grad 1	defektes „eigenes“ Gen	Fehler („Defizienz“) [5)]: z.B. Auxotrophie-Mutation	Auxotrophiemarker	

1) Ein intaktes, aber im entsprechenden Empfängerorganismus nicht exprimiertes Gen wird in der Risikobewertung ähnlich gewichtet, weil die Möglichkeit und Konsequenzen der Expression in einem anderen Organismus nach einem horizontalen Gentransfer einzubeziehen sind.

2) Eine nicht-funktionelle Sequenz ist nicht-kodierend und hat auch keine Promotor- oder Transposonfunktion mehr (ein defektes Gen kann ebenfalls zu dieser Kategorie gezählt werden).

3) Der Positionseffekt ist zu beachten: Die Integration der (nicht)-kodierenden DNA kann ein intaktes Gen ausschalten und beispielsweise eine Auxotrophie auslösen.

4) Fluoreszenzmarker sind keine metabolischen Marker im Gegensatz zu Antibiotikaresistenz-, Herbizidtoleranz-, Schwermetalltoleranz-, Farbstoff- und Lumineszenzmarkern.

5) Ein solcher Fehler („Defizienz“) kann mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit (bei Bakterien in der Grössenordnung von 10^{-6} pro Zellteilung) auch natürlicherweise entstehen. Falls Defizienz nicht mittels eines gentechnischen Verfahrens gemäss der Einschliessungs-, Freisetzungs- oder Arbeitnehmerschutzverordnung hergestellt wird, sondern beispielsweise durch Mutagenese, gelten die „Defizienzmutanten“ nicht als gentechnisch veränderte Organismen. Es ist offensichtlich, dass eine „Defizienzmutation“ manchmal auch gravierende Auswirkungen in der Zellphysiologie zur Folge haben kann.

3.2 Vergleich bezüglich Anwendungsmöglichkeiten und Risikobewertung

Aus Sicht der Biosicherheit ist die Unterscheidung von Markersystemem aufgrund ihrer molekularen Funktionsweise von Bedeutung, und zwar, weil sich verschiedene Eingriffstiefen in das Genom und die Physiologie des Organismus unterscheiden lassen. Die Tabelle 2 erlaubt den Vergleich der verschiedenen Markersysteme (Spalte links) untereinander.
Diese Tabelle stellt die konzentrierte Form der in dieser Studie bearbeiteten Themen dar.

Tabelle 2: Tabellarische Zusammenstellung der Markersysteme bezüglich Anwendungsmöglichkeiten und Risikobewertung

Markersystem	**Zweckmässigkeit** (Anwendung als)			**Verwendbarkeit im biologischen System**						**Risikobewertung**				
										Eingriffstiefe Grad				
										5	**4**	**3**	**2**	**1**
	Nachweis	Reporter	Selektion	Viren	Bakterien	Pilze	Insekten	Tiere	Pflanzen	metabolische Marker				
Antibiotikaresistenz	(+)	(+)	+	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	x	x			
Herbizidtoleranz	(+)	(+)	+	–	–	–	–	–	+	x	x			
Schwermetalltoleranz	(+)	(+)	+	–	+	+	(+)	+	+	x	x			
Erweiterter Metabolismus	(+)	(+)	+	–	+	+	+	+	+	(x)	x			
Farbstoffmarker	(+)	+	–	+	+	+	(+)	(+)	+	(x)	x			
Lumineszenzmarker	(+)	+	–	+	+	+	+	(+)	+	(x)	x			
Fluoreszenzmarker	+	+	–	+	+	+	+	+	+			x		
Nukleotidmarker	+	–	–	+	+	+	+	+	+				x	
Auxotrophiemarker	(+)	(+)	+	+	+	+	(+)	(+)	(+)					x

Legende

- **+** geeignet
- **(+)** geeignet je nach Markertyp und System
- **–** nicht geeignet; nicht vorhanden
- **x** trifft zu
- **(x)** trifft teilweise zu

Erläuternde Bemerkungen und Verweise

Die neun Markersysteme, welche in Kapitel 6 näher charakterisert sind, werden in Bezug auf Zweckmässigkeit, bzw. erforderliche (gewünschte) Aufgabe, der Verwendbarkeit im biologischen System und der Risikobewertung miteinander verglichen.

Die Aufgaben und die Bedeutung von Markersystemen werden in Kapitel 7.1 vertieft ausgeführt. Der Hintergrund für die Risikobewertung wird unter anderem in den Kapiteln 2.4, aber auch in Kapitel 7.3 weiter ausgeführt.

Unterscheidung zwischen Eingriffstiefe Grad 5 und 4

Die Unterscheidung in der Tabelle 2 für die Risikobewertung bei der Eingriffstiefe Grad 5 und 4 ist relativ gering. Eine weitergehende Differenzierung ist nur möglich bei einer Fall-zu-Fall-Betrachtung einzelner Marker in einem vorgegebenen Empfängerorganismus.

Green Fluorescent Protein

Der Fluoreszenzmarker GFP (*Green Fluorescent Protein*) hat keine Anwendung als Selektionsmarker im strengen Sinne; er ist aber ein sehr gutes Reportersystem und kann über DNA-Hybridisierung auch als Nachweismarker dienen. GFP kann in sämtlichen biologischen Systemen verwendet werden. Die Eingriffstiefe ist mit Grad 3 mässig: der Organismus exprimiert ein (kleines) Protein, welches nicht mit dem Zellmetabolismus interferiert.

Risikobewertung des Auxotrophiemarkers

Aus dem Blickwinkel der Biosicherheit ist der Auxotrophiemarker der ideale Marker. Ein Organismus mit einem Auxotrophiemarker, der nicht durch gentechnische Verfahren gemäss der schweizerischen Gesetzgebung (Einschliessungs-, Freisetzungs- und Arbeitnehmerschutzverordnung, entstanden ist, gilt nicht als gentechnisch veränderter Organismus. Auxotrophiemarker erfüllen andererseits die Anforderungen bezüglich einem „einfachen Monitoring“ und der „Selektionsmöglichkeiten“ nur begrenzt, weil experimentell meist aufwändige Anordnungen erforderlich sind, um einen Organismus mit einem Fehler (Mangel) gegenüber dem „intakten“ Wildtyp zu selektionieren.

3.3 Vergleich bezüglich Aufwand für die Risikobewertung

Tabelle 3 zeigt den Zusammenhang zwischen der Eingriffstiefe in einen Organismus und dem erforderlichen Aufwand, um das entsprechende Markersystem gemäss dem Fragenkatalog der FrSV bzw. der europäischen Freisetzungsrichtlinie zu charakterisieren. Die verschiedenen Punkte, zu denen Informationen zu einem Markersystem geliefert werden müssen, sind in Kapitel 8.3 hergeleitet.

Tabelle 3: Aufwand für die Risikobewertung bei verschiedenen Markertypen

	Eingriffstiefe (Grad der molekularen Veränderung)				
	Grad 5	**Grad 4**	**Grad 3**	**Grad 2**	**Grad 1**
	mehrere Fremdgene exprimiert	1-2 Fremdgene exprimiert	1 Fremdgen exprimiert; keine Interaktion mit Metabolismus	externe, nicht funktionelle Sequenz (bsp. auch defektes externes Gen)	defektes „eigenes“ Gen
Umwelt-relevante Informationen für die Risikobewertung	Resistenzmarker (z.T. auch Erweiterter Metabolismus, Farbstoffmarker und Lumineszenzmarker)	Resistenzmarker Erweiterter Metabolismus Farbstoffmarker Lumineszenzmarker	Fluoreszenzmarker	Nukleotidmarker (Nachweis)	Auxotrophiemarker
Charakterisierung/ Eigenschaften	sehr aufwändig; begrenzt machbar	aufwändig	einfach	sehr einfach	sehr einfach
Potenzielle „kritische“ Eigenschaften	möglich; von Fall zu Fall abklären	möglich; von Fall zu Fall abklären	kaum vorhanden	kaum vorhanden	nicht vorhanden
Selektionsvor- und -nachteil / möglicher Fitnessgewinn	möglich; von Fall zu Fall abklären, speziell bei Resistenzmarkern	möglich; von Fall zu Fall abklären, speziell bei Resistenzmarkern	irrelevant	irrelevant	Fitnessreduktion
Unterscheidbarkeit, Nachweis, Monitoring	einfach bis sehr einfach bei Selektionsmarkern	einfach bis sehr einfach	möglich (wie Grad 2)	möglich	möglich
Genetische Stabilität / Rekombinationsfreudigkeit	von Fall zu Fall abklären	von Fall zu Fall abklären	von Fall zu Fall abklären	kaum relevant	irrelevant
Mobilisierbarkeit, Gentransfer	von Fall zu Fall abklären	von Fall zu Fall abklären	kaum relevant	kaum relevant	irrelevant
Phylogenetische Verwandschaft	relevant	relevant	kaum relevant	kaum relevant	irrelevant

Die Reduktion des Aufwandes für eine Risikobewertung lässt sich beispielsweise am Unterschied von Eingriffstiefe Grad 2 und 3 erläutern: Bei Grad 2 müssen bei der Risikobewertung die Aspekte des Positionseffektes (z.B. Inaktivierung oder Störung eines Genes an der Integrationsstelle) und die Fragen nach dem horizontalen Gentransfer abgeklärt werden. Sobald jedoch ein Gen exprimiert (Grad 3) wird, müssen bei der Risikobewertung – beispielsweise für ein gentechnisch verändertes Lebensmittel – zusätzlich die Aspekte der Allergenität und der Toxizität des Proteins abgeklärt werden.

Beispiel Kanamycin-resistenz

In transgenen Pflanzen kann das Gen für die Kanamycinresistenz exprimiert werden. Lebensmittel aus solchen Pflanzen enthalten das entsprechende Protein, eine Aminoglycosid 3‘-Phosphotransferase II (APH(3‘)II). In den USA musste deshalb für die Vermarktung bei der Food and Drug Administration FDA eine Bewilligung eingeholt werden, dieses Protein als Lebensmittelzusatz verwenden zu dürfen (FDA, 1998).

Zusätzlich sind Untersuchungen zu allenfalls störenden Effekten der Zellphysiologie und deren Konsequenzen durch ein exprimiertes Markergen – allenfalls mit metabolischen Eigenschaften – notwendig. Der Unterschied von Grad 3 zu 4 liegt beispielsweise darin, dass viele Markersysteme metabolische Marker sind und mit dem Zellstoffwechsel interagieren können.

Metabolische Marker und Eingriffstiefe

Markersysteme, welche auf einer enzymatischen Reaktion basieren, können prinzipiell mit dem Zellstoffwechsel interagieren. Die Auswirkungen auf die Physiologie eines Wirtsorganismus sind deshalb abzuklären. Metabolische Marker sind bei den meisten Markertypen vertreten. Dazu zählen Antibiotikaresistenzmarker auf der Basis der ß-Lactamase, aber auch Farbstoffmarker wie beispielsweise das *lac* ZY, X-Gal-System.

„Positiv-Selektion“ bei Pflanzen

Die in Kapitel 7.4 als alternative Möglichkeiten zu den Herbizidmarkern beschriebenen Selektionssysteme erlauben eine sogenannte „positive Selektion“ von transgenen Pflanzen, indem sie mit dem transferierten Gen eine zusätzliche C-Quelle verwerten können. Sie sind – wie die Herbizidmarker – metabolische Marker und in der Tabelle 3 ebenfalls in die Spalte „Grad 4“ einzuteilen. Im Vergleich zu den anderen Selektionssystemen, die auf Antibiotika oder Herbiziden als selektivem Wirkstoff basieren, haben diese alternativen Systeme den ökologischen Vorteil, entsprechend unproblematische Selektionssubstanzen zu benötigen.

Zusätzliche Kohlenstoffquelle und Fitnessvorteil

Zu bedenken ist aber, dass mit diesen Positiv-Selektionssystemen den transgenen Pflanzen die Eigenschaft gegeben wird, eine zusätzliche Kohlenstoffquelle zu nutzen. Bei der Risikobewertung ist deshalb genau zu prüfen, ob hier nicht ein ökologisch unerwünschter Fitnessvorteil geschaf fen wird.

4 Schlussfolgerungen

4.1 Empfehlungen für Markersysteme zur Minimierung der Gefährdung von Mensch und Umwelt

Es gibt keine festgeschriebene Methodik, wie eine Risikobewertung auf der Basis der in den Richtlinien geforderten Informationen durchgeführt werden muss. Aufgrund der umweltrelevanten Informationen, die für eine Risikobewertung eines Markers erhoben werden, lassen sich aber Empfehlungen für die molekularbiologischen Eigenschaften ableiten.
In Tabelle 4 werden diese Empfehlungen an Markersysteme formuliert. Sie basieren auf Annahmen zur Risikobewertung, die sich implizit aus der FrSV und der Freisetzungsrichtlinie der EU ergeben. Dieselben Überlegungen bzw. Forderungen gelten zum grossen Teil analog für die Insert-DNA mit der primär erwünschten Eigenschaft des GVO.

Tabelle 4: Empfehlungen für die Verwendung von Markern ausgehend von der FrSV

Anzustreben ist:

1. Eine vollständige Charakterisierung der inserierten Marker-DNA
2. Eine Reduktion der Fremd-DNA auf die notwendigen Sequenzen, d.h. auf die primär erwünschten, transgenen Eigenschaften inklusive der Möglichkeit des Nachweises des GVO

3.a Kein Fitnessvorteil des GVO durch die Marker-DNA unter nicht-spezifischen, selektiven Umweltbedingungen und

3.b Kein Fitnessvorteil durch (Gentransfer übertragene) Marker-DNA in einem anderen Organismus bei nicht-spezifischen, selektiven Umweltbedingungen

4. Zuverlässige Nachweisbarkeit des GVO und Unterscheidbarkeit von seinem Wildtyp
5. Eine hohe genetische Stabilität
6. Keine oder auf ein Minimum reduzierte Mobilisierbarkeit der Marker-DNA
7. Eine nahe phylogenetische Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger.

Ermessenspielraum je nach Anwendung

Diese Empfehlungen gelten nicht absolut, sondern sie zeigen die Zielrichtung der Richtlinien auf. Es liegt im Ermessensspielraum der Bewilligungsinstanzen, in jedem einzelnen Fall zu beurteilen und zu begründen, ob diese sieben Empfehlungen bezogen auf die Verwendung des GVO erfüllt sind oder nicht. Dabei gilt es insbesondere auch zu berücksichtigen, ob ein GVO im Hinblick auf die Verwendung im Labor bzw. geschlossenen System oder für eine experimentelle Freisetzung oder für ein Inverkehrbringen beurteilt werden muss.

4.2 Begründung der einzelnen Forderungen

Charakterisierung

Die Charakterisierung bedeutet das Bestimmen der DNA-Sequenz, der Kopienzahl der Sequenz, deren Integrationsort(e) sowie deren Funktion bzw. der Funktion des exprimierten Proteins. Das heisst, dass unbekannte und nicht funktionelle DNA-Sequenzen von Anfang an zu vermeiden oder aber für ein Bewilligungsgesuch zu charakterisieren sind.

Reduktion der Fremd-DNA

Je weniger Unbekanntes bei einem GVO für ein Bewilligungsgesuch zu charakterisieren ist, desto geringer der Arbeitsaufwand für ein Bewilligungsgesuch und umso einfacher ist es, im Sinne einer konservativen Risikophilosophie bei der Beurteilung des Risikos auf der „sicheren Seite“ zu sein.

In der Konsequenz bedeutet dies das Vermeiden oder Eliminieren von nicht mehr benötigten Sequenzen.

Fitnessvorteil

Der GVO darf aufgrund der Marker-DNA keinen Fitnessvorteil (biologischen Wettbewerbsvorteil) unter nicht-spezifischen, selektiven Umweltbedingungen erhalten. Ein Fitnessvorteil darf nur zustandekommen, wenn die für den Marker spezifischen Selektionsbedingungen (z.B. Antibiotika oder Herbizid) vorliegen.

Dieselbe Forderung nach fehlendem Fitnessvorteil durch die Marker-DNA gilt auch für die Anwesenheit derselben in anderen Organismen. Denn ein Gentransfer der Marker-DNA auf einen anderen Organismus kann nicht *a priori* ausgeschlossen werden. Die Wahrscheinlichkeit für einen solchen Gentransfer kann allerdings variieren.

Aus evolutionsbiologischer und ökologischer Sicht ist entscheidend, dass unter natürlichen, d.h. unter nicht gezielt vom Menschen aufrechterhaltenen Umweltbedingungen, keine Selektionsfaktoren vorkommen dürfen, die einem Organismus, der die Marker-DNA aufgrund eines Gentransfers erhalten hat, einen Fitnessvorteil gewähren. Ein solcher Fitnessgewinn kann sich in der Etablierung des Organismus in einer neuen Öko-Nische oder in der Verdrängung von Wildtypen in derselben Öko-Nische auswirken.

Nachweis- und Unterscheidbarkeit

Idealerweise kann die primär erwünschte, transgene Eigenschaft des GVO die Nachweisbarkeit und Unterscheidbarkeit auf (phänotypischer oder auf DNA-Ebene) gewährleisten. Ein separates Merkmal allein zum Zweck des Monitorings ist aus dem Blickwinkel der Biosicherheit (nach Punkt 2) nur die zweitbeste Variante.

Genetische Stabilität

Die hohe genetische Stabilität ist zusammen mit der nachgewiesenen inexistenten oder auf ein Minimum reduzierten Mobilisierbarkeit des Inserts einerseits aus Sicht der Produktequalität und andererseits aus Sicht der Biosicherheit wichtig.

Mobilisierbarkeit

Die Rekombinationsfreudigkeit bzw. -häufigkeit und dadurch die Mobilisierbarkeit ist erhöht bei Homologien mit anderen Genen innerhalb des Genoms und betrifft auch den Aspekt der Stabilität. Homologien mit Genen in nicht verwandten Organismen sind ebenfalls zu beachten, weil über ein Wirt-Parasit-Verhältnis (z.B. Bakterien-Bakteriophagen oder Pflanzen-Viren) ein Genaustausch durch Rekombination möglich ist.

Phylogenetische Verwandtschaft

Im Grundsatz gilt: Das biologische Risiko ist umso schwieriger abzuschätzen, je grösser die phylogenetische Distanz der miteinander rekombinierten Organismen bzw. der betreffenden DNA ist. Ausnahmen sind genetische Rekombinationsmöglichkeiten aufgrund bestimmter Wirte-Parasiten-Verhältnisse, welche zwischen komplett verschiedenen Arten vorkommen können.

Damit ist nicht gesagt, dass beispielsweise das Einfügen eines Toxingens von einem Enterobakterium in eine nah verwandte Art kein Risiko bedeutet. Aber diese Risikobewertung ist methodisch durchführbar, und es kann davon ausgegangen werden, dass ein solcher Gentransfer auch natürlicherweise auftreten kann.

Mit den evolutionsbiologischen Risiken der Gentechnologie werden die langfristigen Einflüsse auf evolutionäre Prozesse bezeichnet. Je unwahrscheinlicher die Rekombinationsereignisse in der natürlichen Umgebung sind, umso stärker ist die evolutionsbiologische Eingriffstiefe zu gewichten.

Die Verwandtschaft zwischen Spender und Empfänger darf jedoch nicht dazu führen, dass das Markergen natürlicherweise zwischen GVO und Wildtyp übertragen wird. Die aus Sicht der Biosicherheit geforderte Unterscheidbarkeit zwischen GVO und Wildtyp könnte so nicht mehr gewährleistet werden.

Beispiel: Nahrungsmittelsicherheit von transgenen Pflanzen

Aus der Sicht der Biosicherheit und insbesondere der Nahrungsmittelsicherheit ist bei Pflanzen ein Marker vorzuziehen, der aus einer anderen Pflanze stammt, die für den menschlichen Konsum ebenfalls geeignet ist. Beispiele: Thaumatin-II- oder Anthocyanin- Biosynthese (siehe Kruse und Jansson, 1997; Seite 37).

4.3 Ziel der Minimierung der Gefährdung von Mensch und Umwelt

Der Aufwand für eine Risikobewertung steigt, je mehr Effekte der Fremd-DNA in einem rekombinanten Organismus abzuschätzen sind. Dieser Aufwand kann minimiert werden und parallel dazu die Gefährdung von Mensch und Umwelt, wenn bei einem GVO nur diejenigen molekularbiologischen Veränderungen vorgenommen werden, die zum gewünschten Phänotyp beitragen. Das bedeutet, dass diejenigen transgenen Eigenschaften eines Organismus, die für die vorgesehene Verwendung eines GVO nicht mehr benötigt werden, zu eliminieren sind. Als Beispiel sei an die Gene für Antibiotikaresistenzen in transgenen Pflanzen erinnert, welche Bewilligungsverfahren unnötig kompliziert haben, obwohl diese Gene für den Verwendungszweck der transgenen Pflanzen irrelevant sind.

Aus dem im Umweltschutzgesetz verankerten Vorsorgeprinzip ergibt sich, dass unnötige Risiken zu vermeiden sind. Das Vorsorgeprinzip wird so interpretiert, dass ein Erkenntnisfortschritt oder das Inverkehrbringen eines GVO mit der am wenigsten riskanten, technisch möglichen Variante realisiert wird.

Beachtung des Vorsorgeprinzips

Aus Sicht des Vorsorgeprinzips ist die Verwendung eines Markersystems anzustreben, das beim GVO die Selektion der erwünschten Eigenschaft erlaubt und eine klare Unterscheidbarkeit zum Wildtyp ermöglicht. Wo diese Unterscheidbarkeit (für ein Monitoring) mit Hilfe der primär erwünschten Eigenschaft machbar ist, braucht es im GVO keinen weiteren Marker mehr. Das heisst beispielsweise, dass Markergene, welche in einem freizusetzenden GVO keine Funktion mehr haben, aufgrund des Vorsorgeprinzips unerwünscht sind und deshalb aus dem Genom entfernt werden sollen (siehe dazu Kapitel 6).

Ein zusätzlicher Grund, einen Marker aus einer transgenen Pflanze wieder zu entfernen, ergibt sich auch im Interesse der Weiterentwicklung transgener Pflanzen, so dass für die Züchtung nicht immer neue Markersysteme verwendet werden müssen.

Auch die Verwendung von Auxotrophiemarkern entspricht der Anforderung, dass in einem transformierten Organismus kein externes Markergen verbleibt. Denn mit dem Markergen wird ein zuvor aus dem Organismus entferntes Gen wieder ersetzt (siehe dazu Kapitel 7.9). Das Prinzip der Auxotrophiemarker bedingt aber eine etwas aufwändigere Vorbereitung des Empfängerorganismus und eine andere Vorgehensweise zur Selektionierung. Dies lässt sich aber möglicherweise rechtfertigen, wenn eine erhöhte Biosicherheit und Vorteile in der Bewilligung und Zulassung eines Produktes zu erwarten sind.

In der Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass die Anforderungen an die biologische Sicherheit, die ein Organismus ausgehend von seinen biologischen Eigenschaften zu erfüllen hat,

von der Anwendung im geschlossenen System bis zur experimentellen Freisetzung und dem Inverkehrbringen laufend steigen. Das widerspiegelt sich auch in den Anforderungen der entsprechenden Gesetze, Verordnungen und Richtlinien. Deshalb gilt grundsätzlich, dass für einen GVO die jeweils geringste notwendige Veränderung anzustreben ist, um den gewünschten Phänotyp des GVO zu erzielen.

5 Stand der Technik für das Entfernen von Markern

Dieses Kapitel gibt eine Übersicht zum Stand der molekularbiologischen Technik, mit der nicht mehr benötigte oder unerwünschte Markergene inaktiviert oder aus einem Genom entfernt werden können. Diese Techniken haben verschiedene Namen wie etwa *Gene targeting*, *Gene replacement* oder *knock-out*-Technik.

5.1 Vielfalt und Spezifität der molekulargenetischen Möglichkeiten

Bei jedem Organismus gibt es theoretisch die Möglichkeit, ein einmal eingefügtes Gen wieder aus dem Genom zu entfernen. In der Praxis ist dies jedoch sehr unterschiedlich realisierbar und hängt stark von der taxonomischen Zugehörigkeit eines Organismus ab. Zudem ist es abhängig davon, wie gut sich ein Organismus transformieren lässt und wie gut eine biologische Art molekularbiologisch erforscht ist.
Grosse Unterschiede gibt es beispielsweise bei den Pflanzen, wo bei den Dikotyledonen (Zweikeimblättrige) wie Tabak (*Tabacum nicotina*) mit den *Ti*- Plasmiden von *Agrobacterium tumefaciens* einfachere Transformationstechniken vorhanden sind als bei den Monokotyledonen wie Reis (*Oryza sativa*) und Mais (*Zea mays*).

Im Prinzip sind es homologe Rekombinationsereignisse, die einen gezielten bzw. ortsspezifischen Eingriff in ein Genom überhaupt ermöglichen. Dazu sind allerdings Hilfskonstrukte notwendig, von denen nachfolgend einige Beispiele näher erläutert werden.

Bei höheren Organismen mit mehreren Chromosomen gibt es auch die Möglichkeit, nach einer Doppeltransformation, bei der das Markergen und das primär gewünschte Gen auf zwei verschiedenen Chromosomen zu liegen kommen, den Marker durch Segregation wieder zu entfernen oder – treffender ausgedrückt – im Laufe der Züchtung „gezielt“ zu verlieren.

5.2 „Gene targeting“ / „Gene replacement“ / „Gene knock-out technology“

Gene targeting ist eine Technik, welche in einem Genom die gezielte Inaktivierung eines Gens erlaubt. Bei Bakterien und niederen Eukaryonten wie der Hefe sind diese molekulargenetischen Möglichkeiten seit zwei Jahrzehnten etabliert. Deren Anwendung zur Elimination von Antibiotikamarkern aus *Bacillus thuringiensis* beschreiben Sanchis *et al.* (1997).
Hoang *et al*. (1998) stellen ein Transformations- und Rekombinationssystem für *Pseudomonas aeruginosa* vor, welches die Konstruktion von markerfreien Stämmen erlaubt. Die hierzu verwendete Technik ist in Kapitel 5.2.2 näher erläutert.

1985 wurde erstmals bei Säugerzellen (Mäusen) eine gezielte Änderung eines Gens demonstriert. Die molekulare Basis für das *gene targeting* ist die homologe Rekombination. Sie erlaubt

es, eine DNA-Sequenz, beispielsweise einen Marker, in ein Gen einzufügen und dieses damit zu zerstören. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von einem *sequence replacement*.
In Kombination mit den entsprechenden fortpflanzungsmedizinischen Techniken können die sogenannten *knock-out*-Mäuse erzeugt werden. Das sind transgene Mäuse, welche einen gezielt herbeigeführten Gendefekt haben, indem einzelne Gene gezielt entfernt oder durch das Einfügen einer Leseraster-Mutation inaktiviert wurden. Einen Überblick zum Stand der Technik gibt Galli-Taliadoros (1995).

Die molekulare Basis der Rekombinationstechniken für *Gene targeting*, *Gene replacement* und *Gene knock-out technology* ist anspruchsvoll; in der Publikation von Galli-Taliadoros (1995) sind die wichtigsten Grundzüge schematisch dargestellt.

Bei dikotyledonen Pflanzen gibt es erste Ansätze, welche die gezielte Inaktivierung von Genen mit der *knock-out*-Technik ermöglichen. Beetham *et al.* (1999) zeigen in ihrer Arbeit, wie mit einer zu einem Genabschnitt komplementären Sequenz, die eine Fehlkodierung enthält, eine Mutation des Leserasters bzw. eines Kodons herbeigeführt werden kann. Wahrscheinlich sind es die DNA-Reparaturmechanismen, welche den „*mismatch*“ der angelagerten, komplementären Sequenz fälschlicherweise ins Genom aufnehmen.

Bei Pflanzen steht die Technik für die gezielte Veränderung des Genoms und insbesondere das Eliminieren oder Ersetzen ganzer Gene in ihren Anfängen. Die Forschung untersucht, welche Mechanismen der homologen Rekombination in Pflanzen zugrundeliegen, um diese Kenntnisse zur gezielten Veränderung des Genoms von Pflanzen zu nutzen. In einem Übersichtsartikel von Mengiste und Paszkowski (1999) mit dem vorsichtigen Titel „*Prospects for the Precise Engineering of Plant Genomes by Homologous Recombination*“ wird der Stand des Wissens zur homologen Rekombination in Pflanzen und den Möglichkeiten des *gene targeting* dargelegt. Das Entfernen oder Ersetzen von Genen ist nur mit anspruchsvollen Rekombinationssystemen wie Cre *lox*P oder Flp-*FRT*, die nachfolgend beschrieben sind, möglich.

5.2.1 Das Cre-*lox*P-Rekombinationssystem

Homologe Rekombination ermöglicht nicht nur, ein bestimmtes Gen gezielt zu verändern, sondern auch, dieses zu ersetzen oder auszuschneiden. Um ein Gen durch homologe Rekombination auszuschneiden, sind mehrere Schritte notwendig. Die homologe Rekombination an der gewünschten Stelle muss entsprechend vorbereitet werden. Dazu eignet sich das Cre-*lox*P-Rekombinationssystem, welches von Sternberg *et al.* (1981) beschrieben wurde.

Cre-*lox*P-Rekombinationssystem

Der Cre-*lox*P Mechanismus erlaubt es, Gene zu inaktivieren oder zu ersetzen. *Lox*P ist eine transposonähnliche DNA-Sequenz, welche von der Cre-Rekombinase erkannt wird. Ein Gen, das zwischen zwei *lox*P Sequenzen liegt, kann durch homologe Rekombination der zwei *lox*P-Sequenzen und mit Hilfe der Cre-Rekombinase eliminiert werden. Das bedeutet, dass ein später vorgesehenes Entfernen von Genen bereits bei der Integration ins

Genom mit ausgeklügelten Strategien vorauszuplanen ist.

Die Patentrechte für das Cre-*lox*P System gehören der Firma *DuPont Pharmaceuticals*. Im Sommer 1998 haben die *National Institutes of Health* (NIH) mit der Firma ein Abkommen getroffen, dass die Cre-*lox*P Technik in der öffentlich bezahlten Forschung verwendbar sei, ohne dass ein Lizenzabkommen mit der Firma notwendig ist. Kommerzielle Firmen haben nach wie vor ein Lizenzabkommen abzuschliessen und eine Abgeltung zu bezahlen, wenn sie Resultate aus der öffentlich bezahlten Forschung kommerzialisieren wollen (Nature, 1998).

Dale and Ow publizierten bereits 1991 eine Anwendung des Cre-*lox*P-Systems beim Tabak (*Tabacum nicotina*) und propagierten das Potenzial dieser Technik, Antibiotikamarker aus den transgenen Pflanzen zu entfernen.

Einen guten und verständlichen Überblick zur *knock-out* Technik mit einem Anwendungsbeispiel des Cre-*lox*P Systems bei Mäusen findet sich in Galli-Taliadoros (1995). Bei diesem Beispiel ist eine sexuelle Kreuzung für das transiente (vorübergehende) Vorhandensein der Cre-Rekombinase notwendig.

In einer bemerkenswerten Arbeit präsentieren Gleave *et al.* (1999) die Anwendung des Cre-*lox*P Systems zur Selektionierung von transgenen Pflanzen, bei denen das mit den *lox*P-Sequenzen flankierte Markergen durch eine transient exprimierte (zeitlich begrenzt verfügbare) Cre-Rekombinase wieder entfernt werden kann und diese markerfreien Pflanzen auch identifizierbar sind. Zu beachten an dieser Methode ist insbesondere, dass sie beim dikotyledonen Testsystem (Tabak) ohne sexuelle Kreuzung, das heisst, allein bei vegetativ gezogenen Zellen möglich ist.

Beachtenswert ist ebenfalls die Publikation von Srivastava *et al.* (1999) aus der Forschungsgruppe von D.W. Ow, in der die Transfomation einer markerfreien transgenen Weizenpflanze (*Triticum aestivum*) beschrieben wird. Das eingefügte Fremdgen liegt als Einzelkopie vor und wurde an einer definierten Stelle ins Genom integriert.

Diese Forschungsergebnisse zeigen, dass es auch bei den schwieriger zu transformierenden monokotyledonen Pflanzen wie Weizen möglich ist, transgene Pflanzen ohne Marker und mit einer gezielten Integration des Gens für die gewünschte Eigenschaft zu konstruieren.

Auch für die *Agrobacterium*-vermittelte Pflanzentransformation bei den Dikotyledonen stellen McCormac *et al.* (1999) ein Transformationssystem vor, welches es erlaubt, Markergene bei der Weiterzüchtung durch Segregation „gezielt“ zu verlieren. Dieses System basiert auf der Cre-*lox*P Technik und der Co-Transformation mit zwei verschiedenen Vektoren.

5.2.2 Flp-*FRT* Rekombinationssystem

Das Flp-*FRT*-System basiert wie die Cre-*lox*P Technik darauf, dass eine spezifische Rekombinase, das Flp-Enzym, an eine DNA-Sequenz (*FRT*-Kasette) binden kann und an dieser Stelle spezifisch die DNA entzwei schneidet. Bei der Expression des Gens für die Rekombinase Flp wird die DNA zwischen zwei *FRT*-Sequenzen (beispielsweise das zu inaktivierende Gen) aus dem Genom entfernt. Nachfolgend kann mit geeigneter Negativ-Selektion oder durch Auskreuzen das Rekombinase kodierende Gen entfernt werden.
Das Flp-*FRT*-System hat einen breiten Anwendungsbereich, denn es funktioniert in Bakterien (Hoang *et al*. 1998, Sanchis *et al.* 1997), in Hefen, in Säugern (Seibler *et al.* 1998) und in Pflanzen. Sanchis *et al.* (1997) betonen den Vorteil des Flp-*FRT*-Systems, ein Gen mehrmals und ohne die Verwendung von Markern modifizieren zu können.

5.2.3 Markerfreiheit durch Verlust des entsprechenden Gens

Ebinuma *et al.* (1997) haben ein Transformationssystem auf der Basis des *Ti*-Plasmids von *A. tumefaciens* und dessen *ipt*-Gen entwickelt (siehe auch Kapitel 7.4). Diese MAT-System (MAT für *multi-auto-transformation*) erlaubt die Selektion von markerfreien transgenen Pflanzen. Dazu wurde das *ipt*-Gen auf dem Vektor zwischen zwei Transposons (bewegliche Elemente) platziert, so dass dieses Markergen in der transformierten Pflanze mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.1 bis 0.5%, das heisst bei einer von tausend bis zweihundert Pflanzen, verloren geht. Mit diesen optisch erkennbaren, markerfreien Pflanzen wird dann die Züchtung fortgesetzt.

5.3 Markerfreie Systeme bei Pflanzen

Die öffentliche Debatte der letzten Jahre über die möglichen Risiken der Verwendung von Antibiotikamarkern haben sowohl in der Forschung als auch in der agrarindustriellen Anwendung den Anstoss gegeben, molekulargenetische Techniken zu entwickeln, welche präzisere Eingriffe in das Pflanzengenom erlauben. Diese Techniken ermöglichen nicht nur die Entfernung von nicht mehr benötigten Markern aus dem Genom, sondern auch den Einsatz von Selektionssystemen, die markerfreie transgene Organismen erlauben.

Bei Pflanzen gibt es sehr grosse Unterschiede bei der Effizienz von Transformationssystemen und der Verwendbarkeit von Markern. Dasselbe gilt auch für die verschiedenen Techniken, die das Entfernen eines einmal im Pflanzengenom integrierten Markers erlauben. Hier ist vor allem die Unterscheidung zwischen mono- und dikotyledonen Pflanzen von Bedeutung.

Von den in Kapitel 6 und Kapitel 7.4 präsentierten Techniken handelt es sich in vielen Fällen um erste Forschungsresultate. Die nächsten Jahre werden zeigen, ob sich das eine oder andere System in der breiten Praxis durchsetzen wird und ob anstelle von leicht handhabbaren Markersystemen anspruchsvollere Techniken eingesetzt bzw. diese optimiert und vereinfacht werden. Die aktuellen Tendenzen weisen in diese Richtung.

Die Anwendung dieser Techniken ist im Sinne des Vorsorgeprinzips (siehe Kapitel 5.3) zu fördern. Um diese Praxis zu unterstützen, müssen die Bewilligungs- und Zulassungsbehörden klar signalisieren, dass bei Bewilligungsverfahren darauf geachtet wird, dass der Anteil an DNA, welche keine Funktion für die primär gewünschte Eigenschaft der transgenen Organismen hat, möglichst gering ist. Oder aber, dass diese DNA wie alle eingefügten Gensequenzen charakterisiert sind und eine entsprechende Risikobewertung durchgeführt worden ist. In Kapitel 9 sind einige Stellungnahmen und Entscheide aufgeführt, welche auf die Tendenzen der Zulassungspolitik im EU-Raum in den nächsten Jahren schliessen lassen.

6 Charakterisierung verschiedener Markersysteme

Eine hervorragende Übersicht zu verschiedenen Markersystemen und Überlegungen zur Risikobewertung bietet eine Studie von Kruse und Jansson (1997) mit dem Titel: *The use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified organisms,* herausgegeben von der norwegischen Umweltbehörde (Norwegian Pollution Control Authority). Die nachfolgenden Unterkapitel orientieren sich an dieser Studie, wobei es hier darum geht, einen Einblick zu vermitteln. Für weiterführende Details sei auf den zitierten Report selbst verwiesen.

6.1 Antibiotikaresistenzmarker

In den zumeist **bakteriellen Markersystemen** werden Gene verwendet, die für eine Resistenz gegen eine Vielzahl von Antibiotika kodieren. Dies sind namentlich Ampicillin, Kanamycin, Neomycin, Gentamicin, Streptomycin, Spectionmycin, Erythromycin, Tetracyline und Chloramphenicol.

In **Pflanzen** wurde für Forschungszwecke mit Resistenzen gegen aminoglycoside Antibiotika wie Hygromycin, Gentamicin sowie Streptomycin, Spectinomycin und Phleomycin/Bleomycin gearbeitet.

6.1.1 Antibiotikaresistenzmarker in Pflanzen

In vielen transgenen Pflanzen sind bakterielle Gene für Antibiotikaresistenzen vorhanden. Diese werden in den Pflanzen nicht exprimiert, wenn sie an bakterielle Promotoren gekoppelt sind. Diese Antibiotikaresistenzen dienten der Selektion der Genkonstrukte als Vorbereitung für die Transformation der Pflanzen und haben in den Pflanzen selbst keine Funktion mehr. Bei Pflanzen(-zellen) gibt es auch die Möglichkeit, eine Selektion auf einer Herbizidresistenz aufzubauen.

Die „Stellungnahme der ZKBS[1] zur biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen“ (ZKBS, 1999) gibt einen gerafften Überblick über die wichtigsten Antibiotikaresistenzgene, ihre Herkunftsorganismen und ihr Resistenzspektrum. Die Resistenzgene gegen Antibiotika werden in drei Gruppen unterteilt. Sie sind in der nachfolgenden Tabelle 5 wiedergegeben.

[1] Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit, Robert Koch Institut, Deutschland *http://www.rki.de*

Tabelle 5: Gruppierung von Antibiotikaresistenzmarkern nach Verbreitung und medizinischer Relevanz der verwendeten Antibiotika

Gruppe	Definition der Gruppe		Marker-Gen	Antibiotika	Bemerkung
	Medizinische Relevanz der Antibiotika	Verbreitung	Enzym		
1	**Keine oder nur geringe therapeutische Bedeutung** in Human- bzw. Veterinärmedizin	in Boden- und Enterobakterien weit verbreitet	*npt* II-Gen *aph*(3')-II-Gen	Kanamycin, Neomycin, Geneticin, Butirosin, Gentamicin A und B sowie Paromomycin	Amikacin, Gentamicin (vorwiegend C_1, $C_{1\alpha}$ und C_2), sonstige Aminoglycoside und Aminocyclitole gehören nicht zum Substratspektrum der APH(3')-II-Enzyme
			Neomycin-Phosphotransferase bzw. Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs II		
			hph-Gen	Hygromycin wird in der Humanmedizin nicht verwendet (WHO, 1993)	Keine Kreuzresistenz mit anderen in der Humanmedizin gebräuchlichen Antibiotika; Kanamycin oder Geneticin werden nicht von diesem Enzym umgesetzt
			Hygromycin-Phosphotransferase		
			cm ^{R}-Gen	Chloramphenicol	humantherapeutisch nur noch in sehr wenigen Fällen eingesetzt; in der EU für die Anwendung an Tieren zur Erzeugung von Nahrungsmitteln nicht zugelassen
			Acetyltransferase		
2	**Therapeutische Anwendung nur noch in Teilbereichen** der Human- bzw. Veterinärmedizin	in Mikroorganismen verbreitet	*amp* ^{r}-Gen	Ampicillin	bei Infektionen, z.B. mit Enterokokken oder mit *Listeria monocytogenes* weiterhin Mittel der Wahl
			TEM-1 ß-Laktamase		
			*aad*A-Gen	Streptomycin und Spectinomycin	nennenswerte humanmedizinische Bedeutung für Tuberkulose (Streptomycin) oder der Gonorrhoe (Spectinomycin)
			Streptomycin-Adenyltransferase		
3	**Therapeutische Bedeutung in der Humanmedizin**		*npt*III-Gen *aph*(3')III-Gen	Amikacin	wichtiges Reserve-Antibiotikum
			Aminoglycosid-3'-Phosphotransferase des Typs III		
			*tet*A-Gen	Tetracycline	breites Wirkungsspektrum; u.a. gegen *Brucella, Chlamydia, Mycoplasma, Rickettsia* und *Vibrio* eingesetzt
			Membranprotein; bewirkt die Ausschleusung von Tetracyclinen		

Zusammenstellung nach ZKBS (1999)

Nach Brandt (1999) sind von den ca. 1300 Freisetzungsvorhaben in der EU seit 1991 rund 800 Projekte mit transgenen Pflanzen, die Antibiotika-Resistenzgene enthielten. Neben dem *amp*-Gen und dem *hph*-Gen wurde hauptsächlich das *npt*II-Gen als Marker verwendet. Von den 14 transgenen Pflanzen, deren Inverkehrbringen EU-weit bis 1999 genehmigt worden ist, enthalten sieben keine Antibiotika-Resistenzgene, fünf das *npt*II-Gen und zwei das *amp*-Gen bzw. Teile davon.

Ampicillin-Resistenzmarker

Das Markergen bla_{TEM-1},welches die Resistenz gegen Ampicillin kodiert, wurde in den USA, in Kanada und der EU als Bestandteil einer transgenen Pflanze, d. h. als nicht exprimiertes Gen, bewilligt. Das Gen *bla* kodiert für eine β-Lactamase; TEM-1 im speziellen ist eine β-Lactamase mit einem breiten Spektrum und inaktiviert verschiedene Gruppen von Antibiotika mit einem β-Lactam-Ring; dies sind Penicilline wie Ampicillin, Amoxicillin und Carbenicillin sowie Erst- und Zweit-Generationen von Cephalosporinen wie Cephalothin und Cefamandole (Kruse und Jansson, 1997; Seite 17).

Zur Bedeutung von Ampicillinresistenzmarkergenen in gentechnisch veränderten Nutzpflanzen findet sich ein Kapitel (Seite 66 bis 68) im Bericht des Bundesamtes für Gesundheit (BAG, 1999).

Kanamycin-Resistenzmarker

Der am weitesten verbreitete Antibiotikamarker in den weltweit bereits zugelassenen GVO-Produkten ist das *aph*(3')-II-Gen, welches für eine Resistenz gegen Aminoglykoside kodiert. *aph*(3')-II (oder *npt*II) kodiert für das Enzym Aminoglycoside 3'-Phosphotransferase II (Neomycin-Phosphotransferase II), welches aminoglycoside Antibiotika wie Kanamycin, Neomycin, Paromomycin, Ribostamycin, Gentamicin A und B und Butirosin inaktivieren kann (Kruse und Jansson, 1997; Seite 16).

Die WHO (1993) listet in ihrer Studie einige als molekulare Marker in transgenen Pflanzen verwendete Resistenzgene mit den entsprechenden Antibiotika auf (Seite 23). Sie sind in der Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6 : Resistenzmarker und Bedeutung der zugehörigen Antibiotika nach WHO

Resistenz	Antibiotika	Bedeutung
Kanamycin-Resistenz	Kanamycin / Neomycin, Paromomycin, Geneticin (G418)	geringer klinischer Gebrauch; relativ toxisch, gewisser veterinärmed. Gebrauch
Hygromycin-Resistenz	Hygromycin	kein klinischer Gebrauch; veterinärmed. Gebrauch bei Schwein und Geflügel
Streptomycin / Spectinomycin-Resistenz	Streptomycin / Spectinomycin	gewisser klinischer Gebrauch
Gentamicin -Resistenz	Gentamicin	klinisch gebraucht; relativ toxisch
Phleomycin-Resistenz	Phleomycin, Bleomycin	klinisch gebraucht (Krebstherapie)

nach WHO (1993)

Die Tabellen 5 und 6 zeigen, dass im Bereich der transgenen Pflanzen Marker verwendet werden, die eine Resistenz gegen medizinisch verwendete Antibiotika kodieren. Eine Reihe von Antibiotika wird in Kombination und per Injektion verabreicht, also in schwerwiegenden Situationen und bei hospitalisierten Patienten. So wird beispielsweise Streptomycin zur Behandlung von Tuberkulose verwendet.

Die Ampicillin-Resistenz, welche Vertreter der β-Lactame unwirksam macht, ist medizinisch von Bedeutung (siehe auch Tabelle 5), jedoch in der obigen WHO-Tabelle nicht aufgeführt. Für weitere Ausführungen zu diesen Markersystemen sei auf Kruse und Jansson (1997) verwiesen.

Das Dokument der EU (1998) *Draft Document on Antibiotic Resistance Marker Genes in Genetically Modified Plants* bietet einen groben Überblick und eine Risikobewertung zu den Resistenzgenen gegenüber Ampicillin und Kanamycin.

Ein Dokument der amerikanischen Food and Drug Administration FDA (1998) befasst sich im Appendix1: *Evaluation of the Safety of the Kanamycin Resistance Gene as a Selectable Marker* ausführlich mit der Risikobewertung des Markergens für Kanamycinresistenz.
Siehe dazu auch die Übersichtsartikel von Nap *et. al* (1992), der die prinzipiellen Überlegungen bei der Risikobewertung für einen Antibiotikamarker am Beispiel der Kanamycinresistenz darlegt.

Nach einer Zusammenstellung von *Friends of the Earth* zu transgenen Pflanzen, die entweder für das Inverkehrbringen bewilligt sind oder für die das Bewilligungsverfahren hängig ist, wurden für deren Konstruktion Marker verwendet, welche eine Resistenz gegen folgende Antibiotika von human- und veterinär-medizinischer Bedeutung kodieren (Quelle: http://www.foe.co.uk/camps/foodbio/brief/anti4a.htm#Footref4):

- β-Lactam-Antibiotika
- Gentamycin B
- Neomycin
- Amikacin
- Streptomycin
- Spectinomycin

Das Thema Risikobewertung von Antibiotikamarkern – in Pflanzen wie auch in anderen Organismen – wird im nachfolgenden Kapitel exemplarisch vertieft.

6.1.2 Risikobewertung von Antibiotikaresistenzmarkern

Die Risikobewertung für Antibiotikaresistenzmarker ist innerhalb gewisser Grenzen durchführbar. Einige exemplarische Beurteilungskriterien sind nachfolgend angeschnitten.

Eine Antibiotikaresistenz in einem für den Menschen pathogenen Organismus gilt grundsätzlich als unerwünscht. Eine solche Resistenz ist aber nur bei einem vom Menschen aufrechterhaltenen Selektionsdruck durch Antibiotikagabe von Bedeutung.
Für die Verwendung von Antibiotika beim Menschen hat das Vorkommen von antibiotikaresistenten Erregern grosse medizinische Relevanz. Aber aus ökologischer und evolutionsbiologischer Sicht ist ein vom Mensch aufrechterhaltener Selektionsdruck für Antibiotika nicht gleichgewichtig zu bewerten wie etwa eine gentechnisch erzeugte Salztoleranz (theoretisches Beispiel), die in eine Wildpflanze auskreuzt und dieser Pflanze unter natürlich vorkommenden Bedingungen – insbesondere unter erhöhten Salzkonzentrationen im Boden – einen Fitnessgewinn verschafft.

Wichtig ist die Unterscheidung zwischen medizinisch relevanten und nicht-relevanten Antibiotikaresistenzen, wobei der Aspekt der Kreuzresistenz bzw. die biochemische Verwandtschaft zwischen den einzelnen Antibiotika zu beachten ist. Eine Ampicillinresistenz bedeutet, dass sie auch für andere Antibiotika dieser Klasse der Penicillin-Familie (β-Lactame) gilt.
Zudem muss die quantitative Bedeutung der zusätzlichen Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei Mensch und Umwelt in eine Relation gesetzt werden zu den bereits teilweise breit vorhandenen Resistenzen. Die Mobilisierbarkeit des Resistenzgens ist dabei von grosser Bedeutung. Befindet sich das Resistenzgen im Empfängerorganismus auf einem mobilen genetischen Element oder kann sich ein solches wieder rekonstituieren, ist die potenzielle Verbreitbarkeit wesentlich grösser und entsprechend zu werten.
Wenn die verwendete Marker-Eigenschaft im Genpool von Organismen, die möglicherweise Empfängerorganismen bei einem horizontalen Gentransfer sein könnten, vorkommt und diese Organismen die entsprechende Eigenschaft auch aus einem Nicht-GVO aufnehmen können (z.B. Antibiotikaresistenz in Mikroorganismen), ist ein potenzieller Gentransfer als weniger pro-

blematisch zu werten. Aber: Der Genfluss aus dem GVO darf keinen quantitativen Einfluss haben, d.h. die Häufigkeit oder Ausbreitung einer Eigenschaft beeinflussen.

Bei Antibiotikaresistenzmarkern ist dieser Einfluss auf die Häufigkeit und die Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen umstritten. Die Debatte um die Antibiotikaresistenzgene in transgenen Pflanzen dreht sich vor allem darum, ob der zusätzliche Eintrag der entsprechenden Gene zu einer messbaren Zunahme der Antibiotikaresistenzen bei humanpathogenen Organismen führt.

Kommentar Die Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen als Marker bei Freisetzungen oder für ein Inverkehrbringen gilt unter Berücksichtigung der aktuellen Debatte um die Verwendung von Antibiotikaresistenz-Genen in GVOs als gesellschaftspolitisch nicht mehr opportun.

Weitere Überlegungen zur Risikobewertung von Antibiotikaresistenzmarkern finden sich in Kapitel 8.

6.1.3 Vielfalt der Antibiotika und der medizinisch relevanten Wirkstoffe

Es gibt etwa zweitausend beschriebene Antibiotika, wovon etwa fünfzig therapeutisch einsetzbar sind. Diese einzelnen Antibiotika lassen sich wiederum in rund ein Dutzend Substanzklassen einteilen (Tabelle 7).

Markergene, welche für eine Resistenz gegen ein Antibiotika kodieren, inaktivieren meistens auch andere Antibiotika innerhalb derselben Substanzklassen.
Die folgende Tabelle gibt einen Überblick zu den Antibiotikaklassen und den zugehörigen Wirkstoffen, welche in der Humanmedizin vorwiegend in der ambulanten Praxis (zur oralen Aufnahme) von Bedeutung sind. Diese Liste ist demnach nicht abschliessend.

Tabelle 7: Antibiotikaklassen und Wirkstoffe in der ambulanten Humanmedizin

Antibiotika		
Substanzklasse		**Wirkstoff**
Antibiotikaklasse	*Untergruppe*	
Penicilline	säurefeste Penicilline	Amoxicillin, Ampicillin, Bacampicillin, Penicillin V, Phenoxymethylpenicillin, Pivampicillin
	penicillinasefeste Penicilline	Methicillin, Cloxacillin, Flucloxacillin
	Penicilline + Inhibitoren der β-Laktamasen	Amoxicillin + Clavulansäure
Cephalosporine	1. Generation	Cefadroxil, Cefalexin
	2. Generation	Cefaclor, Cefprozil, Cefuroxim
	3. Generation	Cefixim, Ceftibuten, Cefetamet, Cefpodoxim
Macrolide		Azithromycin, Clarithromycin, Dirithromycin, Erythromycin, Josamycin, Roxithromycin, Spiramycin
Tetracycline		Doxycyclin, Minocyclin, Oxytetracyclin, Tetracyclin
Chionolone		Ciprofloxacin, Fleroxacin, Lomefloxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, Pefloxacin, Sparfloxacin
Sulfonamide		Cotrimoxazol, Cosoltrim, Trimethoprim
Andere		Nitrofurantoin, Chloramphenicol, Clindamycin

nach Pharmactuel (1998)

6.1.4 Substanzklasse, Wirkungsebene, Resistenzmechanismus und -spektrum

Substanzklassen Die verschiedenen Substanzklassen von Antibiotika deuten darauf hin, dass es auf der Ebene der Zelle entsprechend unterschiedliche Wirkungsmechanismen und -ebenen gibt, wo eine Zelle in ihrem Wachstum gehemmt oder abgetötet werden kann.

Wirkungsebenen Antibiotika haben verschiedene Wirkungsmechanismen und – ebenen, auf der sie in die zelluläre Physiologie eingreifen. Dies sind:

- Biosynthese der Zellwand (z.B. Penicilline, Bacitracin)
- Struktur und Aufbau der Zellmembran (z.B. Polymyxin B)
- Transkription (Rifampicin)
- Translation (z.B. Aminoglycoside, Chloramphenicol, Tetracycline)

Resistenz-mechanismen

Den unterschiedlichen Wirkungsebenen entsprechend, gibt es ganz verschiedene Strategien von Zellen, sich gegen die Wirkung von Antibiotika zu schützen. Die wichtigsten Mechanismen sind:

- Das Antibiotika kann die Zellhülle nicht mehr passieren
- Die Rezeptoren, an die das Antibiotika bindet, fehlen bzw. sind modifiziert worden
- Vom Antibiotika blockierte Stoffwechselwege werden umgangen
- Bakterielle Enzyme inaktivieren das Antibiotika
- Bakterielle Membranpumpen entfernen das Antibiotika aus der Zelle.

Resistenzspektrum

Bei der Beurteilung des Resistenzspektrums der einzelnen Markersysteme ist die biochemische Verwandtschaft der Antibiotika von grosser Bedeutung. Dies zeigt das Beispiel der sogenannten Ampicillin-Resistenz besonders deutlich, weil die ß-Lacamase TEM-1 nicht nur Ampicillin, sondern auch andere Antibiotika der β-Lactam-Gruppe inaktivieren kann.

Vom **Bundesamt für Gesundheitswesen** BAG (1999) wurde eine **Situationsanalyse** mit dem Titel *Bakterielle Antibiotikaresistenz in den Bereichen Humanmedizin, Veterinärmedizin und Lebensmittel* erstellt. In Kapitel 2 des BAG-Berichtes findet sich eine Übersicht zur globalen und nationalen Resistenzlage mit einer umfangreichen Literaturzusammenstellung. Zudem sind die wichtigen antibiotischen Substanzklassen mit exemplarischen Vertretern aufgelistet. Für die bakteriellen Humanpathogene werden die verwendbaren Antibiotika aufgeführt und die aktuelle Resistenzsituation beschrieben.
Zum Thema Antibiotikaresistenzmarker in GVOs wurde in den letzten Jahren viel publiziert. Eine Zusammenstellung weiterführender **Informationsquellen** zu Antibiotikaresistenzmarkern findet sich in Kapitel 9.1.

6.2 Herbizidtoleranzmarker

Die Anzahl der Selektionssysteme für Pflanzen ist begrenzt. Herbizidtoleranzmarker sind Selektionsmarker für die Anwendung bei Pflanzen und sind heute am meisten verbreitet. Der Grund liegt darin, dass diese Markersysteme durch Industrieforschung in der Effizienz optimiert, gut beschrieben und auch teilweise bereits von den Zulassungsbehörden bewilligt sind. Das hat dazu geführt, dass auch in der Grundlagenforschung häufig Herbizidmarker als Selektionsmarker verwendet werden. Dabei ist das Auftreten einer Herbizidresistenz in einer Wildpflanze, als Folge einer natürlich vorkommenden Auskreuzung, nicht erwünscht.

Resistenz-mechanismen

Streng genommen kann zwischen Herbizidtoleranz und Herbizidresistenz unterschieden werden. Herbizidtoleranz beschreibt die relative Unempfindlichkeit gegenüber einem Herbizid. Ab einer zu starken Konzentration des Herbizids stirbt die Pflanze ab. Die Herbizidresistenz dagegen bezieht sich auf einen (aktiven) Schutzmechanismus der Pflanze gegen das Herbizid, der eine hohe bis maximale Herbizidtoleranz erlaubt.

Es lassen sich folgende Mechanismen unterscheiden:

- Modifizierung des Wirkungsortes des Herbizides (d.h. modifiziertes Enzym; Beispiel: 5-Enolpyruvylshikimate-3 Phosphate-Synthase EPSPS)
- Beschleunigung der Metabolisierung (Entgiftung) oder Verlangsamung der Metabolisierung (Umwandlung in aktive Form des herbiziden Wirkstoffes)
- Veränderung der Aufnahme- oder Transportmechanismen des Herbizides in die Pflanze bzw. die Pflanzenzellen.

In Tabelle 8 sind die Markergene für Herbizidtoleranzen bei Pflanzen mit entsprechender Herkunft, dem Enzym und dem entsprechenden selektiven Wirkstoff zusammengestellt.

Tabelle 8: Marker für Herbizidtoleranz in Pflanzen

Herbizider Wirkstoff (Selektionsagens) 1)	**Enzym / Protein**	**Marker-gen 2)**	**Herkunft des Markers (Spender-DNA)**
Phosphinothricin, Glufosinat, Bialaphos,	PAT (Phosphinothricin-Acyltransferase)	*pat, bar*	*Streptomyces hygroscopius,* *Streptomyces viridochromogenes*
Glyphosat	EPSPS (5-Enolpyruvyl-shikimate-3 Phosphate Synthase)	*aro*A,	*Agrobacterium sp.,* 3) *Arabidopsis thaliana,* *Petunia hybrida* Vilm, *Salmonella typhimurium* C&C
Bromoxynil	Bromoxyl-spezifische Nitrilase	*bxn*	*Klebsiella ozenae* (Bodenbakterium)
Norflurazon	Phyoen-Desaturase	*crt*-1	*Erwinia uredovora* Dye (Bakterium)
2,4-D (2,4-Dichloro-phenoxyacetat)	2,4-D Monooxygenase	*tfd*A	*Ralstonia eutropha;* früher: *Alcaligenes eutrophus* (Bodenbakterium)
Sulfonylurea, Chlorsulfuron, Imidazolinon	ALS (Acetolacetat Synthase)	*csr*-1, *als*	*Arabidopsis thaliana,* *Brassica napus* (Raps) *Nicotiana tabacum* (Tabak)
Dalapon	Dehalogenase		*Pseudomonas putida* (Tzer) Mig, (Bakterium)
Cyanamide	Cyanamid Hydratase		*Myrothecium verrucaria* (Pilz)
Metolachlor	GST (Glutathione S-Transferase)		*Zea mays* (Mais)
Chlorotoluron & Atrazine	CYP1A1 4)		Ratte

nach Ohkawa *et al.* (1999) sowie Kruse und Jansson (1997)

1) Für das Selektionsagens (Herbizid) wird hier der Name des Wirkstoffs angegeben; der Handelsname des Herbizids variiert von Land zu Land. Der Wirkstoff *Glufosinat* wird in Europa unter dem Markennamen *Basta*™ und in den USA unter dem Markennamen *Liberty*® verkauft. *Glyphosat* wird unter dem Namen *Roundup*® vertrieben.

2) Das Markergen kodiert meist für ein bestimmtes Enzym, welches ein Herbizid inaktivieren kann oder welches durch ein Herbizid nicht gehemmt wird. Solche Enzymfunktionen sind in der Natur weit verbreitet. Teilweise sind es geringe genetische Unterschiede, die darüber entscheiden, ob eine (transgene) Pflanze gegenüber einem Herbizid tolerant oder empfindlich ist.

3) Das Gen für die EPSPS der transgenen Sojabohne „*Roundup Ready*“ stammt aus *Agrobacterium sp strain* CP4. Das Prinzip dieser Herbizidtoleranz besteht darin, dass die bakterielle EPSPS weniger sensitiv gegenüber Glyphosat ist als die pflanzeneigene EPSPS.

4) CYP1A1 ist ein Enzym der P450 Cytochrom Familie (Monooxygenasen); siehe Ohkawa *et al.* (1999).

Die P450 Cytochrome sind eine Enzym-Familie, die sich durch die Metabolisierung von Xenobiotika auszeichnet und die für ihre Eignung zur Einführung von Herbizidtoleranzen untersucht wurde. Die Ergebnisse und einen Überblick über andere Herbizidmarker finden sich bei Ohkawa *et al.* (1999).
Ein Überblick über Transformationstechniken bei Pflanzen sowie die verwendeten Selektionsmarker und Reportergene findet sich bei Potrykus *et al.* (1998).
Für weiterführende Angaben zur Funktionsweise einzelner Herbizidtoleranzen sei neben Ohkawa *et al.* (1999) auf Kruse und Jansson (1997) und den WHO-Report von 1993 verwiesen, wo die Primärliteratur und teilweise die US-Patentnummern referenziert sind.

Patentanmeldungen als Informationsquellen

Patentanmeldungen stellen eine konzentrierte Form der wichtigsten Informationen über Herbizidmarker dar. Patentanmeldungen können heute als Gesamttext per Internet abgerufen werden. Die wichtigsten Adressen sind in Kapitel 10.4 aufgeführt.

Eine Internetseite, die weitere Informationen zum Thema Herbizidtoleranz enthält, ist unter der folgenden Adresse abrufbar: *http://www.biotech-info.net/herbicide-tolerance.html* .

Für Pflanzen existieren auch andere Selektionsmarker, die nicht auf einer Herbizidresistenz beruhen. Dazu gehören die Schwermetalltoleranzmarker, die für die Selektion von transgenen Pflanzen verwendet werden können.

6.3 Schwermetalltoleranzmarker

Diese Markersysteme erlauben wie die Antibiotika- und Herbizidmarker eine Selektion des transformierten Organismus, indem nur diese bei einer erhöhten Konzentration von Schwermetallen im Nährmedium überleben können. Schwermetalle spielen in der Molekularbiologie auch eine Rolle, weil sich durch Schwermetalle eine bestimmte Klasse von Promotoren spezifisch induzieren lassen.

Schwermetalltoleranzmarker stellen **nur bedingt eine Alternative zu Antibiotikaresistenz markern** dar, weil ihre Anwendung gewisse Nachteile hat. So sind Schwermetalle relativ humantoxisch und interagieren oft mit anderen Komponenten der Nährmedien. Dadurch werden sie unwirksam, was teilweise durch geeignete Medienzusätze aufgehoben werden kann.
Ein Nachteil von Schwermetallresistenzen aus Sicht der Spezifität – aber ein Vorteil aus Sicht der Biosicherheit – ist die Tatsache, dass Schwermetallresistenzen in der Natur verbreitet sind und negative Folgen aufgrund eines Gentransfers eher gering einzuschätzen sind. Als Marker mit einem guten Anwendungsspektrum und wenigen Nachteilen bezüglich Toxizität wird nach Kruse und Jansson (1997) die Nickel-Resistenz betrachtet.

Einer der ersten molekularbiologisch eingesetzten Schwermetalltoleranzmarker war die Quecksilber-Resistenz (*mer*- Operon).

Quecksilber-Resistenz im Cholera-Impfstoff *(Orochol Berna)*

Eine Quecksilberresistenz (Hg-Resistenz) wurde in den 1993 in der Schweiz bewilligten gentechnisch veränderten Lebendimpfstoff gegen Cholera, *Orochol Berna,* eingefügt. Die Hg-Resistenz wurde verwendet, um den Impfstamm im Labor, aber auch bei den Impfversuchen, auf einfache Art und Weise von Wildtyp *Cholerae* Vibrionen unterscheiden zu können.
Diese Resistenz wurde ganz bewusst anstelle eines Antibiotikaresistenzmarkers verwendet, da in diesem medizinischen Zusammenhang eine Antibiotikaresistenz bei der behördlichen Zulassung problematisch und für ein Monitoring nicht zweckmässig gewesen wäre.
Mit dem *mer*-Operon, das ca. 4200 Basenpaare gross ist, wurden mehrere Gene in den Organismus eingebracht, die für die Expression und Regulation der Hg^{2+}-Reduktase und für den Transport des Hg^{2+}-Ions aus der Zelle heraus verantwortlich sind.
Mit der Hg-Resistenz verfügt der Impfstamm über eine Eigenschaft, welche bei Cholera-Erkrankungen oder bei anderen bakteriellen Erkrankungen nicht in Konflikt kommt mit einer medizinisch relevanten Anwendung. Das für *Orochol Berna* verwendete *mer*-Operon stammt aus einer *Shigella*-Art und enthält Gene, die weltweit verbreitet sind. Das *mer*-Operon kommt in natürlicher wie klinischer Umgebung sowie bei gram-positiven wie gram-negativen Bakterien vor.

Mechanismen der Schwermetall-toleranz

Eine Zelle kann sich mit unterschiedlichen Strategien gegen Schwermetalle schützen, so dass sich eine Toleranz gegenüber der toxischen Wirkung ausbildet. Die wichtigsten Mechanismen sind:

- Das Schwermetall kann die Zellhülle nicht mehr passieren.
- Vom Schwermetall blockierte Stoffwechselwege (Enzyme) werden umgangen.
- Bakterielle Proteine komplexieren und inaktivieren damit das Schwermetall.

Schwermetallmarker sind auch in transgenen Pflanzen von Bedeutung; das Metallothionein-Gen aus Säugern oder pflanzenähnliche Metallothioneine führen in Pflanzen zu einer erhöhten Toleranz gegen Schwermetalle.
Eine weiterführende Übersicht zu Schwermetallmarkern bietet der Artikel von Mergeay (1995).

6.4 Erweiterter Metabolismus als Selektionsmarker

Heute existieren neben Antibiotika- und Herbizid-Selektionsmarkern keine breit etablierten, anderen Selektionssysteme für Pflanzen. Seit ein paar Jahren gibt es aber Ansätze in der Forschung, nach Alternativen zu Antibiotika- und Herbizidresistenzmarkern für die Anwendung in Pflanzen zu suchen. Als Begründung für die Entwicklung neuer Transformations- und Selektionssysteme wurde bereits anfangs der neunziger Jahre erwähnt, dass von Antibiotika losgelöste oder gar markerfreie Transformationssysteme anzustreben seien.

Ein Ansatz besteht beispielsweise darin, mit einem Markergen eine selektionierbare Veränderung im Aminosäure-Metabolismus zu bewirken (siehe dazu den WHO-Report (1993), Tab. 2).

Daneben gibt es mehrere Selektionsmarker, die auf Veränderungen der Phytohormonproduktion (Auxin-Biosynthese) hinwirken und dadurch ein verändertes, selektionierbares Wachstum der transformierten Pflanzen zur Folge haben. So wandelt das Enzym Glucuronidase des Markergens *gus* eine in das Nährmedium zugegebene Vorläufersubstanz (Cytokinin-Glucuronid) in ein Pflanzenhormon (Cytokinin) um, was ein beschleunigtes Wachstum der Transformanten zur Folge hat (Joersbo und Okkels, 1996).

In der Arbeit von Kunkel *et al.* (1999) wird ein Selektionssystem für Pflanzen vorgestellt, welches auf der Überexpression des Enzyms Isopentenyl-Transferase (IPT) beruht. Das *ipt*-Gen liegt natürlicherweise auf dem *Ti*-Plasmid von *Agrobacterium tumefaciens*, dem klassischen Transformationssystem für dikotyledone Pflanzen. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Bildung von Cytokin, welches bei den natürlicherweise vorkommenden Infektionen von Pflanzen mit *Agrobacterium tumefaciens* zur Tumorbildung führt.
Bei der Herstellung transgener Pflanzen mit dem *Ti*-Plasmid wird das Wachstum der transformierten Zellen beschleunigt. Um bei den ausgewachsenen transgenen Pflanzen Missbildungen

zu verhindern, steht beim Transformations- und Selektionssystem von Kunkel *et al.* (1999) das *ipt*-Gen auf dem *Ti*-Plasmid unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors und ist nach der Selektion der transgenen Pflanzen inaktiv.

Ebinuma *et al.* (1997) haben ein Pflanzentransformationssystem entwickelt, das ebenfalls auf dem *ipt*-Gen als Marker basiert, das aber im Verlaufe der Kultivierung mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.1 bis 0.5 % verloren geht (siehe dazu Kapitel 5.2.3).

6.4.1 Verwirrlicher Gebrauch des Begriffes „Positive Selektion“

„Positive Selektion“

Joersbo und Okkels (1996) führten im Titel ihrer Publikation den Begriff der „positiven Selektion“ ein und bezeichnen die Selektion auf der Basis von Antibiotika- und Herbizidtoleranzmarkern als „negative Selektion“. Dies ist falsch und irreführend. Denn bei beiden Selektionsprinzipien geht es um eine Positivselektion, indem sich der transformierte Organismus bei selektiven Bedingungen jeweils von den nicht transformierten Organismen abhebt, indem er überlebt oder schneller wächst.
Unterschiede bestehen allenfalls darin, dass bei den anderen Systemen die nicht transformierten Organismen unter selektiven Bedingungen nicht absterben, und dass die Risikobewertung der verwendeten Gene und der Selektionssubstanzen möglicherweise eine geringere Gefährdung von Mensch und Umwelt vermuten lässt.

Unerwünschter Fitnessvorteil?

Der Begriff der „positiven Selektion“ betont den Aspekt, dass mit dieser Art von Selektionsmarkern der Pflanze eine Eigenschaft verliehen wird, welche diese unter selektiven Bedingungen gegenüber einem Wildtyp positiv – im Sinne einer Erweiterung der metabolischen Fähigkeiten – hervorhebt. Andererseits kann dies auch eine zusätzliche metabolische Belastung bedeuten, welche sich unter nicht selektiven Bedingungen negativ auswirkt.

Aus Sicht der Biosicherheit ist jeglicher Fitnessvorteil der transgenen Pflanze gegenüber einem Wildtyp unerwünscht. Der Aspekt der Fitness ist bei einer Risikobewertung zu einer transgenen Pflanze sehr sorgfältig zu betrachten. So bedeutet beispielsweise das Vorkommen des Enzyms Phospho-Mannose-Isomerase im Pflanzenreich, dass dieses Enzym bei den entsprechenden Pflanzen auch einen Nutzen und damit einen evolutiven Vorteil hat. Siehe nachfolgendes Kapitel 6.4.2.

6.4.2 Nutzbarmachen von zusätzlichen Kohlenstoffquellen – „Positech“ von *Novartis*

Auf dem Prinzip, eine zusätzliche C-Quelle zugänglich zu machen, basiert das Selektionssystem, welches von Joersbo *et al.* (1998) beschrieben wird. Das verwendete Markergen *man*A stammt aus *E. coli* und kodiert für das Enzym *Phospho-Mannose-Isomerase* (PMI). PMI ermög-

licht der transformierten Pflanze die Umwandlung von Mannose-6-Phosphat in Fruktose-6-Phosphat, das vom pflanzlichen Metabolismus als C-Quelle verwendet werden kann. Neben den bakteriellen gibt es auch pflanzliche Phospho-Mannose-Isomerasen. So besitzen Hülsenfrüchte wie Soja, Bohnen und Erbsen, ein Gen für ein solches Enzym. Das Selektionssystem kann bei Weizen, Mais und Kartoffeln verwendet werden.

„Positech" von *Novartis*

Die Firma *Novartis* will gemäss einer Pressemitteilung vom 23. Mai 2000 in Zukunft vermehrt das Selektionssystem auf der Basis der Phospho-Mannose-Isomerase anstelle der bisher verwendeten Marker einsetzen und stellt es unter dem Namen ***Positech*** auch der öffentlichen Forschung zur Verfügung. Diese Technik gibt es seit sieben Jahren. *Novartis* hat sich die kommerziellen Rechte gesichert mit einem Patent, das die Firma *Sandoz* unter dem Titel „*Mannose or xylose based positive selection*" bereits im Jahre 1994 erworben hat (Prioritätsdatum ist der 2. März 1993). Detaillierte Angaben zu diesem Markersystem finden sich in der Patentschrift mit der Registrationsnummer PCT/EP94/00575 oder WO 94/20627 (SANDOZ LTD., 1994).

In der Publikation von Haldrup *et al.* (1998a) wird ebenfalls ein Selektionssystem für Pflanzen vorgestellt, welches auf einem erweiterten Metabolismus beruht. In diesem System erlaubt das bakterielle Gen für eine Xylose Isomerase aus *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* eine Selektion von transformierten Pflanzen, welche als zusätzliche Kohlenstoffquelle bei der Kultivierung der Pflanzenzellen den Zucker D-Xylose aus dem Kulturmedium verwerten können.

In Haldrup *et al.* (1998b) wird ein praktisch identisches System beschrieben, bei dem das Gen für den Xyloseabbau aus *Streptomyces rubiginosus* stammt. Es wird gezeigt, dass sich dieses Selektionssystem bei Pflanzen besser eignet als die Verwendung des Kanamycinresistenzmarkers.

6.5 Farbstoffmarker

Diese Markersysteme (siehe dazu auch Naylor 1999) basieren auf einer enzymatischen Reaktion, die mehr oder weniger direkt sichtbar oder nachweisbar ist. So definiert sind diese Marker eine spezielle Untergruppe der sogenannten metabolischen Marker, die auf einer enzymatischen Reaktion beruhen und zu denen beispielsweise Antibiotikaresistenzen zu zählen sind, die auf einer ß-Lactamase-Aktivität beruhen.

Markersystem *lac*ZY

Das bekannteste Beispiel eines (bakteriellen) metabolischen Markers ist die ß-Galactosidase, welche das Substrat-Analog X-Gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-beta-D-Galactopyranosid) in einen blauen Farbstoff umwandelt. Das Markersystem *lac*ZY ist Teil des Laktose-Operons und kodiert für die ß-

Galactosidase und die Laktose-Permease, welche zusammen eine Selektion auf einem laktosehaltigen Medium erlauben.

Markersystem *gus*A Ein ähnliches Markersystem basiert auf dem Markergen *gus*A, welches für die ß-Glucuronidase (GUS) kodiert, die das Substrat X-Glu in einen blauen Farbstoff umwandelt.

Markersystem *xyl*E Das Markergen *xyl*E kodiert für eine Katechol 2,3-Dioxygenase, welche das natürliche Substrat Katechol in einen gelben Farbstoff (2-Hydroxy-Muconic Semialdehyd) umwandeln kann.

6.6 Lumineszenzmarker

Lumineszenzmarker produzieren sichtbares Licht. Organismen (Einzeller), welche diesen Marker tragen, können damit optisch unterschieden werden. Es gibt Apparate für eine automatisierte Auszählung. Mit diesen ist auch eine mechanische Sortierung bzw. Selektionierung (*fluorescence-activated cell sorting,* FACS) möglich. Lumineszenzmarker sind **keine Selektionsmarker** im strengen Sinne, da sie nicht nur dem markierten Organismus ein Überleben erlauben.

Es gibt ein bakterielles und ein eukaryontisches Gen, welches für die Luciferase kodiert. Das bakterielle Gen (*lux*AB) stammt aus *Vibrio harvei* und *Vibrio fisheri,* während das eukaryontische Gen (*luc*) aus dem Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) stammt. Für weitere Informationen siehe Naylor (1999).

Die Enzymreaktionen der bakteriellen und der eukaryontischen Luciferase sind beide sauerstoffabhängig. Sie unterscheiden sich dadurch, dass mit Hilfe der bakteriellen Gene *luc*CDE das Ausgangssubstrat durch den Organismus selbst produziert werden kann, sodass die entsprechend markierten Organismen auch ohne Zugabe eines Substrates nachweisbar (sichtbar) sind. Im Gegensatz dazu benötigt das eukaryontische System Luciferin als Ausgangssubstrat. Zudem wird ATP für die Reaktion benötigt.

6.7 Fluoreszenzmarker

Im Gegensatz zu den Lumineszenzmarkern benötigen die Fluoreszenzmarker keine Ausgangssubstrate und (zelluläre) Energiequellen. Bei den Fluoreszenzmarkern handelt es sich um von der Zelle produzierte spezifische Proteine, deren Elektronen durch kurzwelliges Licht zum Fluoreszieren angeregt werden. Damit haben Fluoreszenzmarker aus dem Beurteilungsblickwinkel der Biosicherheit den Vorteil, dass sie auf keine enzymatische Reaktion angewiesen sind.

***Green fluorescent protein* (GFP)** Das Markersystem auf der Basis von *Green fluorescent protein* (GFP) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria.* Es wurde 1994 isoliert und hat in

den letzten Jahren grosse Verbreitung und Anwendung erfahren. Dazu gibt es mehrfache Gründe:

- GFP ist ein relativ kleines Markersystem (1,2 Kilobasen).
- GFP kann als Marker in Pflanzen, Tieren, Insekten und Bakterien verwendet werden.
- GFP kann als Fluoreszenzleuchten durch Anregen mit kurzwelligem Licht (ohne zusätzliche Substrate und zelluläre Energie) nachgewiesen werden.
- Es gibt inzwischen modifizierte und optimierte GFPs (EGFP für enhanced green fluorescent protein), welche bei verschiedenen Wellenlängen leuchten.
- GFP wurde für verschiedene biologische Systeme adaptiert; es gibt ein GFP für Pflanzen, das PGFP, welches etwa 150-fach stärker fluoresziert als das Wildtyp-GFP.
- GFP ist in den verschiedensten Organismen stabil.

GFP ist in allen Organismenreichen, von den Bakterien bis Insekten, Pflanzen und Tiere, verwendbar.
Berghammer *et al.* (1999) bezeichnen GFP als universellen Marker für transgene Insekten, weil er in den Pigmenten der Augen exprimiert wird und als Fluoreszenzleuchten sichtbar gemacht werden kann.

6.8 Nukleotidmarker

Bei den Nukleotidmarkern handelt es sich um charakteristische, seltene oder einmalige DNA-Sequenzen, die direkt via DNA-Hybridisierung oder mit PCR (*polymerase chain reaction*) nachgewiesen werden. Nukleotidmarker sind **keine Selektionsmarker**.

Nukleotidmarker können entweder aus kodierenden oder nicht kodierenden Sequenzen bestehen. Ein Nukleotidmarker kann Bestandteil des Wildtyp Genoms (*intrinsic marker*) oder künstlich eingefügt worden sein. Ein *Intrinsic Marker* erlaubt zwar die Identifikation eines Organismus, nicht aber die Unterscheidung zwischen Wildtyp und GVO. Für die Markerfunktion ist es irrelevant, ob die Sequenz exprimiert wird oder nicht. Wichtig ist alleine, dass die DNA-Sequenz eindeutig identifizierbar ist. Nukleotidmarker werden für die markergestützte Selektion in der Pflanzenzüchtung verwendet.

Umweltmonitoring Für ein umfassendes Monitoring von GVO in der Umwelt ist die Tatsache interessant, dass in der Molekularbiologie für die DNA-Konstrukte praktisch immer Sequenzen (Polylinker) verwendet werden, die natürlicherweise nicht vorkommen.

Diese Polylinker bieten die Möglichkeit, die Verbreitung von GVO, im speziellen von Mikroorganismen, in der Umwelt zu verfolgen.

Mit der obigen Definition von Nukleotidmarkern wird klar, dass sich jeder der in dieser Studie besprochenen Marker auch als Nukleotidmarker verwenden lässt, wenn die entsprechende Nachweismethode etabliert ist.

6.9 Auxotrophiemarker

Auxotrophiemarker bilden einen Spezialfall in der Gruppe der metabolischen Marker. Auxotrophie bedeutet, dass ein Organismus auf einen Wachstumsfaktor angewiesen ist. Der nicht auf den Wachstumsfaktor angewiesene Wildtyp wird als prototroph bezeichnet.

Auxotrophiemarker Ein Organismus lässt sich aufgrund einer Defizienz in einem Biosyntheseweg, beispielsweise aufgrund einer Mutation oder Gendeletion, von seinem Wildtyp unterscheiden. Das heisst, dass eine Auxotrophie-Mutante einen zusätzlichen Wachstumsfaktor benötigt. Diese Art von Markersystem wird bei Pilzen und im speziellen in der Hefe-Genetik verwendet.

Prinzip des Auxotrophie-Markers Ein Organismus ist auxotroph, wenn er im Vergleich zu seinem Wildtyp auf einen zusätzlichen Faktor für sein Wachstum oder Überleben angewiesen ist. Diese Eigenschaft kann durch eine Genmutation oder -deletion erzeugt werden. Bei der Transformation eines Organismus kann diese Mutation durch das intakte Markergen wieder kompensiert werden.

Anwendung bei Transformation und Selektion Ein auxotropher Empfängerorganismus kann mit einem Genkonstrukt transformiert werden, welches das intakte Gen für die Synthese des Wachstumsfaktors und ein zusätzliches Gen enthält. Die Transformanten sind nicht mehr auf den Wachstumsfaktor angewiesen und haben diesbezüglich wieder die Konstitution des Wildtyps; sie sind prototroph.

Die Philosophie bzw. der experimentelle Ansatz bei der Anwendung von Auxotrophiemarkern zu Selektionszwecken ist etwas anders als bei herkömmlichen Selektionsmarkern. Der Empfänger für das Transgen muss in einem ersten Schritt vorbereitet werden, indem er mit einer spezifischen Genmutation auxotroph gemacht wird. Diese Defizienz wird dann bei der Transformation mit dem entsprechenden funktionellen Gen zusammen mit dem Gen mit der primär gewünschten Eigenschaft wieder aufgehoben. Die Transformanten wachsen auf einem Medium ohne den betreffenden Wachstumsfaktor und sind somit selektionierbar.

Die Verwendung von Auxotrophiemarkern ist bei niederen Organismen leichter möglich, weil gezielte Genmutationen leichter realisierbar sind. Es gibt aber für alle Organismen Auxotrophien, die durch natürliche Genmutationen bzw. Gendeletionen entstehen.

Beispiel *A. niger*

Aspergillus niger ist ein filamentöser Pilz, der in der industriellen, biotechnischen Produktion von Stoffen und Enzymen von Bedeutung ist. Für *Aspergillus niger* ist in Buxton *et al.* (1985) ein Transformationssystem beschrieben, das sich eine Auxotrophiemutation für die Arginin-Biosynthese zunutze macht. Eine Auxotrophiemutante von *A. niger* mit einer defekten Trans-Carbamylase wird mit einem Plasmid transformiert, das ein *argB* Gen von *A. nidulans* enthält. Die Transformanten von *A. niger*, welche das Plasmid aufgenommen haben, sind nicht mehr auf die Zugabe der Aminosäure Arginin angewiesen.

Knock-out Mutationen in Tieren

Die sogenannten *knock-out* Mutationen, die bei transgenen Mäusen, Ratten oder anderen höheren Tieren erzeugt werden, um die Bedeutung und Funktion eines bestimmten Gens zu testen, sind in einem erweiterten Sinne ebenfalls zu dieser Kategorie der Auxotrophiemarker zu zählen. Zur Vertiefung beachte man den Übersichtsartikel von Galli-Taliadoros *et al.* (1995).

6.10 Oberflächenmarker

Der Vollständigkeit halber sind hier die Oberflächenmarker erwähnt, bei denen es sich um charakteristische und zelltypische Proteine an der Oberfläche von Zellen handelt und die in der medizinischen Diagnostik eine wichtige Rolle spielen. Mit einem Antikörper-Essay (ELISA) beispielsweise können die Zellen eines bestimmten Lebewesens oder eines bestimmten Organs identifiziert werden. Insbesondere in der Tumordiagnostik haben diese Art von Markern eine bedeutende Funktion.

7 Hintergrund zur Risikobewertung

7.1 Aufgabe und Bedeutung molekularer Marker

7.1.1 Nachweismarker

Jedes Markersystem ist ein Nachweismarker. Die Nachweismöglichkeit ist sozusagen die Basiseigenschaft eines jeden Markers und somit am einfachsten zu erfüllen. Nachweismarker erlauben die Identifikation oder Unterscheidbarkeit von Organismen bzw. Zellen. Für diese Aufgabe können auch nicht-exprimierte oder nicht-kodierende DNA-Sequenzen verwendet werden. Praktisch jedes Markergen kann mittels DNA-Hybridisierung oder PCR (*Polymerase Chain Reaction*) als Nachweismarker dienen (siehe dazu Kapitel 6.8). Ein Selektionsmarker für eine Antibiotikaresistenz kann als Nachweismarker verwendet werden, indem das Gen via PCR nachgewiesen wird. Nicht aber umgekehrt: eine nicht exprimierte DNA-Sequenz, die als Nachweismarker dient, kann nicht als Selektionsmarker verwendet werden.

7.1.2 Reportergene

Reportergene dienen dazu, physiologische Abläufe in einer Zelle oder in einem Organismus aufzuzeigen und beispielsweise die gekoppelte Expression eines anderen Gens auf einfache Art sichtbar oder nachweisbar zu machen (*to report* engl.: berichten, melden, anzeigen). Reportergene erlauben keine Selektion in dem Sinne, dass sich unter selektiven Bedingungen allein die Organismen mit einem Markergen vermehren und damit anreichern können. Reportergene haben eine ähnliche Aufgabe wie die Nachweismarker. Im Vergleich zum Nachweismarker werden Reportergene aber vielfach exprimiert. Und die Nachweismethode ist meist weniger aufwändig, wie die Beispiele der Fluoreszenzmarker zeigen (siehe dazu Kapitel 6.7).

Einen hervorragenden Überblick zu den Möglichkeiten von Reportergenen und den Vergleich untereinander (siehe Tabelle 9) bietet der Review von Naylor (1999) *Reporter Gene Technology: The Future Looks Bright*.
Naylor (1999) betont den Anwendungsbereich von Reportergenen für die Untersuchung von zellulären Vorgängen. Als Anwendungen werden diskutiert:

- Nachweis eines Gentransfers (speziell auch bei Gentherapie)
- Darstellen und Sichtbarmachen (*imaging*) der Genexpression[2]
- Charakterisierung von Rezeptoren und Liganden
- Charakterisierung von Signalübertragungsketten
- Verwendung in Bio-Assays zum Wirkstoffnachweis oder in der Toxikologie.

[2] Hier handelt es sich um das Markieren auf molekularer Ebene (Sichtbarmachen der Genexpression).

Tabelle 9: Beispiele wichtige Reportergene

Reportersystem	entsprechendes Gen	Herkunft
Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)	*cat*	bakteriell
β-Galactosidase	*lac*Z	bakteriell
Luciferase	*luc*	Leuchtkäfer *(Firefly) Photinus pyralis*
Luciferase	*lux*AB	bakteriell
Alkaline Phosphatase		Plazenta (human)
Green fluorescent protein (GFP)	*gfp*	Qualle *Aequorea victoria*

nach Naylor (1999)

Einige Erläuterungen

Das Gen *cat* war das erste Reportergen, welches für den Nachweis von Transkriptionsaktivität in Zellen verwendet wurde. β-Galactosidase ist ein gut charakterisiertes, bakterielles Enzym und eines der meist verwendeten Reportergene zum Nachweis der Transfektionseffizienz (Transformation mit Bakteriophagen).
Das Markersystem auf der Basis von Luciferasen basiert auf einem optischen Nachweis mit Fotolumineszenz. Dazu ist ein Ausgangssubstrat notwendig.

Das *Green fluorescent protein* (GFP) ist ein Fluoreszenzmarker, dessen optischer Nachweis durch Anregen mit externem, kurzwelligem Licht möglich ist (siehe dazu Kapitel 6.5 bis 6.7).

Umweltmonitoring gentechnisch veränderter Organismen

Es wird heute vermehrt gefordert, bei der grossflächigen Freisetzung von GVO, im speziellen von transgenen Pflanzen, ein Umweltmonitoring durchzuführen. Mit einer ökologischen Langzeitüberwachung sollen das Verhalten der transgenen Pflanzen im Feld und der Umwelt, die mögliche Ausbreitung der Transgene und der Genprodukte, aber auch die Umweltauswirkungen generell beobachtet werden. Siehe dazu Ammann und Vogel (1999).
Es ist eine der Aufgaben von Markergenen, den Anforderungen an ein Monitoring zu entsprechen, im Minimum aber die Unterscheidbarkeit des GVO gegenüber seinem Wildtyp zu gewährleisten.

7.1.3 Selektionsmarker

Selektionsmarker erlauben die Auslese und damit auch Identifikation von Zellen oder Organismen unter selektiven Wachstumsbedingungen. Das bedeutet beispielsweise, dass die nicht mit einem Antibiotikaresistenzmarker versehenen Zellen in einem antibiotikahaltigen Medium gar nicht überleben, sondern nur diejenigen Zellen, die das Markergen enthalten. Sie lassen sich dementsprechend anreichern. So wird eine höchst effiziente Unterscheidbarkeit (Auslese) zwi-

schen gentechnisch und nicht gentechnisch veränderten Organismen ermöglicht, was in der Molekularbiologie von grosser Bedeutung ist (siehe dazu Kap. 6.1 bis 6.3).
Man spricht in diesem Zusammenhang von Positivselektion, weil sich bei der Verwendung von „echten“ Selektionsmarkern (siehe dagegen die markergestützte Selektion in der Pflanzenzucht) nur diejenigen Organismen vermehren können, welche den Marker enthalten.

Markergestützte Selektion bei der Pflanzenzüchtung

In der Pflanzenzüchtung gewinnt die markergestützte Selektion zunehmend an Bedeutung und ist hier der Vollständigkeit halber erwähnt. Die markergestützte Selektion wird zur Effizienzsteigerung und Optimierung in der Pflanzenzüchtung verwendet. Dabei handelt es sich streng genommen nicht um eine Selektion, sondern um eine Unterscheidung (Screening) von Organismen mit und ohne Marker.
Bei Kreuzungen kann der Erbgang einer erwünschten Eigenschaft in die nachkommende Generation verfolgt werden, indem ein leicht identifizierbarer Marker (ein bestimmter Phänotyp, aber auch ein reiner DNA-Marker als Nachweismarker) zusammen mit der erwünschten Eigenschaft vererbt wird. Vorzugsweise wird eine natürlicherweise im Genom vorliegende Verknüpfung zweier Gene bzw. Eigenschaften für die markergestützte Selektion verwendet. Sie kann auch mittels molekularbiologischer Methoden erzeugt werden, indem ein Marker(gen) und die züchterisch erwünschte Eigenschaft auf der Ebene des Genoms nebeneinander platziert werden.
Als Marker dienen verschiedene Gene. Bevorzugt werden leicht (optisch) identifizierbare Eigenschaften. Es wird auch mit nicht-exprimierten Genen, sogenannten Nachweismarkern, gearbeitet.

7.2 Praktische Anforderungen an molekulare Marker

Bei der Auswahl eines Markersystems sind Anforderungen aufgrund der Zweckmässigkeit, des biologischen Systems und der Risikobewertung gegeneinander abzuwägen.

7.2.1 Zweckmässigkeit

Für die Beurteilung der Zweckmässigkeit von Markersystemen sind folgende Aspekte – je nach Anwendung in unterschiedlicher Kombination – von Bedeutung:

- Unterscheidbarkeit zwischen Wildtyp und GVO (notwendig)
- Kein oder nicht relevanter Background (des Markers oder seiner Eigenschaft) in der Umwelt (wünschenswert)
- Breiter (Wirts-) Anwendungsbereich (eventuell erwünscht)
- Selektion(-seffizienz) von Transformanten (möglichst hoch)

- Nachweis von einzelnen Zellen (eventuell erwünscht)
- *in situ*-Detektion, d.h. beispielsweise nicht-invasiver[3] Assay für Monitoring (eventuell erwünscht)
- Quantifizierbarkeit des Nachweises (eventuell erwünscht)
- Reportereigenschaft (z.B. bei intrazellulären Vorgängen; eventuell erwünscht)
- Einfach durchführbarer Nachweis (wünschenswert)
- Kosten (niedrig)

7.2.2 Rahmenbedingungen aufgrund des verwendeten biologischen Systems

Der Empfängerorganismus setzt wichtige Rahmenbedingungen für das verwendete Markersystem. Wenn einzelne Markersysteme miteinander verglichen werden sollen, ist zwischen der Verwendung von Markersystemen in den verschiedenen Organismen zu differenzieren.
Unter Berücksichtigung der heutigen Arbeitsschwerpunkte der Molekularbiologie ergibt sich die folgende Aufgliederung nach Verwendung in verschiedenen Organismen:

- Viren (Bakteriophagen)
- Bakterien (Eubakterien, *E. coli*)
- Pilze (Hefen, *Sacharomyces* sp.)
- Tiere (Säuger)
- Pflanzen (Monokotyledonen und Dikotyledonen)

Die Verwendung von Markern betrifft auch bei Vielzellern (Tiere und Pflanzen) oft das Einzell- oder Mehrzellstadium; so können pflanzliche Protoplasten[4] oder tierische Zellen in Selektionsmedien (mit wachstumshemmendem Stoff für die Zellen, welche das Markergen nicht besitzen) kultiviert werden.

7.2.3 Aspekte der Biosicherheit

Die Anforderungen an ein Markersystem aus dem Blickwinkel der Biosicherheit erfordern je nach Verwendungszweck (beispielsweise für ein Inverkehrbringen) eine gute bis vollständige

---

[3] Nicht invasiv bedeutet, dass ein Organismus aufgrund seines Phänotyps oder beispielsweise aufgrund von Bestrahlung mit UV-Licht und resultierendem Fluoreszieren unterscheidbar wird. Der Nachweis einer DNA-Sequenz mittels PCR setzt dagegen die Zerstörung einer Zelle voraus.

[4] Bei Pflanzen, die nur schwer als Protoplasten kultiviert werden können (z.B. Weizen), wird die Verwendung eines besonders effizienten Transformations- und Selektionssystem notwendig.

Charakterisierung (siehe dazu das Kapitel 7.3). Zudem soll die Eingriffstiefe in das Genom eines Organismus oder in seine Zellphysiologie verhältnismässig sein, das heisst, dass mit einem Markersystem – bezogen auf seine Funktion – keine „überzähligen“ Gene in einem Organismus eingefügt werden.
Von einem Markersystem darf bei einem Freisetzungsversuch bzw. einem Inverkehrbringen eines GVO keine Gefährdung für Mensch und Umwelt ausgehen. Ein GVO muss gegenüber seinem Wildtyp unterscheidbar sein; dieser Nachweis soll jeweils relativ einfach zu erbringen sein. Zudem darf die Eigenschaft aufgrund des Markers nicht zu einem Überlebensvorteil (Fitness) des GVO führen.
Aus diesen Gründen ist beispielsweise ein Marker, der auf einer Antibiotikaresistenz basiert, in einem mikrobiellen Lebend-Impfstoff weder für ein Monitoring noch als Selektionssystem zweckmässig.

Beispiel Beim gentechnisch veränderten Cholera-Lebend-Impfstoff *Orochol Berna* wurde für die Anforderung nach Unterscheidbarkeit zum Wildtyp (Monitoring) und für die Selektion nach Transformation eine Quecksilberresistenz verwendet und nach eingehender Prüfung zugelassen.

7.3 Umweltrelevante Informationen für die Risikobewertung nach FrSV

Die experimentelle Freisetzung und das Inverkehrbringen von Organismen ist in der Schweiz durch die „Verordnung über den Umgang mit Organismen in der Umwelt“ geregelt. Diese Freisetzungsverordnung (FrSV) orientiert sich an der Freisetzungsrichtlinie der Europäischen Union (90/220EWG).
Die Freisetzungsverordnung fordert gemäss Artikel 9 und 14 für ein Bewilligungsgesuch, das im Rahmen eines Bewilligungsverfahrens einzureichen ist, zur Beurteilung des Risikos für Mensch und Umwelt unter anderem:

> *a.) die Angaben für gentechnisch veränderte Organismen nach den Anhängen II und III der Richtlinie 90/220EWG des Rates vom 23. April 1990 über die absichtliche Freisetzung gentechnisch veränderter Organismen in die Umwelt (geändert durch die Richtlinien 94/15/EG und 97/35/EG).*

Das Kapitel 7.3.1 listet die umweltrelevanten Fragen aus der Freisetzungsrichtlinie 90/220/EWG auf, welche für die Beurteilung von Markern notwendig sind. Es sind Fragen, welche bei einem Bewilligungsgesuch allein schon in Bezug auf den oder die verwendeten Marker zu beantworten sind. Diejenigen Fragen, welche sich auf Vektoren beziehen, sind ebenfalls aufgeführt, weil Vektoren in den meisten Fällen mit Markern versehen sind, um einen erfolgreichen Gentransfer nachweisen zu können.

Die ausgewählten Fragen aus der Liste der FrSV bzw. Freisetzungsrichtlinie 90/220/EWG lassen sich in sieben für die Risikobewertung zentrale Aspekte gruppieren (Tabelle 10).

Dabei wurden die einzelnen Fragen jeweils nur einem Aspekt zugeteilt, obwohl auch Mehrfachzuordnungen möglich wären. So sind Informationen zum Aspekt „Selektionsvor- und –nachteil“ zweifellos auch relevant für den Aspekt „Unterscheidbarkeit, Nachweis, Monitoring“. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur eine Zuordnung zu dem jeweils relevantesten Aspekt vorgenommen.

Tabelle 10: Umweltrelevante Fragen aus 90/220/EWG (gemäss 94/15/EG)

Ausgewählter Aspekt der Risikobewertung		**Umweltrelevante Fragen aus 90/220/EWG (gemäss 94/15/EG)**	
		Anhang II A (Nicht-Planzen, GVO) (Teil / Abschnitt / Nr.)	Anhang II B (Pflanzen GVP) (Abschnitt / Nr.)
1	**Charakterisierung / Eigenschaften der inserierten (Marker-) DNA und des GVO**	II. B. 1. II. C. 1. c II. C. 2. a	C. 2. (wie II. B. 1.) D. 1. D. 2. c
2	**Besondere Informationen zu bestimmten, potenziell „kritischen“ Eigenschaften (Resistenzen, unbekannte DNA, nicht benötigte DNA)**	II. A. 11. e II. B. 2. II. B. 4. II. C. 1. d II. C. 2. b	C. 3. (analog II. B. 2.) D. 2. a
3	**Selektionsvor- und -nachteil / möglicher Fitnessgewinn**	II. A. 11. f IV. A. 1. IV. A. 3. IV. C. 2.	D. 4. a D. 4. b D. 4. c H. 1
4	**Unterscheidbarkeit, Nachweis, Monitoring**	II. A. 4. II. A. 6. II. A. 7. II. C. 2. d II. C. 2. e II. C. 2. f II. C. 2. g	D. 10
5	**Genetische Stabilität / Rekombinationsfreudigkeit**	II. A. 10 II. C. 2. c	D. 5
6	**Mobilisierbarkeit, Gentransfer**	II. A. 9. II. B. 3. IV. B. 3. a	D. 6
7	**Phylogenetische Verwandtschaft bzw. Distanz von Spender und Empfänger**	II. A. 5.	(indirekt aus C. 2.)

Bei der Auswahl der Fragen aus Anhang II A von 90/220/EWG gemäss 94/15/EG galt der folgende Grundsatz:

Grundsatz Ein Markergen, welches in das Genom eines Organismus eingefügt wird, ist grundsätzlich bei der Risikobewertung nach genau den gleichen Kriterien zu beurteilen wie jedes andere eingefügte Fremdgen.

Die FrSV bzw. 90/220/EWG verlangt beispielsweise mehrfach Angaben zum Gentransfer und zur genetischen Stabilität. Diese Aspekte sind ebenso für das Insert mit der primär erwünschten transgenen Eigenschaft als auch für die eingefügten Markergene von Belang.

7.3.1 Auszug aus der revidierten EU-Richtlinie 90/220/EWG, Anhang II gemäss 94/15 EG

Anhang II A von 90/220/EWG gemäss 94/15/EG: Informationen, die in Anmeldungen für die Freisetzung genetisch veränderter Organismen mit Ausnahme höherer Pflanzen (siehe dazu Anhang II B) enthalten sein müssen:

Teil II. INFORMATIONEN ÜBER DIE GVO

II., Absch. A Eigenschaften des (der) a) Spender-, b) Empfänger- oder c) (gegebenenfalls) Elternorganismus(men)

4. phänotypische und genetische Marker,
5. Grad der Verwandtschaft zwischen Spender- und Empfängerorganismus oder zwischen Elternorganismen,
6. Beschreibung der Identifizierungs- und Nachweisverfahren,
7. Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit (quantitative Angaben) und Spezifität der Nachweis- und Identifizierungsverfahren
9. Möglichkeiten des Gentransfers und des Genaustauschs mit anderen Organismen,
10. Prüfung der genetischen Stabilität der Organismen und Faktoren, die diese beeinflussen,
11. pathologische, ökologische und physiologische Eigenschaften:
e) Antibiotikaresistenzen und potenzielle Nutzung dieser Antibiotika an Menschen und Haustieren zur Prophylaxe und Therapie,
f) Beteiligung an Umweltprozessen: Primärproduktion, Nährstoffumsatz, Abbau organischer Stoffe, Atmung usw.

II. Absch. B. Eigenschaften des Vektors

1. Art und Herkunft des Vektors,
2. Sequenz von Transposons, Vektoren und anderen nichtkodierenden genetischen Sequenzen, die zur Konstruktion des GVO verwendet wurden und die Funktion des eingeführten Vektors und Genabschnitts im GVO sicherstellen,
3. Häufigkeit der Mobilisierung des eingeführten Vektors und/oder Fähigkeit zum Gentransfer und Methoden zu deren Bestimmung,
4. Informationen darüber, inwieweit der Vektor auf die DNS beschränkt ist, die zur Erfüllung der geplanten Funktion erforderlich ist.

II. Absch. C. Eigenschaften des veränderten Organismus

1. Informationen über die genetische Veränderung:
c) Beschreibung des eingeführten Genabschnitts und/oder der Konstruktion des Vektors,
d) Reinheit des eingeführten Genabschnitts in Bezug auf unbekannte Sequenzen und Informationen darüber, inwieweit die eingeführte Sequenz auf die DNS beschränkt ist, die zur Erfüllung der geplanten Funktion erforderlich ist,
2. Informationen über den endgültigen GVO:
a) Beschreibung der genetischen Merkmale oder phänotypischen Eigenschaften und insbesondere jeglicher neuer Merkmale oder Eigenschaften, die exprimiert werden können oder nicht mehr exprimiert werden können,
b) Struktur und Menge jeder Art von Vektor und/oder einer Donor-Nukleinsäure, die noch in der endgültigen Konstruktion des veränderten Organismus verblieben ist,
c) Stabilität des Organismus in Bezug auf die genetischen Merkmale,
d) Anteil und Höhe der Expression des neuen genetischen Materials, Meßverfahren und

deren Empfindlichkeitsgrad,
e) Aktivität der zur Expression gebrachten Proteine,
f) Beschreibung der Identifizierungs- und Nachweisverfahren einschließlich der Verfahren zur Identifizierung und zum Nachweis der eingeführten Sequenz und des Vektors,
g) Empfindlichkeit, Zuverlässigkeit (quantitative Angaben) und Spezifität der Nachweis- und Identifizierungsverfahren.

Teil IV. INFORMATIONEN ÜBER DIE WECHSELWIRKUNGEN ZWISCHEN DEM GVO UND DER UMWELT

IV. Absch. A. Eigenschaften, die das Überleben, die Vermehrung und Verbreitung beeinflussen:

1. biologische Eigenschaften bezüglich des Überlebens, der Vermehrung und Verbreitung,
3. Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Agenzien.

IV. Absch. B. Wechselwirkungen mit der Umwelt:

3. Fähigkeit zu Gentransfer:
a) Transfer genetischen Materials von dem/den GVO in Organismen in den betroffenen Ökosystemen bei der Freisetzung,

IV. Absch. C. Potenzielle Auswirkungen auf die Umwelt:

2. Wettbewerbsvorteil des GVO gegenüber dem/den nicht veränderten Empfänger- oder Elternorganismus(men),

---

Anhang II B von 90/220/EWG gemäss 94/15/EG: Informationen, die in Anträgen für die Freisetzung **gentechnisch veränderter höherer Pflanzen** enthalten sein müssen

Abschnitt C. Informationen über die gentechnische Veränderung

2. Art und Herkunft des verwendeten Vektors.
3. Größe, Ursprung (Bezeichnung des Spenderorganismus/der Spenderorganismen) und geplante Funktion jedes konstituierenden Fragments der für den Transfer vorgesehenen Region.

Abschnitt D. Informationen über die gentechnisch veränderte Pflanze (GVP)

1. Beschreibung der eingeführten oder veränderten Merkmale und Eigenschaften.
2. Informationen über die tatsächlich eingeführten oder deletierten Sequenzen:
a) Größe und Struktur des eingeführten Genabschnitts (Insert) und Verfahren zu seiner Charakterisierung, einschließlich Informationen über Teile des in die GVP eingeführten Vektors oder jede Carrier-DNA oder jede Fremd-DNA, die in der GVP verbleiben;
c) Lage des Inserts in den Pflanzenzellen (integriert in ein Chromosom, die Chloroplasten oder die Mitochondrien beziehungsweise in einer nichtintegrierten Form) und Verfahren zu ihrer Bestimmung;
4. Informationen über Unterschiede zwischen der gentechnisch veränderten Pflanze und der Empfängerpflanze im Hinblick auf:
a.) Form(en) und/oder Rate der Fortpflanzung.
b.) Verbreitung.
c.) Überlebensfähigkeit.
5. Genetische Stabilität des Inserts.
6. Möglichkeit eines Transfers genetischen Materials von den gentechnisch veränderten Pflanzen auf andere Organismen.
10. Beschreibung der Nachweis- und Identifizierungsverfahren für die gentechnisch veränderte Pflanze.

Abschnitt H. Informationen über die möglichen Umweltauswirkungen der Freisetzung der gentechnisch veränderten Pflanzen.

1. Wahrscheinlichkeit einer gegenüber den Empfängern oder Elternpflanzen gesteigerten Persistenz in landwirtschaftlichen Lebensräumen beziehungsweise einer gesteigerten Invasivität in natürlichen Lebensräumen.

8 Stellungnahmen, Entscheide und Revision der EU-Freisetzungsrichtlinie

8.1 Markergene in neuartigen Lebensmitteln in der EU

In der EU werden für die Genehmigung des Inverkehrbringens neuartiger Lebensmittel und Lebensmittelzutaten die folgenden Informationen bezüglich Markergenen verlangt.

97/618/EG: Empfehlung der Kommission vom 29. Juli 1997 zu den wissenschaftlichen Aspekten und zur Darbietung der für Anträge auf **Genehmigung des Inverkehrbringens neuartiger Lebensmittel und Lebensmittelzutaten** erforderlichen Informationen sowie zur Erstellung der Berichte über die Erstprüfung gemäss der Verordnung (EG) Nr. 258/97 des Europäischen Parlaments und des Rates; Amtsblatt nr. L 253 vom 16/09/1997 S. 0001 - 0036
(Text von Bedeutung für den EWR)

3.11. Bewertung von Markierungsgenen
Markierungsgene werden als "Tags" zur Kennzeichnung und Selektierung der Zellen von Pflanzen oder Mikroorganismen verwendet, die erfolgreich genetisch verändert wurden. Im Endprodukt oder im NL sollen sie normalerweise keine eigene Rolle spielen. Bei Pflanzen werden zur Zeit am häufigsten Markierungsgene verwendet, die eine Antibiotikaresistenz oder eine erhöhte Widerstandsfähigkeit gegen Herbizide bewirken. Andere Markierungsgene machen Pflanzen unempfindlich gegen Schwermetalle oder ermöglichen eine phänotypische und biochemische Selektion. Die Anforderungen zur Bewertung der Unbedenklichkeit von Markierungsgenen sind im Grunde ähnlich wie die für alle anderen Fremdgene.
Bei der Bewertung von Markierungsgenen in Pflanzen sind zu berücksichtigen:

- das Markierungsgen selbst und das von ihm kodierte Erzeugnis;
- die Methoden zur Analyse und Quantifizierung des Markierungsgens und seiner Expressionsprodukte im Lebensmittel;
- die mit der Funktion des Markierungsgens zusammenhängenden potenziellen toxikologischen und/oder nutritiven Effekte;
- die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers auf im Darm angesiedelte Mikroorganismen.

Die Verwendung von Markierungsgenen in Mikroorganismen, insbesondere von Genen, die Antibiotikaresistenz verleihen, ist in bezug auf den Wirtsorganismus, die von dem genetischen Konstrukt geschaffene biologische Abgeschlossenheit, die Möglichkeit der Kolonisierung des menschlichen Darms durch diese GVO sowie das Verhältnis zwischen der Wirksamkeit antimikrobieller Wirkstoffe und der erworbenen Resistenz zu bewerten. Es wird voraussichtlich möglich sein, eine auf der Bewertung der Primärwirkung auf den Wirtsorganismus beruhende Liste zugelassener Markierungsgene zu erstellen. Ihre Nebenwirkungen auf den Wirtsorganismus werden unter anderem davon abhängen, an welcher Stelle sie in die Wirts-DNA eingefügt wurden. Ihre Bewertung sollte fallweise erfolgen, obwohl kein Grund zu der Annahme besteht, dass die Nebenwirkungen von Markierungsgenen grösser sind als die anderer eingepflanzter Gene.

(Quelle: *http://europa.eu.int/eur-lex/de/lif/dat/1997/de_397X0618.html*)

8.2 Antibiotikaresistenzmarker in der revidierten Freisetzungsrichtlinie der EU

Die Freisetzungsverordnung der Schweiz (FrSV, Art. 9., Angaben nach Anhang II) stützt sich auf die Freisetzungsrichtlinie der EU (90/220/ EWG) ab.

Die revidierte Freisetzungsrichtlinie der EU (Richtlinie 20001/18/EG) wurde im März 2001 definitiv verabschiedet. In dieser Fassung wird der Gebrauch aller Resistenzgene für Antibiotika mit veterinär- und humanmedizinischer Bedeutung bis spätestens zum 31. Dezember 2008 verboten.

2001/18/EG *Die Mitgliedstaaten und die Kommission sorgen dafür, dass GVO, die Gene enthalten, welche gegen in der ärztlichen oder tierärztlichen Behandlung verwendete Antibiotika resistent sind, bei einer Umweltverträglichkeitsprüfung besonders berücksichtigt werden, damit Marker für Antibiotikaresistenzen in GVO, die eine Gefährdung der menschlichen Gesundheit oder der Umwelt zur Folge haben können, identifiziert und aus dem Verkehr gezogen werden können.*

Dies gilt für GVOs, die nach dem 31. Dezember 2004 in Verkehr gebracht werden, und für Freisetzungsversuche ab dem 31. Dezember 2008.

8.3 Stellungnahme der ZKBS zu Antibiotikaresistenzen

Die Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit ZKBS[5] ist 1997 in einer Stellungnahme zu folgender Schlussfolgerung gekommen:

Stellungnahme der ZKBS zum Ampicillinresistenz-Gen in gentechnisch verändertem Mais
AZ.: 6788-02-06 01.07.1997

IV. Schlußfolgerung
Eine zunehmende Verbreitung des *amp*^{r}-Gens in Mikroorganismen durch die Verwendung von gentechnisch veränderten Pflanzen wie des B.t.-Mais von Ciba-Geigy ist nicht zu erwarten. Es ist keine Gefährdung der menschlichen Gesundheit, von Tieren oder der Umwelt zu befürchten.

Das im *B.t.*-Mais enthaltene *amp*^{r}-Gen wird jedoch weder für die gewünschten Eigenschaften der Pflanze benötigt, noch ist es zur Selektion der rekombinanten Pflanzen geeignet.

Unabhängig von der vorstehenden Bewertung ist die ZKBS aus grundsätzlichen Erwägungen (Nutzung der Möglichkeiten der Gentechnik, Vorsorgegrundsatz) der Auffassung, daß künftig bei gentechnisch veränderten Organismen, die in Verkehr gebracht werden, die eingeführten heterologen Gene möglichst beschränkt werden sollten auf die Gene, welche für die angestrebte Veränderung funktionell erforderlich sind.

Die zukünftige Entwicklung in Verkehr gelangender gentechnisch veränderter Organismen, die für die Herstellung von Lebens- oder Futtermittel Verwendung finden, sollte darauf abzielen, Markergene, die Resistenzen gegen therapeutisch bedeutende Antibiotikaklassen oder gegen Herbizide bewirken, zu vermeiden.
Quelle: *http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ALLGSTELL/97/ZKBS_AMP.HTM*

[5] ZKBS, Robert Koch Institut, Deutschland *http://www.rki.de*

Das Robert Koch Institut hat 1999 diese Position bestärkt und in einer Pressemitteilung vom 26. Februar 1999 dazu aufgefordert, künftig auf die Verwendung von Antibiotikaresistenzmarkern in transgenen Pflanzen zu verzichten:

> Das Robert Koch-Institut ist aus grundsätzlichen Erwägungen der Auffassung, daß bei gentechnisch veränderten Organismen, die vermarktet werden sollen, die eingeführten Gene möglichst beschränkt werden auf solche Gene, die für die angestrebten Eigenschaften erforderlich sind. "Die Beschränkung auf die für die gentechnische Veränderung notwendigen Gene führt zu einer Vereinfachung der Sicherheitsbewertung", begründet Dr. Hans-Jörg Buhk, Leiter des Zentrums für Gentechnologie des Robert Koch-Instituts diese Forderung. Bei der zukünftigen Entwicklung gentechnisch veränderter Organismen, die für die Herstellung von Lebens- oder Futtermittel verwendet werden, sollten u.a. solche Markergene vermieden werden, die in Mikroorganismen Resistenzen gegen therapeutisch bedeutende Antibiotika bewirken können.
>
> Quelle: *http://yellow-fever.rki.de/PRESSE/PD/PD99/PD06_99.HTM*

Eine Übersicht über weitere Stellungnahmen zu Antibiotikaresistenzmarkern gibt ein Dokument der amerikanischen Food and Drug Administration FDA (1998) in Appendix 3: *Review of Positions by Other Government Agencies and International Bodies on Antibiotic Resistance Marker Use in Transgenic Plants.*

9 Weiterführende Informationsquellen

9.1 Internetadressen zu Markersystemen

(Stand Frühjahr 2000)
Die EU fördert das Forschungsprojekt **MAREP**, das sich mit Fragen der Biosicherheit und des Riskasssessment von Reporter- und Markergenen auseinandersetzt. Weitere Informationen zu diesem Projekt sind per Internet abrufbar unter der Adresse:

- *http://www.biokemi.su.se/marep/abstract.html*

Der BELGIAN BIOSICHERHEIT SERVER hat eine Informationsseite zu Antibiotikamarkern und beschreibt einige der Resistenzmechanismen:

- Types of antibiotics and related resistance genes:
  http://Biosicherheit.ihe.be/AR/ARmenu.html
- Controlling antibiotic uses around the world: *http://*Biosicherheit.*ihe.be/AR/Links.html*
- Antibiotic Resistance Gene Markers in GMO's: selected reading:
  http://Biosicherheit.ihe.be/ARGMO/GMO_read.html

Die bewilligten und durchgeführten Freisetzungsversuche in den USA können bei untenstehender Adresse abgerufen werden. Die vorbereiteten Suchroutinen erlauben die Suche nach einzelnen Markersystemen in bestimmten Organismengruppen etc.

- http://*www*.nbiap.vt.edu/cfdocs/fieldtests1.cfm

9.2 Informationen zu Antibiotikaresistenzmarkern

Als weitere Informationsquellen sind folgende Materialien und Adressen empfohlen *(Stand Frühjahr 2000)*:

- Ein **Überblick über die Substanzklassen der Antibiotika** und die **biochemische Verwandtschaft** untereinander findet sich auf der Internetseite der Universität Illinois eines Kurses zur Veterinär-Pathologie von Mark S. Kuhlenschmidt:
  http://www.cvm.uiuc.edu/Courses/VP331/Antibiotics3.html .
- Eine aktuelle **Liste aller medizinisch verwendeten Antibiotika** mit den entsprechenden Markennamen findet sich unter der Internetadresse:
  http://pharmacology.about.com/health/pharmacology/library/weekly/bl970514.htm
- Informationen zu den **in der Schweiz zugelassenen Antibiotika** mit den entsprechenden Markennamen finden sich im Arzneimittel-Kompendium der Schweiz unter der Internetadresse: *http://www.kompendium.ch/app/search_d.cfm*
- Ein *Briefing-Paper* der *Friends of the Earth* gibt einen Überblick über **Antibiotikaresistenzgene, die in transgenen Pflanzen**, welche bewilligt sind oder in einem Bewilligungsverfahren stehen, verwendet werden. Zudem sind die Kreuzresistenzen aufgeführt:
  http://www.foe.co.uk/camps/foodbio/brief/anti4a.htm#Footref4
- Für die vertiefte Auseinandersetzung mit **Antibiotikamarkern und deren Risikobewertung** ist das Hintergrunddokument der amerikanischen FDA unbedingt zu konsultieren:
  FDA (1998) *Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Trans-*

genic Plants – Draft Guidance; Draft released for comment on: September 4, 1998. U. S. Food and Drug Administration / Center for Food Safety and Applied Nutrition / Office of Premarket Approval; abrufbar unter der *Internetadresse*: *http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html*

- Im oben genannten Dokument der FDA (1998) findet sich eine Zusammenstellung zu verwendeten und bewilligten Markern: Appendix 2. Review of FDA/Industry Consultations Regarding New Plant Varieties and Selectable Markers Used to Develop Them.

9.3 Primärliteratur und Informationen zu einzelnen Genen, Sequenzen und Proteinen

(Stand Frühjahr 2000)

- Die wichtigste Online-Datenbank mit öffentlich zugänglichen Informationen zur molekularbiologischen Primärliteratur und Informationen **zu einzelnen Genen, Gensequenzen** bietet die Homepage der *National Center for Biotechnology Information* NCBI der *National Library of Medicine* und den *National Institutes of Health.*
  Die Internetadresse ist: *http://www.ncbi.nlm.nih.gov/*
- Der (Schweizer) Server von *ExPASy Molecular Biology Server* bietet sämtliche Möglichkeiten, um eine **Gensequenz** zu identifizieren und insbesondere die Möglichkeit, Informationen zu einzelnen **Enzymen** und ihrer **Nomenklatur** abzurufen:
  http://www.expasy.ch/

9.4 Internetadressen für Patentinformationen

(Stand Frühjahr 2000)
In Patentanmeldungen sind die wichtigsten Informationen über Herbizidmarker zusammengestellt. Patentanmeldungen können heute als Gesamttext per Internet abgerufen werden. Die wichtigsten Adressen sind nachfolgend aufgeführt:

- US Patent und Trademark Office: http*://www.uspto.gov/web/menu/pats.html*
- Europäisches Patentamt, mit Verbindungen zum U.S.-Patenamt und dem japanischen Patentamt: *http://www.european-patent-office.org/tws/twsindex.htm*
- Privater Anbieter von Patentinformationen ist das „IBM Intellectual Property Network“: *http://www.patents.ibm.com/*

10 Zitierte Literatur

Ammann D und Vogel B (1999) Langzeitmonitoring gentechnisch veränderter Organismen – Bestandesaufnahme, Fallbeispiele und Empfehlungen; Hrsg.: Kantonales Laboratorium Basel Stadt, KCB, 4012 Basel

Beetham PR, Kipp PB, Sawycky XL, Arntzen CJ, May GD (1999) A tool for functional plant genomics: chimeric RNA/DNA oligonucleotides cause in vivo gene-specific mutations; Proc Natl Acad Sci U S A 96(15):8774-8778

Berghammer AJ, Klingler M, Wimmer EA (1999) A universal marker for transgenic insects; Nature 402:370-371

Brandt P (1999) Antibiotika-Resistenzgene als Marker in gentechnisch veränderten Pflanzen; Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 42 (1): 51-57.

BAG (1999) Bakterielle Antibiotikaresistenz in den Bereichen Humanmedizin, Veterinärmedizin und Lebensmittel; Situationsanalyse der "Koordinationsgruppe antibiotikaresistente Mikroorganismen"; Vertrieb: Bundesamt für Gesundheit, Infodienst, 3003 Bern

Buxton FP, Gwynne DI, Davies RW (1985) Transformation of *Aspergillus niger* using the *argB* gene of Aspergillus *nidulans*; Gene 73:207-214

Dale EC, Ow DW (1991) Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome; Proc Natl Acad Sci U S A 88(23):10558-62

Ebinuma H, Sugita K, Matsunaga E, Yamakado M (1997) Selection of marker-free transgenic plants using the isopentenyl transferase gene; Proc Natl Acad Sci USA 94:2117–2121

EU (1998) Draft Document on Antibiotic Resistance Marker Genes in Genetically Modified Plants; Doc XI798/269 vom 14/5/98

FDA (1998) Guidance for Industry: Use of Antibiotic Resistance Marker Genes in Transgenic Plants – Draft Guidance; Draft released for comment on: September 4, 1998. U. S. Food and Drug Administration / Center for Food Safety and Applied Nutrition / Office of Premarket Approval (*http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/opa-armg.html)*

Galli-Taliadoros LA, Sedgwick JD, Wood SA, Körner H (1995) Gene knock-out technology: a methodological overview for the interested novice (minireview); Journal of Immunological Methods 181(1):1-15

Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, Morris AM (1999) Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of *cre* recombinase and use of a conditional lethal dominant gene; Plant Molecular Biology 40:223-235

Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998a) The xylose isomerase gene from *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes* allows effective selection of transgenic plant cells using D-xylose as the selection agent; Plant Molecular Biology 37(2):287-96

Haldrup A, Petersen SG, Okkels FT (1998b) Positive selection: a plant selection principle based on xylose isomerase, an enzyme used in food industry; Plant Cell Reports 18: 76-81

Hoang TT, Karkhoff-Schweizer RR, Kutchma AJ, Schweizer HP (1998) A broad-host-range Flp-*FRT* recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. Gene 212(1):77-86.

Jansson J (2000) Reporter Genes for Monitoring Microbial Cell Activity and/or the Environment – an opinion; Centraltryckeriet AB, Boras, Schweden 2000

Jansson J (1998) Marker Genes as Tags for Monitoring Microorganisms in Nature – an opinion; Centraltryckeriet AB, Boras Schweden 2000 (siehe MAREP Projekt der EU: *http://www.sh.se/marep/doc/rep2.pdf)*

Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Guldager P, Brunstedt J, Okkels FT (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet; Molecular Breeding 4:111-117

Joersbo M and Okkels FT (1996) A novel principle for selection of transgenic plant cells: positive selection; Plant Cell Reports 16:219-221

Kruse H, Jansson J (1997) The use of antibiotic resistance genes as marker genes in genetically modified organisms; Report 97:03; SFT Norwegian Pollution Control Authority, ISBN 82-7655-052-5

Kunkel T, Niu Q-W, Chan Y-S, Chua N-H (1999) Inducible isopentenyl transferase as a high-efficiency marker for plant transformation; Nature Biotechnology 17:916-919

McCormac AC, Elliott MC, Chen DF (1999) pBECKS2000: a novel plasmid series for the facile creation of complex binary vectors, which incorporates "clean-gene" facilities; Mol Gen Genet 261(2):226-35

Mengiste T and Paszkowski J (1999) Prospects for the Precise Engineering of Plant Genomes by Homologous Recombination; Biol Chem 380:749-758

Mergeay M (1995) Heavy metal resistances in microbial ecosystems; Molecular Microbial Ecology Manual 6.1.7:1-17

Nap J-P, Bijvoet J, Stiekema WJ (1992) Biosafety of kanamycin-resistant transgenic plants (review): Transgenic Research 1:239-249

Nature (1998) DuPont opens up access to genetics tool; Nature 394:819 (1998)

Naylor LH (1999) Reporter gene technology: the future looks bright; Biochem Pharmacol; 58(5):749-57

Ohkawa H, Tsujii H, Ohkawa Y (1999) The use of cytochrome P450 genes to introduce herbicide tolerance in crops: a review; Pesticide Science 55:867-874

Pharmactuel (1998) BandXIV: Wissenschaft und Offizin, Heft Nr. 2 Antibiotika

Potrykus I, Bilang R, Fütterer J, Sautter Ch, Schritt M (1998) Genetic Engineering of Crop Plants, p. 119-159; in: *Agricultural Biotechnology*, ed. by Altman A, Marcel Dekker Inc.; ISBN 0-8247-9439-7

Sanchis V, Agaisse H, Chaufaux J, Lereclus D (1997) A recombinase-mediated system for elimination of antibiotic resistance genemarkers from genetically engineered *Bacillus thuringiensis* strains; Appl Environ Microbiol 63(2):779-84

SANDOZ LTD. (1994) Mannose or Xylose Based Positive Selection; Patent Cooperation Trade No: PCT/EP94/00575 oder WO 94/20627

Seibler J, Schubeler D, Fiering S, Groudine M, Bode (1998) DNA cassette exchange in ES cells mediated by Flp recombinase: an efficient strategy for repeated modification of tagged loci by marker-free constructs; J Biochemistry 37(18):6229-34

Srivastava V, Anderson OD, Ow DW (1999) Single-copy transgenic wheat generated through the resolution of complex integration patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 96(20):11117-21

Sternberg N, Hamilton D, Hoess R (1981) Bacteriophage P1 sitespecific recombination II. Recombination between *lox*P and the bacterial chromosome; J Mol Biol 150:487-507

WHO (1993) Health aspect of marker genes in genetically modified plants; Report of a WHO Workshop; WHO, Food Safety Unit WHO/FNU/FOS/93.6

ZKBS (1999) Stellungnahme der ZKBS zur Biologischen Sicherheit von Antibiotika-Resistenzgenen im Genom gentechnisch veränderter Pflanzen
(Az.: 6790-10-62 06.07.1999)
Quelle *http://yellow-fever.rki.de/GENTEC/ZKBS/ALLGSTELL/99/ANTIBIOTIKA.HTM*

ZKBS (1997) Stellungnahme der ZKBS zum Ampicillinresistenz-Gen in gentechnisch verändertem Mais; AZ.: 6788-02-06 01.07.1997;
Quelle: *http://www.rki.de/GENTEC/ZKBS/ALLGSTELL/97/ZKBS_AMP.HTM*