



## **Stellungnahme der ZKBS zur Bewertung des „Blue Genes“-Experimentierkastens des Fonds der Chemischen Industrie**

### **Zusammenfassung**

Die Experimente mit dem „Blue Genes“-Experimentierkasten bedingen kein gentechnikspezifisches Gefährdungspotenzial. Das Vektor-Empfänger-System erfüllt die Anforderungen einer biologischen Sicherheitsmaßnahme. Die mit dem Experimentierkasten durchführbaren Experimente führen nicht zu gentechnisch veränderten Organismen (GVO) im Sinne des Gentechnikgesetzes, weil es sich bei diesen Versuchen um eine Selbstklonierung handelt, die nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gilt. Voraussetzung ist, dass die Versuche in einem geschlossenen System (z. B. geeigneter Experimentierraum) durchgeführt werden und die Freisetzung oder das Inverkehrbringen der erzeugten Organismen nicht vorgesehen sind.

### **Einführung**

Das Regierungspräsidium Tübingen hat die ZKBS um Bewertung des Experimentierkastens „Blue Genes“ gebeten, der vom Fond der Chemischen Industrie Schulen kostenlos zur Verfügung gestellt wird. Er enthält Lehrmaterial, um Schüler mit Hilfe anschaulicher Versuche an grundlegende Methoden der Molekularbiologie heranzuführen.

Der Experimentierkasten enthält keine gentechnisch veränderten Organismen. Er enthält aber alle notwendigen Komponenten (Gerätschaften, Reagenzien, Enzyme, den Vektor pBR322, transformationskompetente Zellen des *Escherichia coli* K12-Stammes JM109) für die Durchführung einfacher Klonierungsexperimente einschließlich der Herstellung eines bestimmten Typs eines *E. coli* K12-Stammes. Die Herstellung des *E. coli* K12-Stammes ist in der beiliegenden Anleitung genau und gut nachvollziehbar beschrieben. Ein Nukleinsäureabschnitt aus *E. coli*, der die Information zur Bildung des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase (*lacZ*-Gen) trägt, wird in die *NheI*-Restriktionsenzym-Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert und in den Empfängerorganismus *E. coli* K12 Stamm JM109 transformiert, der kein funktionsfähiges *lacZ*-Gen enthält. Das Tetrazyklin-Resistenzgen des Vektors wird dabei inaktiviert, da die *NheI*-Schnittstelle in dem Gen liegt. Zur Selektion werden das Ampicillin-Resistenzgen des Vektors und die enzymatische Aktivität des *lacZ*-Gens genutzt.

### **Stellungnahme der ZKBS**

Experimente mit dem „Blue Genes“-Experimentierkasten beinhalten kein gentechnikspezifisches Gefährdungspotenzial.

Das Vektor- Empfängersystem (pBR322 / *E. coli* K12) ist als biologische Sicherheitsmaßnahme anerkannt und als solche im Anhang II GenTSV aufgeführt. Es erfüllt die dafür notwendigen Anforderungen.

1. Der Empfängerorganismus *E. coli* K12 (gemäß § 6 Abs. 4 GenTSV)

- ist wissenschaftlich ausführlich beschrieben und taxonomisch eingeordnet;



- ist nur im Labor dauerhaft vermehrbar und überlebensfähig, nicht aber unter Umweltbedingungen;
- kann sich nicht im Darm, dem für *E. coli* natürlichen Lebensraum, etablieren;
- ruft keine Krankheiten hervor;
- zeigt einen geringen horizontalen Genaustausch mit anderen Spezies.

## 2. Der Vektor pBR322 (gemäß § 6 Abs. 5 GenTSV)

- ist umfassend charakterisiert. pBR322 besteht aus drei funktionellen DNA-Abschnitten, dem Tetrazyklin-Resistenzgen des Plasmids pSC101, dem Ampicillin-Resistenzgen des Transposons Tn3 und der Replikationsregion sowie benachbarten Sequenzen des *E. coli* Plasmids pMB1. Alle DNA-Segmente, aus denen pBR322 zusammengesetzt ist, wurden ursprünglich aus *E. coli* isoliert, so dass pBR322 als ein Produkt der Selbstklonierung einzustufen ist.
- Die Mobilisierung des Vektors von *E. coli* K12 auf andere coliforme Bakterien (z.B. solche des Darms) ist stark eingeschränkt, weil pBR322 die Mobilisierungsgene fehlen (siehe Stellungnahme der ZKBS zur Mobilisierbarkeit des Plasmids pBR322 und dessen Derivaten, Az.: 6790-10-24).
- pBR322 besitzt eine begrenzte Wirtsspezifität und repliziert nur in *E. coli* und nahe verwandten *Enterobacteriaceae*.

Damit ist das Wirt-Vektorsystem so sicher, dass selbst bei einer akzidentellen Aufnahme keine Übertragung der Gene des Vektors auf die Bakterienflora des Experimentators zu erwarten ist.

- ## 3. Arbeiten mit dem „Blue Genes“-Experimentierkasten sind nach den Begriffsbestimmungen des § 3 Nr. 3 GenTG Satz 5, 2. Spiegelstrich („Selbstklonierung nichtpathogener, natürlich vorkommender Organismen, wenn sie keine Adventiv-Agenzien enthalten und entweder nachgewiesenerweise lange und sicher verwendet wurden oder eingebaute biologische Schranken enthalten, die die Lebens- und Replikationsfähigkeit ohne nachteilige Folgen in der Umwelt begrenzen“) nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials anzusehen, sofern die Versuche in einem geschlossenen System (z.B. geeigneter Experimentierraum) durchgeführt werden und die Freisetzung oder das Inverkehrbringen der erzeugten Bakterien nicht vorgesehen sind. Ergänzend ist auf die Definition der Selbstklonierung im Anhang II Teil A der Richtlinie 98/81/EG hinzuweisen:

*„Selbstklonierung bestehend aus der Entfernung von Nukleinsäuresequenzen aus einer Zelle eines Organismus; diese Nukleinsäuren (bzw. ein synthetisches Äquivalent) können danach – evt. nach einer vorausgehenden enzymatischen oder mechanischen Behandlung – ganz oder teilweise wieder in Zellen derselben Art oder in Zellen von Arten inseriert werden, die aus phylogenetischer Sicht eng verwandt sind und genetisches Material durch natürliche physiologische Prozesse austauschen können; bei dem daraus entstehenden Mikroorganismus ist nicht zu erwarten, dass er bei Menschen, Tieren oder Pflanzen Krankheiten verursacht.“*

*Zur Selbstklonierung kann auch die Anwendung rekombinanter Vektoren zählen, die über lange Zeit sicher in diesem bestimmten Mikroorganismus angewendet wurden.“*



Diese Voraussetzung erfüllt pBR322, der seit den Anfängen der Anwendung gentechnischer Methoden in Gebrauch ist und das Grundgerüst für die meisten pro- und eukaryoten Vektoren bildet. pBR322 ist auch in der Liste schulgeeigneter Vektor-Empfänger-Systeme des Entwurfs „Richtlinien zur Sicherheit im naturwissenschaftlichen Unterricht“ Teil Biologie, Versuche mit Mikroorganismen, der Kultusministerkonferenz (KMK-Richtlinien) aufgeführt.

Da das Verfahren der Selbstklonierung nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials gilt, wenn die Versuche in einem geschlossenen System, d.h. in einem Laboratorium, durchgeführt werden, führen die in der Anleitung des „Blue Genes“-Experimentierkastens beschriebenen Versuche nicht zu GVO im Sinne des Gentechnikgesetzes.

4. Der jahrzehntelange therapeutische Einsatz von Antibiotika, von denen gegenwärtig der größere Teil in der Humanmedizin, der geringere in der Veterinärmedizin und als Futtermittelzusatz verwendet wird, hat zu einer starken Verbreitung von antibiotikaresistenten Bakterien geführt<sup>1</sup>. Diese sind in hohem Maße in den Fäkalien nachweisbar und gelangen von dort ins Abwasser<sup>2</sup>. In einer Studie über das Vorkommen von antibiotikaresistenten coliformen Bakterien in der Fäkalflora gesunder Menschen konnten in 75,3% der Stuhlproben Tetracyclin-resistente coliforme Bakterien nachgewiesen werden<sup>3</sup>. Das auf dem Vektor pBR322 liegende Ampicillin-Resistenzgen kodiert für die weit verbreitete TEM-1  $\beta$ -Laktamase, die von 15 bis 30% der *E. coli*-Stämme der Dickdarmflora jedes gesunden Menschen gebildet wird. Nach Untersuchungen von Kresken et al.<sup>4</sup> besitzen etwa 35% der klinischen *E. coli*-Isolate heute eine Ampicillin-Resistenz und diese ist überwiegend durch den  $\beta$ -Laktamasetyp TEM-1 bedingt. Auch konnte gezeigt werden, dass Ampicillin-Resistenzen bei *E. coli*-Isolaten von Rindern und Schweinen in etwa 74 % aller Proben auftreten.

Selbst wenn unbeabsichtigt Plasmid-haltige Bakterien aus Versuchen direkt ins Abwasser gelangen sollten oder erst nach versehentlicher oraler Aufnahme und einem nicht zu erwartenden Überleben der Darmpassage, dann würden diese Bakterien keine erkennbare Erhöhung der resistenten Keime im Abwasser darstellen.

5. Wie in der Anleitung (S. 10) vorgesehen, sollten die beim Einsatz des „Blue Genes“-Experimentierkastens in der Schule erzeugten Bakterien, die sich in flüssigem oder festem Medium befinden können, aus didaktischen Gründen und im Rahmen der guten Laborpraxis, durch Kochen (oder Autoklavieren) vor der Entsorgung inaktiviert werden. Das entspricht den Empfehlungen des KMK-Entwurfs „Richtlinien zur Sicherheit im naturwissenschaftlichen Unterricht“ Teil Biologie, Versuche mit Mikroorganismen.

## Literatur

- <sup>1</sup> Teuber, M. (2001): Antibiotikaresistente Bakterien in Lebensmitteln. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene der Schweizerischen Gesellschaft für Lebensmittelhygiene 92:10-27
- <sup>2</sup> Feuerpfeil, I. et al. (1999): Antibiotikaresistente Bakterien und Antibiotika in der Umwelt. Bundesgesundheitsblatt 42:37-50
- <sup>3</sup> Feuerpfeil, I. und Stelzer, W. (1992): Das Vorkommen von antibiotikaresistenten coliformen Bakterien in der Darmflora des Menschen. Bundesgesundheitsblatt 35:61-65
- <sup>4</sup> Kresken, M. et al. (1999): Zeitliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Bakterienarten in Mitteleuropa. Bundesgesundheitsblatt 42:17-25