



Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung des ARSOLux-Test-Systems

Allgemeines

Das ARSOLux-Test-System wurde vom Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung (UFZ, Leipzig) entwickelt, um Arsenkonzentrationen in Wasserproben bestimmen zu können. Es basiert auf gentechnisch veränderten Bakterien, die vom Laborstamm *Escherichia coli* K12 abgeleitet sind und nach Kontakt mit arsenhaltigen Verbindungen Licht emittieren.

Das UFZ hat in der Mongolei einen Antrag auf Durchführung einer Studie zur Bestimmung des Arsengehaltes in Grundwasser gestellt. Daraufhin hat die zuständige Behörde, das mongolische National Biosafety Committee (NBC), um eine Risikobewertung der verwendeten gentechnisch veränderten Organismen gemäß Art. 15 i. V. m. Anlage III des Cartagena-Protokolls durch die ZKBS gebeten. Ziel einer solchen Bewertung (s. Punkt 1 der Anlage III) ist es, „...die möglichen nachteiligen Auswirkungen lebender veränderter Organismen auf die Erhaltung und nachhaltige Nutzung der biologischen Vielfalt in der voraussichtlich aufnehmenden Umwelt zu erkennen und zu bewerten, wobei auch Risiken für die menschliche Gesundheit zu berücksichtigen sind...“ [1].

Beschreibung der verwendeten GVO

Bei dem im ARSOLux-System verwendeten *E. coli*-Stamm handelt es sich um ein Derivat des Laborstammes K12, in welchen ein Plasmid eingebracht worden ist. Der Stamm wird als *E. coli* DH5 α -2697 bezeichnet.

Empfängerorganismus

E. coli ist ein Vertreter der Familie der *Enterobacteriaceae*. Diese umfasst Gram-negative, fakultativ anaerobe, nicht sporulierende Stäbchen, die 0,1 % der Darmflora von Warmblütern ausmachen. Einige Patho-Typen können ernsthafte humane Erkrankungen auslösen.

K12-Stämme leiten sich von einem Isolat aus dem Stuhl eines konvaleszenten Diphtherie-Patienten von 1922 ab [2]. Seit den vierziger Jahren des 20. Jahrhunderts vielfältig für bakteriologische Studien verwendet, stellt das Isolat einen sehr gut charakterisierten Organismus dar, der inzwischen vielfältig als Modellorganismus in der Forschung und Industrie verwendet wird. Seine Apathogenität liegt darin begründet, dass die für pathogene Stämme typischen Virulenzfaktoren vom K12-Stamm und seinen Derivaten nicht ausgebildet werden. Eine Kolonisierung des Darmes von Mensch und Tier ist aufgrund von Defekten in der bakteriellen Zellwandstruktur unter normalen Bedingungen nicht möglich. So ist in der äußeren Membran die Lipopolysaccharid-Core-Struktur verändert, so dass die Anheftung der O-Antigen Polysaccharid-Seitenketten gestört ist [3]. Dies geht einher mit einer veränderten Zusammensetzung der die Bakterien umgebenden Glykokalyx, wodurch eine Adhäsion an die Mucosa der Darmepithelien verhindert wird [4]. Zudem exprimieren K12-Stämme keine Adhäsine und kapsulären Antigene [3]. Die Überlebensfähigkeit von K12-Stämmen im Darm

wurde in vielfältigen Untersuchungen an Mensch und Tier getestet. Danach liegt die Überdauerungszeit der Bakterien zwischen 1 und 6 Tagen [5-8].

Neben der Überlebensfähigkeit im Darm zeichnen sich pathogene *E. coli*-Stämme durch Pathogenitätsdeterminanten aus, deren Gene nicht im Genom von *E. coli* K12-Stämmen vorhanden sind oder nicht exprimiert werden. Zu diesen gehören neben den schon erwähnten z. B. Toxine, Invasine und Aerobactin [9]. Im Falle einer Inhalation oder Ingestion ist dementsprechend nicht von einem Risiko für Mensch und Tier auszugehen.

Das natürliche Habitat von *E. coli* ist der Darmtrakt von Mammalia. Aufgrund der oben erwähnten genomischen Veränderungen können *E. coli* K12 und die davon abgeleiteten Stämme weder den Darm kolonisieren noch darin überdauern. Vielfältige Studien mit Wasser- und Bodenproben deuten zudem darauf hin, dass diese Stämme auch in der Umwelt nicht überdauern können. So nimmt die Zahl lebensfähiger *E. coli* K12 in Flusswasser innerhalb von 6 Tagen von 3×10^6 Zellen/ml auf ungefähr 10 Zellen/ml ab [10]. Weitere Untersuchungen mit natürlichen Gewässern bzw. Abwässern zeigen eine Abnahme der Zellzahl von 10^8 Zellen/ml auf unter 10 Zellen/ml nach 3-4 Wochen [10]. Experimente mit unterschiedlichen Bodenproben weisen auf eine Abnahme der Zellzahl von 10^7 /g Boden auf höchstens 100 lebensfähige Zellen innerhalb von 6-8 Wochen hin, wobei die natürlicherweise in den Proben enthaltenden Bakterienpopulationen konstant blieben [11]. Aufgrund der sehr guten Charakterisierung, der Apathogenität und der geringen Überlebensfähigkeit in der Umwelt sind *E. coli* K12 und die davon abgeleiteten Stämme als Teil von biologischen Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 6 Abs. 4 i. V. m. Anhang II Teil A GenTSV anerkannt

Bei dem für das ARSOLux-System verwendeten Stamm DH5 α handelt es sich um ein Derivat des K12-Stammes mit zusätzlichen Defekten in der *recA*- und *endA*-Expression. Die *recA*-Mutation führt zur Unfähigkeit, DNA homolog zu rekombinieren, und stabilisiert dadurch eingebrachte rekombinante Plasmide. Die *endA*-Mutation reduziert drastisch die Endonuklease-Aktivität, wodurch die Isolierung von DNA aus den Zellen erleichtert wird. Aufgrund dieser beiden Eigenschaften wird DH5 α bevorzugt für die Herstellung rekombinanter *E. coli*-Stämme genutzt [12].

Spenderorganismen

Mithilfe eines Vektors wurde in den DH5 α -Stamm das Gen *arsR* einschließlich seines Promotors eingeführt. Dieses Gen stammt von dem *E. coli*-spezifischen Plasmid R773 [13] und kodiert für einen Transkriptionsregulator mit Bindestellen für arsenhaltige Verbindungen. Es handelt sich um ein Repressorprotein, das in Abwesenheit der Arsenverbindungen an seinem Promotor gebunden vorliegt, wodurch die Expression *downstream* liegender Gene reprimiert wird. Nach Aufnahme von Arsenverbindungen durch die Bakterienzelle bilden diese einen Komplex mit ArsR, wodurch eine Bindung am Promotor allosterisch verhindert wird. Die Transkription nachgeschalteter Gene wird dadurch induziert. Natürlicherweise handelt es sich dabei um Arsenresistenzgene. Das eingeführte *arsR*-Gen mit dem zugehörigen Promotor ist ohne eigenes Gefährdungspotenzial.

Desweiteren wurden mithilfe des Vektors Reportergene in die Empfängerorganismen eingeführt. Dabei handelt es sich um die Gene *luxCDABE* zur Expression der Luziferase aus *Photobacterium luminescens*, einem Organismus der Risikogruppe 1 gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anhang I Nr. 1 GenTSV. *P. luminescens* ist ein Vertreter der *Enterobacteriaceae* und lebt im Darm von entomopathogenen Nematoden. Die überführten Gene sind ohne eigenes Gefährdungspotenzial.

Vektor

Im ARSOLux-System wird das Plasmid pSB403-arsR verwendet:

Vektorhintergrund des Plasmids pSB403 ist das pRK415-Plasmid [14], welches wiederum vom RK2 Plasmid aus *Klebsiella aerogenes* abgeleitet ist. Es enthält einen *oriV*, welcher

eine *broad host range*-Replikation in Gram-negativen Bakterien ermöglicht, einen *oriT* als Start der Übertragung des Plasmids bei einer triparentalen Konjugation und eine Tetrazyklinresistenz-vermittelnde Genkassette. In pRK415 wurden die *luxCDABE*-Gene eingebaut und das entstandene Plasmid pSB403 genannt [15]. Expression der Gene *luxCDABE* führt zur Emission von Licht.

Dieser Vektor erfüllt nicht die Kriterien als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme gemäß § 6 Abs 5 GenTSV, da keine eingeschränkte Wirtsspezifität vorliegt. Zudem ist eine Mobilisierbarkeit des Plasmids möglich, wenn die für eine Konjugation ebenfalls erforderlichen *tra*- und *mob*-Gene von einem sogenannten Helferstamm zur Verfügung gestellt werden (triparentale Konjugation).

Eingeführte DNA (*insert*)

In den Vektor pSB403 wurde ein 1 kb großes *EcoRI*-Fragment, welches das Gen *arsR* mit entsprechendem Promotor und zwei *arsR*-Bindestellen enthält, *upstream* der *luxCDABE*-Gene eingebracht [16]. Das Plasmid wurde pSB403-*arsR* genannt.

Gentechnisch veränderter Organismus

E. coli DH5 α -2697 benennt den oben beschriebenen Empfängerorganismus, in welchen das Plasmid pSB403-*arsR* eingebracht worden ist [17]. Nach Kontakt der Bakterien mit Arsenverbindungen dringen diese in die Zellen ein und binden an das exprimierte ArsR. Der Repressor verliert dadurch seine Fähigkeit, an DNA zu binden, wodurch die Expression der Luziferase initiiert wird. Die Intensität des emittierten Lichtes kann in einem Luminometer bestimmt werden. Bei dem rekombinanten Organismus handelt es sich nicht um eine biologische Sicherheitsmaßnahme gemäß § 6 i. V. m. Anhang II Teil A GenTSV .

Beabsichtigte Verwendung:

Das Biosensorsystem ARSOLux soll zukünftig als etabliertes Testsystem zur Bestimmung der Konzentrationen von Arsenverbindungen in Gewässern/Trinkwasseranlagen verwendet werden. Die geplanten Studien in der Mongolei sollen insbesondere die Einflüsse der Wasserzusammensetzung (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, Eisengehalt), der Umgebungstemperatur und der Luftfeuchtigkeit auf die erzielten Messergebnisse näher charakterisieren. Die rekombinanten Bakterien liegen dabei lyophilisiert in versiegelten (Septum-Stopper, Aluminiumdeckel) Rollrandgläschen vor (10^{10} - 10^{12} Zellen). Die Lyophilisierung der Bakterien erfolgt in Anwesenheit eines komplexen organischen Nährmediums (Luria-broth, LB), Trehalose und des hygroskopisch wirkenden Polyvinylpyrrolidon. Jeweils 100 dieser Gläschen werden in einer Styroporbox gelagert und transportiert. Messungen außerhalb einer gentechnischen Anlage werden in einem Messwagen am Ort der Probennahme durchgeführt. Dabei wird 1 ml der zu untersuchenden Wasserprobe mithilfe einer Kanüle in das Gefäß gespritzt und anschließend zwei Stunden bei Temperaturen von 20 - 35 °C inkubiert. Für die Bestimmung der Lichtemission in einem Luminometer (Wallac Victor) werden die Gläschen aus der Box entnommen. Nach der Messung werden die Gefäße in die Styroporbox zurückgestellt. Die in den Gefäßen enthaltenen, lebensfähigen rekombinanten Bakterien werden durch Injektion von 1 ml 6 %iger Wasserstoffperoxid-Lösung inaktiviert. Alle verwendeten Spritzen und Kanülen werden in bruch sicheren Gefäßen gesammelt, gekennzeichnet und verschlossen. Sowohl die Styroporbox inklusive der Probengefäße als auch die gesammelten Spritzen und Kanülen werden im Anschluss in eine gentechnische Anlage verbracht und dort autoklaviert [18].

Bewertung

Bei dem verwendeten rekombinanten Bakterienstamm handelt es sich um ein Derivat, das vom nicht-pathogenen *E. coli* K12 abgeleitet ist und zudem gemäß § 6 Abs. 4 GenTSV die

Kriterien eines Empfängerorganismus einer biologischen Sicherheitsmaßnahme erfüllt. Die mithilfe des Plasmids eingebrachten Nukleinsäureabschnitte erhöhen dabei das Gefährdungspotenzial des Empfängerorganismus nicht. Die rekombinanten Bakterien werden gemäß § 5 Abs. 1 i. V. m. Anhang I Nr. 2 GenTSV der Risikogruppe 1 zugeordnet.

Zudem liegen die rekombinanten Bakterien in versiegelten Rollrandgläschen vor, die ein geschlossenes System darstellen. Bei Einhalten der in der Bedienungsanleitung vorgegebenen Testbedingungen ist nicht davon auszugehen, dass die rekombinanten Bakterien in die Umwelt gelangen.

Zu beachten ist, dass es sich bei dem verwendeten pSB403-abgeleiteten Plasmid um einen Vektor handelt, der nicht nur in *E. coli* replizieren kann. Der darin enthaltene Replikationsursprung würde auch eine Plasmidvermehrung in anderen Gram-negativen Bakterien ermöglichen, die in Böden und Gewässern vorkommen. Um die Plasmide auf natürlicherweise vorkommende Bakterien übertragen zu können, bedarf es jedoch mehrerer Voraussetzungen. Hierfür müssten die Rollrandgläschen durch unsachgemäße Handhabung zu Bruch gehen und die darin enthaltene, lebensfähige Bakterienkultur in Kontakt mit dem Boden oder dem Gewässer des Freilandes gelangen. Im nun kontaminierten Boden oder Gewässer müssten in unmittelbarer Nähe Bakterien vorliegen, die als Helferstämmen für eine triparenterale Konjugation dienen könnten. Diese müssten die auf dem verwendeten Plasmid fehlenden Mobilisierungsgene (*mob*, *tra*) komplementieren können. Dabei sind die *mob*-Gene spezifisch für Plasmidfamilien, da der für einen Transfer notwendige Strangbruch der Plasmid-DNA mithilfe einer Nuklease in der *oriT*-Region sequenzspezifisch ist. Studien zum Plasmid-Transfer nach Mobilisierung mit vergleichbaren Plasmid-Systemen lassen darauf schließen, dass dieser nur unter geeigneten Bedingungen im Labor stattfinden kann. In Gewässerproben ließ sich solch eine Übertragung nicht zeigen [19]. Der Antragsteller selbst hat eine Untersuchung zur Überlebensfähigkeit der verwendeten Bakterien in unsterilen Böden durchgeführt. Hierfür wurden die lyophilisierten Bakterien eines Rollrandgläschens analog der Messprozedur mit 1 ml Aqua dest. rehydriert und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor diese Suspension zu 15 g einer unsterilen Bodenprobe gegeben wurde. Die Proben wurden über einen Zeitraum von 28 Tagen bei 30 °C inkubiert und zu ausgewählten Zeitpunkten auf Anwesenheit des auf dem Plasmid enthaltenen *luxA*-Gens durch PCR getestet. Das *luxA*-Gen war in diesen Studien nur bis zum 7. Tag der Inkubation mit spezifischen Primern amplifizierbar. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Studien, die zum Gentransfer rekombinanter *E. coli* K12-Stämme durchgeführt worden sind, welche ein pBR-abgeleitetes Plasmid tragen [11]. Nach derzeitigem Kenntnisstand ist die Wahrscheinlichkeit der Mobilisierung des hier verwendeten Plasmids bei sachgemäßer Handhabung des ASROlux-Systems nur sehr gering.

Durch Verwendung des ARSOLux-Systems ist zusammenfassend nicht von einem Gefährdungspotenzial für Mensch, Tier und die Umwelt in ihrem Wirkungsgefüge auszugehen.

Literatur

- [1] Cartagena Protocol on Biosafety to the Convention on Biological Diversity, Montreal 2000
- [2] Bachmann BJ (1972) Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev.* 36:525-557.
- [3] Curtiss R (1978) Biological containment and cloning vector transmissibility. *J Infectious Dis.* 137:668-675.
- [4] Edberg S (1991) Human health assessment of *Escherichia coli* K-12. unpublished, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

- [5] Ankel-Fuchs D, Brigelius-Flohe R (1993) Zur Pathogenität von *E. coli* K12 in der Maus. Schriftenreihe des Fonds der Chemischen Industrie, Heft 32. Informationsband Sicherheitsforschung in der Biotechnologie, 77-79.
- [6] Mieschendahl M, Finkernagel K, Hunke C, Spranz E (1992) Biologische Sicherheitsforschung zur Produktion von Humaninsulin mit gentechnisch veränderten *E. coli* K12-Zellen. Mitteilung: Überlebensfähigkeit des Produktionsstammes im Verdauungskanal des Göttinger Miniaturschweins. Zbl. Hyg. 193:342-349.
- [7] Levy SB, Marshall B, Rowse Eagle D (1980) Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science*. 209: 391-394.
- [8] Kruczek I, Strauch A, Lewin A (1996) Biologische Sicherheitsmaßnahmen. *Bundesgesundheitsbl Sonderheft Dez./96*
- [9] Mühldorfer I, Hacker J (1994) Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb Pathog.* 16:171-181.
- [10] Bogosian G, Sammons LE, Morris PJL, O'Neil JP, Heitkamp MA, Weber DB (1996) Death of the *Escherichia coli* K-12 Strain W3110 in soil and water. *Appl Environm Microbiol.* 62:4114-4120.
- [11] Kane JF (1993) Environmental assessment of recombinant DNA fermentations. *J Industr Microbiol.* 11:205-208.
- [12] Salevarasu S, Ow DS-W, Lee SY, Lee MM, Oh SKW, Karimi IA, Lee DY (2009) Characterization of *Escherichia coli* DH5 α growth and metabolism in complex medium using genome scale flux analysis. *Biotechnol Bioeng.* 102:923-934.
- [13] Scott DL, Ramanathan S, Shi W, Rosen BP, Daunert S (1997) Genetically engineered bacteria: electrochemical sensing systems for antimonite and arsenite. *Anal Chem.* 69:16-20.
- [14] Keen NT, Tamaki S, Kobayashi D, Trollinger D (1988) Improved broad host range plasmids for DNA cloning in Gram-negative bacteria. *Gene.* 70:191-197.
- [15] Winson MK, Swift S, Fish L, Throup JP, Jørgenson F, Chhabra SR, Bycroft BW, Williams P, Stewart GSAB (1998) Construction and analysis of *luxCDABE*-based plasmid sensors for investigating *N*-acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol Lett.* 163:185-192.
- [16] Stocker J, Balluch D, Gsell M, Harms H, Feliciano J, Daunert S, Malik KA, van der Meer JR (2003) Development of a set of simple bacterial biosensors for quantitative and rapid measurements of arsenite and arsenate in potable water. *Environ Sci Technol.* 37:4743-4750.
- [17] Wackwitz A, Harms H, Chatzinotas A, Breuer U, Vogne C, van den Meer JR (2008) Internal arsenite bioassay calibration using multiple bioreporter cell lines. *Microbial Biotechnol.* 1:149-157.
- [18] Manual des Arsenic-Biosensor ARSOLux, UFZ Leipzig
- [19] Mieschendahl M, Finkernagel K, Schaffrath S (1993) Biologische Sicherheitsforschung zur Produktion von Humaninsulin mit gentechnisch veränderten *E. coli* K12 Zellen; 2. Mitteilung: Plasmid-Transfer durch Mobilisation und Kointegratbildung unter Umweltbedingungen. Zbl. Hyg. 193:481-493.