ZKBS
Zentrale Kommission
für die Biologische Sicherheit

Az. 45270_a April 2021

Stellungnahme der ZKBS
zur Eignung von *Escherichia coli* K12-abgeleiteten Stämmen
als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 8 Absatz 1 GenTSV

1. Allgemeines

Mit dem Inkrafttreten der Novelle der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) zum März 2021 ist es erforderlich, dass entsprechend § 7 Abs. 5 GenTSV das Fortbestehen bereits anerkannter biologischer Sicherheitsmaßnahmen (hier: Vektor- und Empfängersysteme) durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit bestätigt wird. Unter § 8 Absatz 1 der novellierten GenTSV wird ausgeführt, nach welchen Voraussetzungen die Einstufung eines Empfängerorganismus als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt werden kann. Diese sind erfüllt, wenn 1. eine wissenschaftliche Beschreibung und eine taxonomische Einordnung des Empfängerorganismus vorliegen, 2. dieser für Mensch, Tier und Pflanzen nicht pathogen ist und keine umweltgefährdenden Eigenschaften aufweist, 3. die Vermehrung des Empfängerorganismus nur unter Bedingungen möglich ist, die außerhalb gentechnischer Anlagen selten oder nicht angetroffen werden und 4. der Empfängerorganismus nur einen geringen horizontalen Genaustausch mit anderen Spezies betreibt.

In dieser Stellungnahme wird geprüft und bewertet, ob Stämme, die sich von dem ursprünglichen *Escherichia coli* K-12 Isolat ableiten (*E. coli* K12-abgeleitete Stämme), die o.g. Vorrausetzungen erfüllen.

Die *E. coli* K12-abgeleiteten Stämme wurden bereits in den seit 1978 geltenden "Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in-vitro* neukombinierte Nukleinsäuren" (zuletzt in der 5. überarbeiteten Fassung von 1986) als biologische Sicherheitsmaßnahme (Empfängerorganismus) anerkannt. Dies wurde ebenso im 1. Gentechnikgesetz von 1990 fortgeschrieben. In den Jahrzehnten der breiten Nutzung der *E. coli* K12-abgeleiteten Stämme als biologische Sicherheitsmaßnahme haben sich diese ausnahmslos als sicher erwiesen.

1.1 Wissenschaftliche Beschreibung

Die Spezies *E. coli* gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Die Familie umfasst Gram-negative, nicht sporulierende, chemoorganotrophe, fakultativ anaerobe Stäbchen. *E. coli* gehört zum Mikrobiom des Dickdarms nahezu aller warmblütigen Säugetiere. Einige pathogene Vertreter der Spezies können schwere Krankheiten bei Menschen und Tieren auslösen [1].

Bei *E. coli* K-12 handelt es sich um einen Stamm, der aus einer Stuhlprobe eines rekonvaleszenten Diphtheriepatienten im Jahr 1922 isoliert wurde. Unter der Kennzeichnung „K-12“ wurde der Stamm in die Sammlung des *Bacteriology Department* der Universität Stanford im Jahr 1925 aufgenommen [2]. Derivate des *E. coli* K-12-Stammes wurden seit den 1940er Jahren für genetische Studien genutzt. Der ursprüngliche K-12 Stamm ist Lambda-

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

lysogen und enthält den F-Faktor. Der Phage Lambda wurde später durch UV-Strahlung und der F-Faktor durch Segregation entfernt [3]. Heutige *E. coli* K12-abgeleitete Stämme enthalten weder den Phagen Lambda noch den F-Faktor, sofern diese nicht nachträglich wieder eingebracht wurden. Seit 100 Jahren werden *E. coli* K12 und K12-abgeleitete Stämme ausschließlich außerhalb des natürlichen Habitats kultiviert. Über circa 70 Jahre hinweg wurden *E. coli* K12 und K12-abgeleitete Stämme ausschließlich auf Agarplatten oder in Stichagar-Kultur aufbewahrt, bevor sich der Einsatz von Kryokonservierung etablierte. Daher sind die Bakterien an die Existenz in Labor-Vollmedien adaptiert. In Folge der dauerhaften Kultivierung entstanden spontane Mutationen in den Stämmen [4]. So hatten sie z. B. nach 30-jähriger Kultivierung K- und O-Antigene verloren [5, 6]. Die spontanen und eingeführten Mutationen der jeweiligen *E. coli* K12-abgeleiteten Stämme sind vielfältig und gut charakterisiert, sodass die Stämme in der Grundlagenforschung und Biotechnologie vielseitig einsetzbar sind. So tragen z.B. Mutanten mit Auxotrophien zum geringen Überleben in der Umwelt bei und Stämme mit einem Defekt im *recA*-Gen weisen eine deutliche Reduktion von DNA-Reparaturmechanismen und Rekombinationsfähigkeit des bakteriellen Genoms auf. Die Genome verschiedener *E. coli* K12-abgeleiteter Stämme sind vollständig sequenziert [7–9].

Bei *E. coli* K12 und seinen vielfältigen Derivaten handelt es sich um wissenschaftlich sehr gut charakterisierte Modellorganismen mit einer taxonomisch eindeutigen Einordnung.

1.2 Pathogenes Potential von *E. coli* K12-Stämmen

Pathogene *E. coli*-Stämme sind primär assoziiert mit Krankheitssymptomen des Verdauungstrakts. Im *E. coli* K12-Stamm sind die meisten Virulenzfaktorgene abwesend, die in intestinal und extraintestinal pathogenen *E. coli*-Stämmen (IPEC und ExPEC) oder auch einzeln oder kombiniert in apathogenen Isolaten (ECOR-Stämme) vorkommen. Virulenzfaktorgene sind in pathogenen *E. coli*-Stämmen meist in der Form von Pathogenitätsinseln in großen Blöcken angeordnet. Diese können sich im Chromosom, auf Plasmiden oder auf dem Genom von Bakteriophagen befinden. Entsprechende Chromosomabschnitte, Plasmide oder Prophagen liegen in *E. coli* K12 nicht vor [10]. Gene für die meisten Adhäsine sowie für Toxine, O-Antigene, Glykokalyx-Proteine, Invasine und andere Virulenzfaktoren fehlen [10, 11]. *E. coli* K12 kann sich nicht an der Mucosa des Darmepithels anheften, da keine Adhäsine hierfür exprimiert werden, die Produktion von O-Antigenen gestört ist und keine Kapsel gebildet wird. Würden *E. coli* K12-Derivate durch Laborpersonal akzidentell oral oder in die Blutbahn aufgenommen, würden sie sich nicht etablieren bzw. würden rasch vom körpereigenen Immunsystem erkannt und eliminiert [11]. Eine lange Verweildauer oder eine dauerhafte Besiedlung von Mensch und Tier mit *E. coli* K12 ist demnach ausgeschlossen. Krankheitssymptome nach oraler Aufnahme von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen sind in Probanden und in Versuchstieren nicht aufgetreten [12–14]. Im Mausmodel ist die peritoneale Injektion von 10^6 koloniebildende Einheiten von *E. coli* K12-Derivaten nicht gesundheitsschädlich. Nach sieben Tagen sind keine lebenden Bakterien in Organen nachweisbar [12]. Bei *E. coli*-Wildtypstämmen aus Patientenblutproben beträgt im Mausmodel die mittlere letale Dosis bei intravenöser Gabe 10^5 lebende Bakterien. Für *E. coli* K12-abgeleitete Stämme wird eine 10^3 – 10^4-fach größere Bakterienmenge benötigt, um eine Mortalität von 30 bis 40 % zu erreichen [15]. Die akzidentelle Injektion einer gesundheitsgefährdenden relevanten Menge von *E. coli* K12-Derivaten in gentechnischen Arbeiten ist nicht zu erwarten, sodass kein Gefährdungspotential besteht.

Bestimmte pathogene *E. coli*-Stämme sind in der Lage, sich außerhalb des normalen Wirtsbereiches zu vermehren. Der EHEC-Stamm *E. coli* O157:H17 vermehrt sich beispielsweise auf bewässerten und/oder geschädigten Pflanzen [16, 17]. Dieser oder andere *E. coli*-Stämme verursachen jedoch keine Pflanzenkrankheiten [18–20]. Auch *E. coli* K12-abgeleitete Stämme weisen keine Pathogenität für Pflanzen auf [21].

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

E. coli K12 und K12-abgeleitete Stämme sind apathogen und stellen damit kein Risiko für Mensch, Tier und Pflanze dar.

1.3 Vermehrungsfähigkeit von *E. coli* K12 außerhalb von gentechnischen Anlagen

Die Überlebensfähigkeit von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen im Darm wurde in zahlreichen Untersuchungen an Mensch und Tier getestet. Spätestens 6 Tage nach einer oralen Verabreichung sind *E. coli* K12-abgeleitete Stämme nicht mehr im menschlichen Darm nachweisbar [13, 14, 22, 23]. Auch in Mäusen etablieren sich *E. coli* K12-abgeleitete Stämme nicht dauerhaft im Darm [24]. Zudem sind *E. coli* K12-abgeleitete Stämme nicht in der Lage, den Darm von keimfreien Ratten zu besiedeln [25].

Vielfältige Studien mit Boden-, Oberflächen- und Wasserproben zeigen zudem, dass *E. coli* K12-abgeleitete Stämme auch in der Umwelt nicht überdauern können. Bei der Kontamination von Böden überlebten *E. coli* K12-abgeleitete Stämme nicht länger als 28 Tage [21, 26–28]. Wildtyp-*E. coli* überleben dagegen bis zum Endes des Untersuchungszeitraums von 80 Tagen in Böden [29]. Im Fall einer Freisetzung von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen in Form von Aerosolen ist von einer Überlebensdauer bis maximal 2 Stunden in der Luft auszugehen [30]. Sedimentierte Bakterien überdauern auf Oberflächen abhängig vom Material hingegen bis zu 20 Tage (Holzoberflächen), im Mittel aber nicht länger als 24 Stunden [30]. Bei der Verteilung von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf Kopfsalatpflanzen mittels Beregnungsanlagen kann nach maximal 7 Tagen kein *E. coli* mehr nachgewiesen werden [21]. Pathogene *E. coli*-Wildtypen hingegen vermehren sich auf Kopfsalatpflanzen und sind noch bis zum Ende des Untersuchungszeitraums von 30 Tagen nachweisbar [17]. Als Grund wird angenommen, dass sich *E. coli* K12-abgeleitete Stämme nicht an die Pflanzenoberfläche anheften können, da sie keine Curli-Fimbrien bilden [31]. Erfolgt die Freisetzung von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen in Fließgewässern, so beträgt die Überlebenszeit maximal 15 Tage. Findet die Freisetzung nahe dem Einlass gereinigter Abwässer statt, so überleben die Bakterien maximal 10 Tage [28, 32, 33]. Bei der Freisetzung in Stillgewässer überleben *E. coli* K12-abgeleitete Stämme bis zu 16 Tage. Erfolgt zusätzlich eine Einleitung von Nährmedien in das Gewässer, kann der Nachweis im Gewässer noch bis zu 10 Wochen erfolgen [34]. Im Meerwasser überleben *E. coli* K12-abgeleitete Stämme bis zu 6 Tage bei 15 °C Wassertemperatur [35]. Generell sinkt die Überlebensdauer der Bakterien mit steigender Wassertemperatur sowohl im Salz- als auch im Süßwasser [32, 35]. Die Anwesenheit von *E. coli* im Wasser führt nicht zur Besiedlung des Darms von Fischen [36].

Zusammenfassend zeigt dies, dass *E. coli* K12-abgeleitete Stämme nur kurzzeitig in der Lage sind, in Böden, in Aerosolen, auf Oberflächen, auf Pflanzen sowie in Gewässern zu überleben. Eine dauerhafte Etablierung in der Umwelt erfolgt nicht.

1.4 Horizontaler Gentransfer von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen zu anderen Organismen

Horizontaler Gentransfer bei Bakterien kann durch Prozesse wie Transformation, Transduktion, Konjugation und Mobilisierung von genetischem Material stattfinden, deren molekulare Abläufe umfassend untersucht wurden [37]. Die Häufigkeit von horizontalen Gentransferereignissen von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf endemische Bakterienspezies ist in zahlreichen *in-vitro* Experimenten untersucht worden. Ein seltener Gentransfer von *E. coli* auf eukaryotische Zellen ist bisher nur in speziellen Laborversuchen gezeigt worden und stellt keinen natürlichen Vorgang dar [38].

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

1.4.1 Transformation

E. coli K12 ist wie *E. coli* generell nicht in der Lage, DNA aktiv aus der Umgebung aufzunehmen, und weist somit keine natürliche Kompetenz auf, die bei zahlreichen anderen Bakterienspezies vorliegt [39]. DNA gelangt nur unter solchen experimentellen Bedingungen in *E. coli*-Zellen, die die äußere und innere Membran der Bakterien hierfür durchlässig machen, z. B. durch die Anwendung physikalischer (Elektroporation) oder chemischer (Ca^{2+}-Schock) Methoden. Auch wenn es im natürlichen Habitat von *E. coli* andere Bakterienspezies mit einer natürlichen Kompetenz für die Aufnahme von DNA gibt, ist es wenig wahrscheinlich, dass freie DNA aus abgestorbenen *E. coli* K12-Zellen durch solche Bakterienspezies im Darm aufgenommen wird, da DNA dort schnell abgebaut wird [39, 40].

1.4.2 Transduktion

In genetischen Untersuchungen von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen wurden verschiedene transduzierende Phagen verwendet. Von besonderer Relevanz sind dabei die Phagen Lambda und P1.

Der temperente Phage Lambda war bereits im ursprünglichen *E. coli* K-12-Isolat präsent. Im lysogenen Zyklus erfolgt die Integration der Lambda-DNA an einer spezifischen Stelle der Wirts-DNA. Nach der Induktion kann in seltenen Fällen die Exzision des Prophagen fehlerhaft verlaufen, sodass dem Integrationsort benachbarte Gene (*bio*- bzw. *gal*-Operon) im Genom des Phagen integriert vorliegen. Solche Phagenpartikel sind transduzierend und übertragen *bio*-Gene oder *gal*-Gene. Somit gehört der Prophage Lambda zu den speziell transduzierenden Phagen, die nur spezifische bakterielle DNA-Abschnitte übertragen [41]. Bei der Infektion eines Wirtes mit Lambda werden im lytischen Zyklus keine transduzierenden Phagenpartikel gebildet. Der Phage Lambda hat einen sehr engen Wirtsbereich. Obwohl der Lambda Rezeptor Maltoporin auch in anderen Gram-negativen Bakterienspezies präsent ist, werden aufgrund der Zugänglichkeit des Rezeptors durch die LPS-Zusammensetzung nur *E. coli*-Stämme infiziert [42]. Somit ist der Lambda-Phage für horizontale Gentransferereignisse auf andere Bakterienspezies nicht relevant.

Von höherer Bedeutung für den horizontalen Gentransfer ist der temperente Phage P1, der sich durch einen breiten Wirtsbereich auszeichnet. Neben *E. coli* kann der Phage P1 *Shigella dysenteriae, Klebsiella aerogenes, Citrobacter freundii, Erwinia amylovora, Proteus mirabilis* und weitere Bakterienspezies infizieren [43]. Nach einem lytischen Vermehrungszyklus sind 0,3 – 0,5 % der P1-Phagenpartikel transduzierend. Die Produktion transduzierender Partikel ist nicht an die Induktion eines Prophagen gekoppelt. In transduzierenden Phagenpartikeln befindet sich ausschließlich DNA bakteriellen Ursprungs (Chromosom- oder Plasmid-DNA). Der Phage P1 zählt zu den generell transduzierenden Phagen und überträgt DNA-Segmente von ca. 100 kbp.

1.4.3 Konjugation und Mobilisierung

Die bakterielle Konjugation ist ein Vorgang, in dem es zum physikalischen Zellkontakt zwischen Donor und Rezipient und einem anschließenden Transfer eines DNA-Einzelstranges (ss-DNA) kommt. Der Donor trägt im Gegensatz zum Rezipienten ein konjugatives Plasmid. Konjugative Plasmide besitzen Gene und Sequenzen, die für den DNA-Transfer essentiell sind (*mob, tra, oriT*). Ein Beispiel für konjugative Plasmide ist der F-Faktor. Im *tra*-Operon des F-Faktors sind die Proteine kodiert, die an der Konjugation beteiligt sind. Andere konjugative Plasmide besitzen Homologe der *tra*-Gene. Mithilfe des F-Pilus wird ein direkter Zell-Zellkontakt zwischen Donor (F^+) und Rezipient (F^-) hergestellt und nach Retraktion des Pilus ein stabiles Konjugationspaar („*mating pair*“) hergestellt. Anschließend erzeugt die Relaxase

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

TraI am Ursprung des Transfers (*oriT*) des F-Faktors einen Einzelstrangbruch. Daraufhin entwindet die Relaxase TraI die dsDNA. Das TraD-Protein („*Coupling Protein*“) transportiert aktiv die nun lineare ssDNA des F-Faktors durch eine aus Tra Proteinen bestehende komplexe Pore in das Zytoplasma des Rezipienten (TypIV-Sekretion, [44]). Währenddessen findet im Donor die *rolling-circle*-Replikation des F-Faktors statt. Im Rezipienten rezirkularisiert die ssDNA und der komplementäre DNA-Strang wird synthetisiert [45]. F-Plasmide mit einer Mutation in *traD* sind nicht mehr konjugativ, können aber mobilisierbare Plasmide mit eigenem Gen für ein „*Coupling protein*“ noch mobilisieren.

Nichtkonjugative Plasmide, die einen *oriT* und Mobilisierungsgene (*mob*) besitzen, können bei Anwesenheit eines konjugativen Helferplasmides transferiert werden. Nicht jedes mobilisierbare Plasmid wird aber durch jedes konjugative Plasmid mobilisiert. Das in *E. coli* vorkommende ColE1-Plasmid ist ein Vertreter für durch den F-Faktor mobilisierbare Plasmide und spielt für die Molekularbiologie eine große Rolle. Die *mob*-Genprodukte bilden einen Relaxationskomplex und die ssDNA des ColE1-Plasmids kann nun durch die Transfermaschinerie des F-Faktors auf einen Rezipienten übertragen werden.

Neben den beschriebenen Fällen der Konjugation, in denen konjugative oder mobilisierbare Plasmide auf Rezipienten übertragen werden, kann auch chromosomale DNA durch Konjugation übertragen werden, wenn konjugative Plasmide im Chromosom des Donors integriert sind. Im Falle des F-Faktors erfolgt die Integration in das Wirts-Chromosom über Rekombination zwischen Insertionselementen (IS Elemente) des F-Faktors und denen im Wirtschromosom. Nach der Integration steuert der F-Faktor nicht mehr seine eigene Replikation. Die Funktion des *tra*-Operons wird dadurch nicht beeinträchtigt. Trifft ein Donor mit integriertem F-Faktor einen F^- Rezipienten, wird die Konjugation wie in einer F^+-Zelle ausgelöst und der DNA-Transfer am *oriT* initiiert. Da der F-Faktor nun Teil des Chromosoms ist, können nach dem Transfer der F-Faktor-DNA auch chromosomale Gene übertragen werden. Durch homologe Rekombination können diese im Rezipienten ins Chromosom integriert werden. Aufgrund der hohen Rekombinationshäufigkeit tragen solche Stämme die Bezeichnung *high frequency of recombination* (Hfr). Mitunter können integrierte F-Faktoren aus dem Chromosom exzisiert werden. In Einzelfällen verläuft die Exzision aufgrund illegitimer Rekombinationsereignisse fehlerhaft, sodass chromosomale Gene in den freigesetzten F-Faktor eingeschlossen ist. Ein solcher Stamm trägt die Bezeichnung F-*prime* (F‘) [46]. Die Integration des F-Faktors ins Chromosom sowie die Exzision sind RecA-abhängig. Durch die Wahl von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen mit mutiertem *recA*-Gen kann die spontane Bildung von Hfr- und F’-Stämmen bei gentechnischen Arbeiten mit dem F-Faktor deutlich reduziert werden [47]. Andere konjugative Plasmide, wie das IncP-Plasmid RP4, können ebenfalls chromosomal integriert vorliegen, entweder durch natürlich vorkommende Integrationsprozesse oder als Konsequenz gentechnischer Arbeiten.

Eine Mobilisierung eines Plasmides ohne *mob* und *oriT* ist ebenfalls möglich, wenn in der Donorzelle durch Rekombination zwischen dem nicht mobilisierbaren und dem konjugierenden Plasmid ein Cointegrat gebildet wird. Dieses chimäre Plasmid kann durch Konjugation auf einen Rezipienten übertragen werden. Hier kann das Cointegrat durch Rekombination aufgelöst werden [48, 49].

Konjugative Plasmide mit breitem Wirtsbereich haben Bedeutung für den horizontalen Gentransfer durch Konjugation. Diese Plasmide können Kontakt mit Zellen unterschiedlicher Spezies herbeiführen. Weiterhin sind sie in der Lage, in Rezipienten anderer Spezies zu replizieren und deren Modifikations- und Restriktionssystem für die Eliminierung fremder DNA zu entgehen [50]. Das IncP-Plasmid RP4 ist ein wichtiger Vertreter konjugativer Plasmide mit breitem Wirtsbereich und der Fähigkeit zur Mobilisierung. Es kann in nahezu allen Alpha-, Beta- und Gammaproteobakterien replizieren [50, 51]. Aufgrund dieser Eigenschaft wird es in gentechnischen Arbeiten zur Mobilisierung von Plasmiden mit einem *oriT* auf diverse Gram-

negative Bakterienspezies genutzt. Der F-Faktor dagegen ist ein Plasmid mit engem Wirtsbereich, welches nur in einigen Spezies der Familie *Enterobacteriaceae* replizieren kann. Für den horizontalen Gentransfer ist es somit nur von geringer Bedeutung [52, 53].

1.4.4 Nachgewiesene horizontale Gentransferereignisse

Die Häufigkeit horizontaler Gentransferereignisse von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf endemische Bakterienspezies wurde in unterschiedlichen Milieus untersucht. Von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen ist kein Transfer von konjugativen Plasmiden auf andere Bakterienspezies im Darm nachgewiesen [54, 55]. Im Vergleich dazu sind Wildtyp-*E. coli* Stämme in der Lage, im tierischen Darm konjugative Resistenzplasmide auf *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium zu übertragen [56].

Weiterhin wurde der horizontale Gentransfer von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen in Erdböden untersucht. Ein Transfer eines konjugativen RP4-Derivats von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf *Sinorhizobium fredii* konnte nur bei hohen Zelldichten von 10^6 bis 10^9 Spender- und Empfängerzellen je g steriler Erde beobachtet werden [57]. In nicht steriler Erde konnte der Transfer von RP4 durch *E. coli* K12-abgeleitete Stämme auf die endemischen Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas putida*, *Burkholderia cepacia* und *Pseudomonas fluorescens* nachgewiesen werden [58]. Eine Mobilisierung von nicht-konjugativen Plasmiden in *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf andere Bodenbakterien ist nicht beobachtet worden [59]. In sterilem Meerwasser wurde der Transfer von RP4 von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf *Pseudomonas fluorescens, Aeromonas hydrophila, Pseudomonas cepacia* und *Enterobacter cloacae* beobachtet [60].

2. Empfehlung

Nach § 8 Absatz 1 GenTSV werden *Escherichia coli* K12-abgeleitete Stämme als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt, in denen weder konjugative Plasmide mit breitem Wirtsbereich und Fähigkeit zur Mobilisierung noch generell transduzierende Prophagen mit breitem Wirtsbereich vorliegen.

3. Begründung

E. coli K12-abgeleitete Stämme erfüllen die Vorrausetzungen des § 8 GenTSV für die Anerkennung als Empfängerorganismen für biologische Sicherheitsmaßnahmen. Sie sind wissenschaftlich sehr gut beschrieben. Weder sind *E. coli* K12-abgeleitete Stämme pathogen für Mensch, Tier und Pflanze noch können sich die Bakterien im Darm oder auf Pflanzen vermehren oder dauerhaft etablieren. Das Überleben von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen außerhalb gentechnischer Anlagen ist gut untersucht und es ist gezeigt, dass die Bakterien nur für kurze Zeiträume in Böden, Aerosolen, Oberflächen und Gewässern überlebensfähig sind. *E. coli* K12-abgeleitete Stämme stellen wegen ihrer geringen Überlebensfähigkeit in der Umwelt und ihrer Apathogenität keine Gefahr für die Rechtsgüter nach § 1 Abs. 1 GenTG dar. Der horizontale Gentransfer von *E. coli* K12-abgeleiteten Stämmen auf Bakterien im Menschen und in der Umwelt ist im Allgemeinen sehr gering.

Das sehr geringe Gentransferpotenzial trifft jedoch nicht auf solche *E. coli* K12-abgeleitete Stämme zu, in denen konjugative Plasmide mit breitem Wirtsbereich und Fähigkeit zur Mobilisierung sowie generell transduzierende Prophagen mit breitem Wirtsbereich vorhanden sind. Dadurch ist die Möglichkeit des horizontalen Gentransfers für diese *E. coli* K12-Varianten nicht mehr als gering einzuschätzen. Empfängerstämme mit z.B. RP4-Plasmid und/oder P1-Prophagen werden somit nicht als biologische Sicherheitsmaßnahme anerkannt.

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

Informationen dazu, ob einzelnen *E. coli* K12-abgeleitete Stämme entsprechend der in dieser Stellungnahme festgelegten Kriterien als Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet sind, werden in der Datenbank der Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen gesammelt und zur Verfügung gestellt, die von der ZKBS-Geschäftsstelle geführt wird.

Literatur

1. **Brenner DJ, Farmer III JJ** (2015). *Enterobacteriaceae*. p. 1–24. *In* Whitman WB (ed), Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, vol. 2015. Wiley, New York.
2. **Bachmann BJ** (1972). Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriol Rev* **36**(4):525.
3. **Jacob F, Wollman EL** (1961). Sexuality and the genetics of bacteria. Academic Press, New York
4. **Bachmann BJ** (1996). Derivations and genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12. p. 2460–88. *In* Frederick Carl Neidhardt, Roy Curtiss (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular *Biology* . ASM Press, Washington D.C.
5. **Orskov I, Orskov F** (1960). The H antigen of the "K12" strain. A new *E. coli* H antigen: H48. *Acta Pathol Microbiol Scand* **48**:47.
6. **Orskov F, Orskov I** (1961). The fertility of *Escherichia coli* antigen test strains in crosses with K 12. *Acta Pathol Microbiol Scand* **51**:280–90.
7. **Durfee T, Nelson R, Baldwin S, Plunkett G, Burland V, Mau B, Petrosino JF, Qin X, Muzny DM, Ayele M, Gibbs RA, Csörgo B, Pósfai G, Weinstock GM, Blattner FR** (2008). The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. *J Bacteriol* **190**(7):2597–606.
8. **Anton BP, Raleigh EA** (2016). Complete Genome Sequence of NEB 5-alpha, a Derivative of *Escherichia coli* K-12 DH5α. *Genome Announc* **4**(6):e01245-16.
9. **Hayashi K, Morooka N, Yamamoto Y, Fujita K, Isono K, Choi S, Ohtsubo E, Baba T, Wanner BL, Mori H, Horiuchi T** (2006). Highly accurate genome sequences of *Escherichia coli* K-12 strains MG1655 and W3110. *Mol Syst Biol* **2**:2006.0007.
10. **van Ijperen C, Kuhnert P, Frey J, Clewley JP** (2002). Virulence typing of *Escherichia coli* using microarrays. *Mol Cell Probes* **16**(5):371–8.
11. **Mühldorfer I, Hacker J** (1994). Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence. *Microb Pathog* **16**(3):171–81.
12. **Chart H, Smith HR, La Ragione RM, Woodward MJ** (2000). An investigation into the pathogenic properties of Escherichia coli strains BLR, BL21, DH5α and EQ1. *J Appl Microbiol* **89**(6):1048–58.
13. **Levy SB, Marshall B, Rowse-Eagle D, Onderdonk A** (1980). Survival of *Escherichia coli* host-vector systems in the mammalian intestine. *Science* **209**(4454):391–4.
14. **Smith HW** (1975). Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of man. *Nature* **255**(5508):500–2.
15. **Levy SB, SULLIVAN N, Gorbach SL** (1978). Pathogenicity of conventional and debilitated Escherichia coli K12. *Nature* **274**(5669):395–6.
16. **Simko I, Zhou Y, Brandl MT** (2015). Downy mildew disease promotes the colonization of romaine lettuce by *Escherichia coli* O157:H7 and Salmonella enterica. *BMC Microbiology* **15**(1):19.
17. **Solomon EB, Pang H-J, Matthews KR** (2003). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 on Lettuce Plants following Spray Irrigation with Contaminated Water. *J Food Prot* **66**(12):2198–202.
18. **Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ** (2006). Comparative genomics reveals what makes an enterobacterial plant pathogen. *Annu. Rev. Phytopathol.* **44**:305–36.
19. **Delaquis P, Bach S, Dinu L-D** (2007). Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 in leafy vegetables. *J Food Prot* **70**(8):1966–74.
20. **Seo S, Matthews KR** (2012). Influence of the Plant Defense Response to *Escherichia coli* O157:H7 Cell Surface Structures on Survival of That Enteric Pathogen on Plant Surfaces. *Appl Environ Microbiol* **78**(16):5882–9.
21. **Fonseca JM, Fallon SD, Sanchez CA, Nolte KD** (2011). *Escherichia coli* survival in lettuce fields following its introduction through different irrigation systems. *J Appl Microbiol* **110**(4):893–902.

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

22. **Anderson ES** (1975). Viability of, and transfer of a plasmid from, *E. coli* K12 in the human intestine. *Nature* **255**(5508):502–4.
23. **Williams PH** (1977). Plasmid transfer in the human alimentary tract. *FEMS Microbiol Lett* **2**(2):91–5.
24. **Freter R, Brickner H, Fekete J, Vickerman MM, Carey KE** (1983). Survival and implantation of *Escherichia coli* in the intestinal tract. *Infect Immun* **39**(2):686–703.
25. **Wells CL, Johnson WJ, Kan CM, Balish E** (1978). Inability of debilitated *Escherichia coli* χ 1776 to colonise germ-free rodents. *Nature* **274**(5669):397–8.
26. **Walter MV, Barbour K, McDowell M, Seidler RJ** (1987). A method to evaluate survival of genetically engineered bacteria in soil extracts. *Curr Microbiol* **15**(4):193–7.
27. **Devanas MA, Rafaeli-Eshkol D, Stotzky G** (1986). Survival of plasmid-containing strains of *Escherichia coli* in soil: effect of plasmid size and nutrients on survival of hosts and maintenance of plasmids. *Curr Microbiol* **13**(5):269–77.
28. **Bogosian G, Sammons LE, Morris PJ, O'Neil JP, Heitkamp MA, Weber DB** (1996). Death of the *Escherichia coli* K-12 strain W3110 in soil and water. *Appl Environ Microbiol* **62**(11):4114.
29. **Cools D, Merckx R, Vlassak K, Verhaegen J** (2001). Survival of *E. coli* and *Enterococcus* spp. derived from pig slurry in soils of different texture. *Appl Soil Ecol* **17**(1):53–62.
30. **Marshall B, Flynn P, Kamely D, Levy SB** (1988). Survival of *Escherichia coli* with and without ColE1:Tn5 after aerosol dispersal in a laboratory and a farm environment. *Appl Environ Microbiol* **54**(7):1776–83.
31. **Jeter C, Matthysse AG** (2005). Characterization of the Binding of Diarrheagenic Strains of *E. coli* to Plant Surfaces and the Role of Curli in the Interaction of the Bacteria with Alfalfa Sprouts. *Mol Plant Microbe Interact* **18**(11):1235–42.
32. **Flint KP** (1987). The long-term survival of *Escherichia coli* in river water. *J Appl Bacteriol* **63**(3):261–70.
33. **Chao WL, Feng RL** (1990). Survival of genetically engineered *Escherichia coli* in natural soil and river water. *J Appl Bacteriol* **68**(4):319–25.
34. **Brettar I, Höfle MG** (1992). Influence of ecosystematic factors on survival of *Escherichia coli* after large-scale release into lake water mesocosms. *Appl Environ Microbiol* **58**(7):2201.
35. **Sørensen SJ** (1991). Survival of *Escherichia coli* K12 in seawater. *FEMS Microbiol Lett* **85**(2):161–7.
36. **Del Rio-Rodriguez RE, Inglis V, Millar SD** (1997). Survival of *Escherichia coli* in the intestine of fish. *Aquac Res* **28**(4):257–64.
37. **Dreiseikelmann B** (1994). Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev* **58**(3):293–316.
38. **Lacroix B, Citovsky V** (2016). Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. *mBio* **7**(4).
39. **Lorenz MG, Wackernagel W** (1994). Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* **58**(3):563–602.
40. **Maturin L, Curtiss R** (1977). Degradation of DNA by nucleases in intestinal tract of rats. *Science* **196**(4286):216.
41. **Morse ML, Lederberg EM, Lederberg J** (1956). Transduction in *Escherichia Coli* K-12. *Genetics* **41**(1):142–56.
42. **Schwartz M, Le Minor L** (1975). Occurrence of the bacteriophage lambda receptor in some enterobacteriaceae. *J Virol* **15**(4):679–85.
43. **Yarmolinsky MB, Sternberg N** (1988). Bacteriophage P1. p. 291–438. *In* Richard Calendar (ed), The bacteriophages, 1st ed. Plenum Press, New York.
44. **Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS** (2003). F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**(1):1–15.
45. **Frost LS, Ippen-Ihler K, Skurray RA** (1994). Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiol Rev* **58**(2):162–210.
46. **Scaife J** (1967). Episomes. *Annu Rev Microbiol* **21**(1):601–38.
47. **Cullum J, Broda P** (1979). Chromosome transfer and Hfr formation by F in rec+ and recA strains of *Escherichia coli* K12. *Plasmid* **2**(3):358–65.
48. **Dionisio F, Zilhão R, Gama JA** (2019). Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid* **102**:29–36.

BVL_FO_05_4100_402_V1.6

49. **Kilbane JJ, Malamy MH** (1980). F factor mobilization of non-conjugative chimeric plasmids in *Escherichia coli*: General mechanisms and a role for site-specific *recA*-independent recombination at oriV1. *J Mol Biol* **143**(1):73–93.
50. **Jain A, Srivastava P** (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett* **348**(2):87–96.
51. **Datta N, Hedges RW** (1972). Host ranges of R factors. *Microbiology* **70**(3):453–60.
52. **Guiney DG** (1982). Host range of conjugation and replication functions of the *Escherichia coli* sex plasmid Flac: Comparison with the broad host-range plasmid RK2. *J Mol Biol* **162**(3):699–703.
53. **Zhong Z, Helinski D, Toukdarian A** (2005). Plasmid host-range: restrictions to F replication in *Pseudomonas*. *Plasmid* **54**(1):48–56.
54. **Marshall B, Schluederberg S, Tachibana C, Levy SB** (1981). Survival and transfer in the human gut of poorly mobilizable (pBR322) and of transferable plasmids from the same carrier E. coli. *Gene* **14**(3):145–54.
55. **Levy SB, Marshall B** (1981). Risk assessment studies of *E. coli* host-vector systems. *Recomb DNA Tech Bull* **4**:91–8.
56. **Guinée PAM** (1965). Transfer of multiple drug resistance from *Escherichia coli* to *Salmonella typhi murium* in the mouse intestine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **31**(1):314–22.
57. **Richaume A, Angle JS, Sadowsky MJ** (1989). Influence of soil variables on *in situ* plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Rhizobium fredii*. *Appl Environ Microbiol* **55**(7):1730.
58. **Sørensen SJ, Schyberg T, Rønn R** (1999). Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. *Appl Soil Ecol* **11**(1):79–90.
59. **Bogosian G, Kane JF** (1991). Fate of Recombinant *Escherichia coli* K-12 Strains in the Environment. p. 87–131. *In* Neidleman SL, Laskin AI (ed), Advances in Applied Microbiology, vol. 36. Academic Press, New York.
60. **Sørensen SJ** (1993). Transfer of plasmid RP4 from *Escherichia coli* K-12 to indigenous bacteria of seawater. *Microb Releases* **2**(3):135–41.