



Stellungnahme der ZKBS zum Ampicillinresistenz-Gen in gentechnisch verändertem Mais

I. Einleitung

Am 18.12.1996 wurde von der EU-Kommission dem Antrag der Fa. Ciba-Geigy auf Inverkehrbringen von gentechnisch verändertem Mais stattgegeben. Nachdem die französische Behörde, über die der Antrag eingebracht wurde, am 4.2.1997 die Entscheidung veröffentlichte, ist das EU-weite Inverkehrbringen des Mais gestattet. Dieser gentechnisch veränderte Mais besitzt neben dem Gen für ein B.t.-Toxin, das einen Schutz gegen den Maiszünsler vermittelt, ein Gen für die Toleranz gegen das Unkrautvernichtungsmittel Basta (Wirkstoff Phosphinotricin), sowie ein Ampicillinresistenz-Gen (*amp^r*). Der zur Pflanzentransformation verwendete Vektor, ein pUC-Plasmid, trug neben dem B.t.-Gen und dem Phosphinotricin-Toleranzgen auch das *amp^r*-Gen. Im Gegensatz zu dem Herbizid-Toleranz-Gen, *pat*, das zur Selektion der erfolgreich transformierten Pflanzen benötigt wurde, ist das *amp^r*-Gen lediglich ein Bestandteil des verwendeten Vektors pUC zur Selektion der bakteriellen Transformanten. Der B.t.-Mais wurde mit Hilfe der *microprojectile bombardment* Methode erzeugt. Als Folge dieser Transformationsmethode wurde das *amp^r*-Gen ebenfalls mit in die Pflanze übertragen.

II. Das *amp^r*-Gen

Bei der Ampicillinresistenz im B.t.-Mais von Ciba-Geigy handelt es sich um das Gen für die TEM-1 β -Laktamase. TEM-1 ist die am weitesten verbreitete β -Laktamase (Sanders und Sanders, 1992). Etwa die Hälfte der klinischen *E. coli*-Isolate besitzen heute eine Ampicillinresistenz. Diese ist überwiegend, d. h. zu etwa 90 %; durch den β -Laktamasentyp TEM-1 bedingt (Livermore 1995).

Das Gen für diese β -Laktamase liegt plasmidkodiert vor. Im molekularbiologischen Sprachgebrauch wird es als *amp^r* oder *bla_(TEM-1)* bezeichnet (vgl. Ciba, 1996) und liegt auf einer Reihe von Klonierungsvektoren vor (pBR322-Derivate, pUC-Serien etc.).

TEM-1 selbst hat gegenüber neueren Cephalosporinen nur eine sehr geringe Aktivität und ist durch β -Laktamase-Hemmer wie Clavulansäure oder Tazobactam inhibierbar. Jedoch kann bei *E. coli* eine hohe Expressionsrate Resistenzen gegen Amoxicillin / Tazobactam und gegen andere Kombinationen von β -Laktamen / β -Laktamase-Inhibitoren hervorrufen (Sanders und Sanders, 1992).

Besondere Beachtung verdienen die in den letzten Jahren zunehmend auftretenden Mutationen der TEM-1 und SHV-1 β -Laktamasen (vgl. Davies, 1994). Als Folge dieser Mutationen weisen einige TEM-Derivate Aktivität auch gegen neuere Cephalosporine und Monobactame auf und werden als *extended spectrum beta-lactamases* (ESBL) bezeichnet. Detaillierte Beschreibungen ihrer Substratspezifitäten / Reaktionsgeschwindigkeiten sind z. B. bei Livermore (1995) und Bush et al (1995) zu finden. Insbesondere bei *Klebsiella pneumoniae*, aber auch bei *E. coli*, *Serratia marcescens*, verschiedenen anderen Enterobacteriaceae, *Citrobacter* und Salmonellen-Spezies wurden diese Enzyme detektiert. Die regionalen Unterschiede, die in der Frequenz der Isolate zu beobachten sind, spiegeln sicherlich den Selektionsdruck



wieder, der durch unterschiedlichen β -Laktam-Einsatz in den entsprechenden Ländern bedingt wird.

Mutationen der TEM-1 β -Laktamase (z.B. TEM-30 bis TEM-41) führen weiterhin dazu, daß diese Enzyme nur schlecht durch Clavulansäure inhibierbar sind. Im Klassifizierungsschema von Bush (1995) wurden solche Varianten als eigene Unterklasse 2br eingeführt. Bisher wurden diese *inhibitor resistant* TEM- β -Laktamasen (IRT) nur in *E. coli* und vereinzelt in *Proteus mirabilis* gefunden. In einer aktuellen Arbeit wird berichtet, daß auch bei *Klebsiella pneumoniae* dieser Typ auftritt (Bermudes und Morand, 1997). Die Autoren äußerten die Befürchtung, daß sich IRT auch auf *Haemophilus influenzae* und *Neisseria gonorrhoe*, die ebenfalls häufig TEM-1 β -Laktamasen produzieren, ausbreiten könnten.

Der Gebrauch von Ampicillin ohne geeignete β -Laktamase-Hemmer ist heute nur bei vorhergehender Resistenztestung angebracht. Trotzdem wird Ampicillin nicht nur bei Enterokokken-Infektionen sondern auch bei Infektionen mit *Haemophilus influenzae* weiterhin als Mittel der Wahl betrachtet.

III. Bewertung der Übertragbarkeit des β -Laktamase-Gens im B.t.-Mais von Ciba-Seeds auf Bakterien

Die Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers von Pflanzenmaterial auf Mikroorganismen wird als sehr gering eingestuft, ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen.

Ein solcher Transfer könnte z.B. im Tierpansen, im Magen-Darmtrakt von Säugern, in Silagen und im Boden stattfinden. Ein Ablauf von folgenden Schritten wäre dazu erforderlich:

- 1) Entlassung des *amp^r*-Gens zusammen mit dem *origin of replication* (*ori*) von pUC in intakter Form aus der Pflanzenzelle,
- 2) Aufnahme durch kompetente Bakterien,
- 3) Ringschluß des DNA-Fragmentes in der Bakterienzelle zu einem funktionstüchtigen plasmidartigen Replikon und
- 4) erfolgreiche Expression des übertragenen *amp^r*-Gens.

Bei Entlassung von DNA aus pflanzlichen Geweben wird diese durch pflanzeigene Nukleasen effektiv degradiert. Auch im Pansen und Verdauungstrakt von Säugern ist ein hoher Spiegel an DNAsen vorhanden, ebenso im Boden und anderen von Mikroorganismen besiedelten Habitaten.

Die Fähigkeit, DNA aufzunehmen, wurde erst bei relativ wenigen Bakterienarten beobachtet. Darüberhinaus ist die Entwicklung der DNA-Aufnahmefähigkeit unter den physiologischen Bedingungen, wie sie im Pansen oder Magendarmtrakt, wahrscheinlich auch in der Silage und im Boden vorliegen, ein sehr seltenes Ereignis.

Die Bildung eines Replikons in einer Zelle, z.B. durch Verknüpfung der Enden des DNA-Fragmentes, könnte erfolgreich nur durch sehr seltene Ereignisse, etwa ein illegitimes *cross over*, erfolgen. Auch ist der Wirtsbereich des Replikationsursprungs (hier: ColE1) auf nur wenige Arten von Enterobacteriaceae beschränkt.

Schließlich müssen die für eine Genexpression erforderlichen Regulationsabschnitte in geeigneter Anordnung vorliegen und von der Wirtszelle erkannt werden.

Das gemeinsame Eintreffen all dieser jeweils als sehr selten eingeschätzten Ereignisse macht einen häufigen Gentransfer des *amp^r*-Gens von Pflanzen auf Bakterien sehr unwahr-



scheinlich. Wenn dies dennoch eintreten würde, müßte man es vor dem Hintergrund des heutigen natürlichen Auftretens der Ampicillinresistenz in Bakterien sehen. Es ist anzunehmen, daß fast jeder Mensch, auch ohne β -Laktam-Antibiotika exponiert zu sein, im Intestinaltrakt *E. coli* beherbergt, die das *amp^r*-Gen besitzen. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, daß etwa 50 % aller klinischen *E. coli*-Isolate resistent gegen Ampicillin sind, davon wieder 90% durch TEM-1 β -Laktamasen bedingt (Livermore, 1995). Untersuchungen (BgVV, 1997) zeigten auch, daß Ampicillinresistenzen bei *E. coli*-Isolaten von Rindern und Schweinen etwa 74 % aller Proben kennzeichneten.

Ausgehend von der Tatsache der heute schon sehr weiten Verbreitung des *amp^r*-Gens in Enterobacteriaceae ist die Wahrscheinlichkeit, daß durch den Ciba-Mais eine Ausweitung der β -Laktam-Resistenz mit zusätzlichen Gefährdungspotentialen für Mensch oder Tier bedingt wird, als unbedeutend gering einzuschätzen.

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.

Literatur:

Bermudes, H. Jude, F., Arpin, C. Quentin, C. Morand, A. and R. Labia. 1997. Characterization of Inhibitor-Resistant TEM (IRT) β -Lactamases in a Novel Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 41:222.

BgVV, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin. 1997. Resistenzsituation 1995. *Deutsches Tierärzteblatt.* 1/1997:84

Bush, K. Jacoby, G. A., and A.A Medeiros. 1995. A Functional Classification Scheme for β -Lactamases and its Correlation with Molecular Structure. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 39:1211-1233.

Ciba Seeds. 1996. Ciba Seeds Response to Scientific Committees Requests.

Livermore D. M. 1995. β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 8:557-584



Bundesamt für
Verbraucherschutz und
Lebensmittelsicherheit

Sanders, C. and W.E. Sanders Jr. 1992. β -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacteria: Global Trends and Clinical Impact. Clin. Infect. Dis. 15:824-839.