

Fakten und Fantasien zum horizontalen Gentransfer von rekombinanter DNA

Wilfried Wackernagel

Horizontaler Gentransfer wird im Kontext der Gentechnik in der Öffentlichkeit als eine Ursache ständiger Gefahr diskutiert. Auf der Grundlage von Reagenzglasversuchen beinhaltet der Begriff, daß Gene und Gengruppen von Bakterien auf andere Bakterien übertragen werden können. Dadurch wäre eine unkontrollierbare Ausbreitung rekombinanter DNA möglich. Die neuere umfassende Erforschung der Gentransferprozesse (Konjugation, Transformation und Transduktion) in bakteriellen Lebensräumen, die nicht zuletzt im Rahmen der Sicherheitsbewertung gentechnisch veränderter Mikroorganismen und Pflanzen durchgeführt wurde, zeigt, daß Gentransfer wohl überall möglich ist, jedoch nur sehr selten stattfindet. Es wurden Transferaktivitäten zwischen Bakterien unterschiedlicher Arten und sogar von Bakterien zu Hefe- und Pilzzellen und auch zu Pflanzen- und Tierzellen gefunden. Gleichzeitig wurden jedoch limitierende Faktoren in der Umwelt und Barrieren für dauerhafte Integration der transferierten DNA in den Empfängerorganismen identifiziert. Übertragene Gene können sich nur dann etablieren, wenn ein entsprechender Selektionsdruck besteht, der den Genträgern Vorteile verleiht.

Insgesamt ist die Möglichkeit eines Transfers von Genen aus transgenen Pflanzen auf Bakterien als sehr unwahrscheinlich einzustufen. Sie ist damit unvergleichlich niedriger als die schon geringe Möglichkeit des natürlichen Gentransfers zwischen Bakterien. Obwohl also ein Transfer von Pflanzen auf Bakterien, z. B. im Boden oder Darm, nicht zu erwarten ist, haben die verantwortlichen Behörden in Amerika und Europa bei der Zulassung von Freisetzungen und beim Inverkehrbringen von transgenen Pflanzen noch zusätzlich darauf geachtet, daß in den Pflanzen keine Gene vorliegen, die potentiell gefährlich sind für Menschen, andere Lebewesen oder die Umwelt.

Gentransfer bei Bakterien

Schon in den Fünfziger Jahren wurden in Laborversuchen drei prinzipiell unterschiedliche Mechanismen entdeckt, durch die bestimmte Bakterien DNA auf andere Zellen übertragen können. Zum einen gibt es den DNA-Transfer bei Zellkontakt, währenddessen die Kopie eines Plasmids (autonom replizierendes DNA-Molekül) von der Spender- in die Empfängerzelle gelangt (*Konjugation*). So können Plasmide in Bakterien der gleichen Art oder in taxonomisch weiter entfernte Arten gelangen. Durch Konjugation können auch bestimmte Transposons und gelegentlich chromosomale Gene weitergegeben werden (Clewell, 1993). Vor allem die Resistenzgene gegen Antibiotika haben sich so seit der intensiven Anwendung von Antibiotika in der Human- und Tiermedizin sowie in der Landwirtschaft verbreitet (Selektionsdruck), da sie meist auf mobilen genetischen Elementen wie eben Plasmiden oder Transposons lokalisiert sind.

Ein anderer Mechanismus des DNA-Transfers beruht auf der nur bei Bakterien vorkommenden Fähigkeit, daß die Zellen in einer bestimmten Wachstumsphase (Kompetenz-Phase) freie DNA-

Moleküle aus ihrer Umgebung aktiv aufnehmen können. Solche DNA kann als Nahrung verwendet oder auch als genetisches Material in das eigene Genom integriert werden, wenn z. B. Homologie der Nukleotidsequenzen die erforderliche Rekombination ermöglicht (*Transformation*). Dieser Gentransfer wurde bislang erst bei ca. 2% der untersuchten Bakterienarten entdeckt (Lorenz und Wackernagel, 1994; Tønnum et al., 1995). Die bisher bekannten transformierbaren Arten stammen jedoch aus allen taxonomisch wichtigen Gruppen und sind in vielen Bereichen der Umwelt anzutreffen. Wenn DNA aus Bakterien z. B. in der Absterbephase entlassen wird, kann sie nach extrazellulärer Überdauerung mit ihrer genetischen Information sogar postmortal zur Vererbung beitragen. Bei Konjugation und Transformation sind an der Übertragung und Aufnahme von DNA zahlreiche Gene der Bakterien bzw. Plasmide beteiligt.

Schließlich ist DNA auch durch Bakterienviren (*Bakteriophagen*) übertragbar, wenn im letzten Vermehrungswirt des Virus irrtümlich bakterielle DNA statt Virus-DNA in das Viruspartikel verpackt wurde. Diese DNA wird dann bei einer Infektion in eine andere Zelle überführt (*Trans-*

duktion; Masters, 1996). Unter optimierten Bedingungen im Reagenzglas können Transferprozesse manchmal kaum detektierbar selten sein (ca. 10^{-9} pro Zelle), aber sich auch auf einige Prozent einer Bakterienpopulation erstrecken. Es ist also denkbar, daß rekombinante DNA-Konstrukte aus gentechnisch veränderten Organismen über solche Transfermechanismen in andere Organismen gelangen können.

Genfluß in bakteriellen Lebensräumen

Erhebliche Anstrengungen im Rahmen der sog. Sicherheitsforschung widmeten sich folglich der Frage, ob horizontaler Gentransfer tatsächlich in nennenswertem Umfang im natürlichen Lebensraum von Bakterien vorkommt. Untersucht wurden eine Vielzahl von Bakterien und sehr unterschiedliche Habitate, u.a. Böden, verschiedene Gewässer und Sedimente, der Wurzelbereich und die Blattspreiten von Pflanzen und auch der Verdauungstrakt von Tieren. Dazu wurden Experimente in Mikrokosmen (im Labor nachgestellte kleine Einheiten aus der Umwelt, z. B. Bodenproben), im Freiland oder mit lebenden Organismen einschließlich Säugern durchgeführt, die Konjugation, Transformation und Transduktion umfaßten (Davison, 1999). Die gentechnischen Modifikationen der Organismen erwiesen sich dabei oft als besonders hilfreiche, spezifische Genmarken, die ein hochempfindliches Verfolgen bei der Weitergabe ermöglichten. Die Ergebnisse zeigten, daß praktisch in keinem Bereich unüberwindliche Barrieren für horizontalen Gentransfer zwischen Bakterien bestehen. Dies war für die einen überraschend, ja alarmierend, für die anderen eher unspektakulär, geradezu erwartet. Wer hätte ernsthaft damit gerechnet, daß die Natur so ingeniose Mechanismen der Übertragung von Erbinformation von einem Bakterium auf ein anderes nur für den Reagenzglasversuch vorbehalten hätte? Die ermittelten Transferhäufigkeiten erreichten manchmal die im Reagenzglas gefundenen Häufigkeiten, blieben jedoch meist deutlich darunter. Für die dauerhafte Etablierung von neu erworbenen Genen in Organismen und Populationen ist es notwendig, daß sich ein Vorteil für die Träger der erworbenen Gene ergibt, d. h. bei Fehlen eines entsprechenden Selektionsdruckes wird der Zugewinn neuer Information lediglich kurzfristig bestehen bleiben.

Transfer von Bakterien auf Höhere Organismen

Durch den Konjugationsvorgang können Bakterien natürlicherweise DNA gelegentlich auch auf Zellen Höherer Organismen übertragen. Molekular sehr gut erforscht ist dieser Vorgang bei dem Transfer von Ti-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* auf Pflanzen während der Induktion von

Pflanzentumoren. Die transferierte DNA gelangt in den Zellkern der Pflanzenzelle, wird dort stabil in ein Chromosom integriert, und die genetische Information wird exprimiert. Diese veranlaßt die Zelle zu verstärkter Teilungsaktivität (Tumorbildung) und zur Synthese und Abgabe von Substanzen, von denen sich die Agrobakterien ernähren und damit im Pflanzentumor vermehren können. In der Gentechnologie wird dieser Vorgang vielfach zur Erzeugung transgener Pflanzen eingesetzt, wobei die transferierte DNA statt der tumorinduzierenden Information das spezielle Transgen enthält (z. B. das Gen, das die gewünschte Virusresistenz erzeugt). Aus der genetisch veränderten Einzelzelle wird dann eine Pflanze regeneriert. In gezielten Untersuchungen im Labor stellte sich heraus, daß durch die plasmidgesteuerte Konjugation auch DNA in die Zellen von Hefe, von filamentösen Pilzen und sogar in kultivierte Humanzellen überführt werden kann. In jüngerer Zeit hat die Analyse von Pflanzen-DNA mehrfach Indizien geliefert, nach denen sich typische Gene von Bakterien im Pflanzengenom befinden.

Gentransfer von Pflanzen auf Bakterien?

Da eine Reihe von Bakterien zur Transformation befähigt ist, stellte sich die Frage, ob diese Bakterien auch Pflanzen-DNA, insbesondere rekombinante DNA-Abschnitte aus transgenen Pflanzen, aufnehmen und in ihr Genom integrieren können. Dadurch wäre eine Ausbreitung der rekombinanten DNA dort denkbar, wo aus Pflanzenzellen DNA freigelassen wird und mit Bakterien zusammentreffen könnte, z. B. im Wurzelraum von Pflanzen (Bodenbakterien) oder im Verdauungstrakt von Mensch und Tier (Darmbakterien). Zahlreiche Untersuchungen mit verschiedenen Bakterien haben gezeigt, daß dies nicht der Fall ist (de Vries und Wackernagel, 1998; Gebhard und Smalla, 1998; Davison, 1999). Eine solche DNA-Übertragung gelang nur, wenn eine Kopie des transferierten Gens aus der Pflanze schon vorher in den Bakterien vorlag, so daß durch homologe Rekombination das Gen aus der Pflanze integriert werden konnte. Die Barriere, die demnach durch das Fehlen einer Rekombinationsmöglichkeit besteht, verhindert Integration von fremder DNA, indem sie die Integrationschance mehr als milliardenfach reduziert. Obendrein herrschen weder im Boden noch im Darm die Bedingungen des Reagenzglasversuches, die dort vom Experimentator für das Erreichen von maximaler Kompetenz und DNA-Aufnahme der Bakterien eingestellt worden waren.

Die Problematik der Resistenzgene

Eine Reihe der in USA und Europa zugelassenen transgenen Pflanzen für die menschliche Ernäh-

rung oder für die Verwendung als Tierfutter enthält Gene, die für eine bestimmte Antibiotikumresistenz codieren. Diese ursprünglich als Konstruktionshilfe dienenden Resistenzgene verblieben meist in den transgenen Pflanzen, waren jedoch für deren spezielle Eigenschaften (z. B. Schädlingsresistenz) nicht erforderlich. Ob solche Resistenzgene horizontal in andere Bakterien gelangen können, z. B. im menschlichen Verdauungstrakt, und von diesen vielleicht in Krankheitserreger, die daraufhin mit dem Antibiotikum nicht mehr behandelbar wären, war für die Wissenschaftler von Anbeginn eine wichtige Frage, wurde aber in jüngster Zeit von bestimmten Kreisen außerhalb der Wissenschaft verstärkt in den Vordergrund gerückt. Vor der Zulassung von Pflanzen mit einem solchen Resistenzgen war z.B. durch Berechnung der Wahrscheinlichkeit eines horizontalen Gentransfers, basierend auf experimentellen Ergebnissen, ermittelt worden, daß ein Transfer von Resistenzgenen aus der Pflanzen-DNA in Bakterien des Darms, wenn überhaupt, dann nur mit so extrem niedriger Häufigkeit erfolgen würde, daß dies außer acht gelassen werden kann. Die Ergebnisse gezielter experimenteller Untersuchungen (s. o.) weisen in die gleiche Richtung.

Das Beispiel Ampicillinresistenz

In einigen zugelassenen Pflanzen liegt das Resistenzgen *nptII* (Resistenz gegen Kanamycin) und in einem Fall (eine bestimmte insektenresistente Maissorte) das *bla*-TEM-1-Gen (Resistenz gegen Ampicillin) vor. Während Kanamycin in der Humanmedizin schon lange praktisch nicht mehr verwendet wird, werden Ampicillin und andere Penicillin-Derivate bei einigen Infektionskrankheiten erfolgreich eingesetzt. Vor einiger Zeit titelte ein englisches Boulevardblatt sinngemäß, daß mit dem Verzehr von Produkten aus transgenen Pflanzen die Möglichkeit verbunden sei, daß Kinder an Hirnhautentzündung erkrankten...! Was steckt hinter dieser fantasievollen Behauptung? Hirnhautentzündung kann u. a. durch das Bakterium *Neisseria meningitidis* hervorgerufen werden; infektiöse Hirnhautentzündung kann mit Ampicillin-Derivaten erfolgreich therapiert werden; bei Verzehr von Produkten aus der o. g. Maissorte könnte nach Ansicht der Artikelschreiber das *bla*-TEM-1-Gen in Darmbakterien übergehen und von diesen dann weitergegeben werden an die Erreger der Hirnhautentzündung; diese wären folglich nicht mehr mit dem normalerweise wirksamen Medikament therapierbar. Diesem Szenario widersprechen folgende Fakten. Heute besitzen durchschnittlich ca. 27% der *Escherichia coli*-Bakterien im Darm von gesunden Menschen bereits das *bla*-TEM-1-Gen, bei Personen nach einer Behandlung mit Antibiotika sind es sogar über 35% (Kresken et al., 1999).

Ampicillinresistente *E. coli* Isolate treten bei Rindern und Schweinen in ca. 74% aller Proben auf. Die Möglichkeit ist also unvergleichlich höher, daß bakterielle Krankheitserreger Resistenzgene im direkten Transfer von Darmbakterien erhalten, als die Chance, diese Gene aus der DNA von transgenen Pflanzen (auch mit dem Umweg über Darmbakterien) zu übernehmen. Insofern hat das geschilderte Szenario keine wissenschaftliche Grundlage und argumentiert fehlerhaft an den Tatsachen vorbei.

Insgesamt werden zukünftig gentechnische Nutzpflanzen, die zum Inverkehrbringen angemeldet werden, frei sein von Antibiotikaresistenzgenen und anderen unnötigen DNA-Abschnitten, da die weiterentwickelte Methodologie der Pflanzenbiotechnologie es inzwischen erlaubt, die eingeführte DNA auf die für den gewünschten Zweck erforderlichen Gene zu beschränken.

Der Weg von DNA in Körperzellen

Vor einiger Zeit war in einer Boulevardzeitung mit Bild die Überschrift zu lesen: „Lebensmittel – Gene bald überall?“. Gemeint war, daß in vielen Bereichen bei der Erzeugung von Nahrungsmitteln aus Pflanzen und Mikroorganismen verstärkt die Vorteile der Gentechnik genutzt würden. Anders als der Titel suggeriert, enthalten nämlich fast alle unsere Nahrungsmittel, die ja meist aus Lebewesen hergestellt werden (z. B. Pflanzen, Tiere), intakte DNA (und damit Gene) oder deren Abbauprodukte. Im Rahmen von Sicherheitsforschung hat man bei Säugern (Maus) mit Hilfe von gentechnisch markierter DNA und modernsten Analysemethoden den Weg der DNA im Körper nach dem Verzehr verfolgt (Schubbert et al., 1997). Der weitaus größte Teil der DNA wurde, wie erwartet, im Magen-Darm-Trakt abgebaut. Ein kleiner Teil gelangte jedoch in die Blutbahn und von dort sogar in Gewebezellen. Es gelang schließlich, DNA aus der Nahrung direkt in einigen Kernen von Gewebezellen nachzuweisen. Dies war überraschend und gab zu schlimmen Mutmaßungen Anlaß. In einem anderen Forschungsprojekt wurde nach dem Verfüttern von gentechnischem Pflanzenmaterial (Bt-Mais) beobachtet, daß „normale“ Pflanzengene gelegentlich in Blutzellen (Lymphozyten) von Rindern und in Geweben von Hühnern auftraten (Einspanier et al., 2001). Gentechnische DNA konnte übrigens in keinem Fall gefunden werden, vermutlich, weil die Nachweisempfindlichkeit für „häufige“ Pflanzengene, z. B. Gene aus den Chloroplasten, ausreichte, nicht aber für die ca. 1000-fach selteneren rekombinanten Abschnitte aus den Pflanzenchromosomen. Was müssen wir aus den Befunden schließen? Daß DNA aus der Nahrung in begrenztem Umfang natürlicherweise in die Körperzellen von Tieren,

wahrscheinlich auch des Menschen, gelangt. Tiere und Menschen sind dieser Situation aufgrund ihrer Ernährungsweise von Natur aus ausgesetzt, ohne bisher Schaden zu erleiden. Von der DNA in Nahrungsmitteln stellen die rekombinanten Gene nur einen verschwindend kleinen Teil dar und verhalten sich in allen Aspekten identisch ungefährlich wie die übrige DNA (Jonas et al., 2001).

Schlußfolgerungen

Unter Bakterien in ihren natürlichen Habitaten ist horizontaler Gentransfer über die verschiedenen Mechanismen weit verbreitet und stellt einen oft charakteristischen Teil der Lebensweise dieser Organismen dar. Bei der Wanderung von Genen spielen Plasmide eine besondere Rolle. Während in speziellen Situationen Bakterien natürlicherweise Gene auch auf Zellen Höherer Organismen übertragen können, ist der umgekehrte Weg der Gene bislang nicht beobachtet worden. Gene, die integriert im Genom Höherer Pflanzen vorliegen und dort z. B. Herbizidtoleranz hervorrufen, sind in besonderer Weise vom horizontalen Gentransfer ausgeschlossen. Die Chance für ein solches Gen, intakt aus einer abgestorbenen Zelle entlassen zu werden, extrazellulär im bakteriellen Lebensraum zu überdauern, dort mit einer DNA-aufnahmefähigen Bakterienzelle zusammenzutreffen und schließlich in die Zelle zu gelangen, ist extrem niedrig. Zusätzlich ist es praktisch unmöglich, daß eines der vielleicht doch in eine Bakterienzelle gelangten Pflanzengene zu einem Bestandteil des Bakteriengenoms wird, weil homologe Rekombination (wegen des Fehlens homologer Sequenzen) oder Etablierung als Plasmid (wegen des Fehlens von Ringschlußmöglichkeit und Replikationsstartpunkt) nicht möglich sind. Solche aufgenommene Fremd-DNA wird deshalb in den Bakterien degradiert. Obendrein muß festgehalten werden, daß die für die gentechnische Veränderung von Pflanzen eingesetzten Gene meist aus anderen Organismen (Bakterien, Viren oder Pflanzen) entnommen wurden. Ein direkter Weg der Gene ohne den „Umweg“ über die transgene Pflanze war deshalb theoretisch schon immer möglich, ist aber offenbar nicht eingetreten.

Aus dem Gesamtbild der wissenschaftlichen Fakten und den zugrundeliegenden natürlichen Prozessen resultiert, daß aus horizontalen Gen-

transferprozessen mit Bezug auf den Anbau und den Verzehr von zugelassenen transgenen Pflanzen grundsätzlich kein Gefährdungspotential für den Menschen oder andere Organismen in der Umwelt abzuleiten ist, das die Nutzung der Grünen Gentechnik in Frage stellen könnte.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Wilfried Wackernagel
Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg
Genetik, Fachbereich Biologie,
Geo- und Umweltwissenschaften
Postfach 2503
26111 Oldenburg

Literatur

- Clewell, D. B. (ed.) Bacterial Conjugation. Plenum Press New York, USA, 1993.
- Davison, J. (1999) Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 42, 73-91.
- de Vries, J. and Wackernagel, W. (1998) Detection of *nptIII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker rescue transformation. *Mol. Gen. Genet.* 257, 606-613.
- Einspanier, R., Klotz, A., Kraft, J., Aulrich, K., Poser, R., Schwägele, F., Jahreis, G. and Flachowsky, G. (2001) The fate of forage plant DNA in farm animals: a collaborative case study investigating cattle and chicken fed recombinant plant material. *Eur. Food Res. Technol.* 212, 129-134.
- Gebhard, F. and Smalla, K. (1998) Transformation of *Acinetobacter* sp. strain BD413 by transgenic sugar beet DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1550-1554.
- Jonas, D. A., Elmadfa, I., Engel, K.-H., Heller, K. J., Kozianowski, G., König, A., Müller, D., Narbonne, J.-F., Wackernagel, W. and Kleiner, J. (2001) Safety considerations of DNA in food. *Ann. Nutr. Metab.* 45, 1-20.
- Kresken, M., Hafner, D. und von Rosenstiel, N. (1999) Zeitliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz bei klinisch wichtigen Bakterien-spezies in Mitteleuropa. *Bundesgesundheitsblatt, Jahrgang 42, Heft 1*, pp. 17-25.
- Lorenz, M. G. and Wackernagel, W. (1994) Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev.* 58, 563-602.
- Masters, M. (1996) Generalized Transduction. *In: Escherichia coli and Salmonella.* (F. C. Neidhardt, ed.), ASM Press, Washington DC, pp. 2421-2441.
- Schubbert, R., Renz, D., Schmitz, B. and Doerfler, W. (1997) Foreign (M13) DNA ingested by mice reaches peripheral leukocytes, spleen, and liver via the intestinal wall mucosa and can be covalently linked to mouse DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 961-966.
- Tønjum, T., Bøvre, K. and Juni, E. (1995) Fastidious gram-negative bacteria: meeting the diagnostic challenge with nucleic acid analysis. *APMIS* 103, 609-627.