



Stellungnahme der ZKBS zu zwei Stämmen von *Lactococcus lactis*, MC010 und LR2

Anlass

Das Robert Koch-Institut ist um Stellungnahme gebeten worden, ob es sich bei zwei *L. lactis* subsp. *lactis* Stämmen, deren Eigenschaften für die Milchfermentation optimiert wurden, um gentechnisch veränderte Organismen (GVO) handelt. Zur Selektion der Stämme wurden rekombinante Plasmide eingesetzt, die in den resultierenden Stämmen nicht mehr vorhanden sind. Die *L. lactis* Mutantenstämme sollen für die Erzeugung verschiedener Milchprodukte benutzt werden.

Beschreibung der Stämme

- A) Herstellung des *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Stammes MC010, der die Bildung von Diacetyl verbessern soll.

Diacetyl ist eine wichtige Geschmackskomponente in frischen Milchprodukten und wird von *L. lactis* subsp. *lactis* während der Fermentation von Milch gebildet. Die Bildung von Diacetyl ist abhängig von externen Faktoren wie Temperatur, pH und Sauerstoff, aber auch vom eingesetzten Bakterienstamm. In *L. lactis* wird Diacetyl durch nicht-enzymatische oxidative Decarboxylierung des Acetolactats (ALA) erzeugt, das aus Pyruvat entsteht. ALA wird durch das Enzym ALA-Decarboxylase (*aldB*) überwiegend zu Acetoin abgebaut. ALA ist auch die Vorstufe für die Biosynthese der Aminosäuren Leucin und Valin, während für die Biosynthese von Isoleucin die gleichen Enzyme wie für die Biosynthese von Valin genutzt werden. Das ALA degradierende Enzym (*aldB*) wird durch Leucin allosterisch aktiviert, wodurch ALA verstärkt in Acetoin umgesetzt wird und sich der ALA-Pool so verringert, dass er für die Bildung von Diacetyl und die Biosynthese von Leucin und Valin nicht mehr zur Verfügung steht. *AldB* reguliert über den ALA-Pool somit sowohl die Biosynthese von Leucin und Valin als auch den Pyruvat-Katabolismus.

AldB liegt auf derselben Transkriptionseinheit wie die Gene für die Leucin- und Isoleucin / Valin-Synthese, kann aber, wenn Leucin, Isoleucin und Valin dem Medium zugesetzt werden, vom eigenen Promotor konstitutiv exprimiert werden. Prototrophe *L. lactis* Stämme können auf Leucin-haltigem Medium nicht wachsen, wenn nicht gleichzeitig Valin zugesetzt wird. *AldB* Mutanten können deshalb durch Wachstum in Gegenwart von Leucin isoliert werden. Da die meisten Laktokokkenstämme, die in der Milchfermentation genutzt werden, u.a. auxotroph für die Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin sind, wäre diese Selektionsmethode nicht effektiv.

- Deshalb wurde der Isoleucin/Valin auxotrophe (*ilv*) *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* Stamm DB0410 mit dem Plasmid pMC004 (Derivat des in Gram-positiven Bakterien replizierenden Plasmids pAMß1, das das Ery^R Gen und die Gene für den *ilv*-Syntheseweg, Größe 12.3 kb) transformiert. Das DNA-Fragment, das für die Gene des *ilv*-Syntheseweges kodiert, beginnt im orf2 des *leu*-Operons und endet hinter dem vom



ilvA-Gen downstream liegenden p3 Promotor. Die Sequenz des *aldB*-Gens ist nicht vorhanden.

- Der resultierende Stamm DB0410/pMC004 verhält sich wie ein prototropher (*ilv*⁺) Stamm und wächst auf Medium mit Leucin und Valin, nicht auf Medium mit Leucin allein.
- Leucin-resistente Mutanten wurden auf Medium mit Leucin selektioniert und anschließend auf Abwesenheit des Enzyms ALA-Decarboxylase (*aldB*) getestet (Western-Blot).
- *plasmid curing* der Mutante erfolgte durch Wachstum auf Leucin- und Valin-haltigem Medium. Der resultierende Stamm MC010 ist Isoleucin auxotroph, Ery^S und frei von pMC004 (PCR, Hybridisierung) und enthält in *aldB* eine Punktmutation.

B) Herstellung des Phagen-resistenten *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Stammes LR2

Bei der Milchfermentation kann die Lyse der *L. lactis* Produktionsstämme durch Bakteriophagen zum Problem werden. Daher wurden einem *L. lactis* Stamm mit Hilfe der Konjugation mit ca. 30 *L. lactis* Donorstämmen Resistenzen gegenüber Bakteriophagen übertragen. Um bei der anschließenden Selektion den Rezipienten von den vielen Donorstämmen zu unterscheiden, wurde der Rezipient mit einem Plasmid markiert, das eine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Erythromycin trug.

- Zur Erleichterung der Selektion wurde das Plasmid pGHost9::ISS1 (*shuttle*-Vektor für *E. coli* und Gram-positive Bakterien mit temperatursensitivem Replikationsursprung, Ery^R-Gen und IS-Element aus Laktokokken) auf den Produktionsstamm *L. lactis* subsp. *lactis* FHCY1 übertragen.
- Anschließend wurde FHCY1 (pGHost9::ISS) mit einer Mischung aus ca. 30 *L. lactis food grade*-Produktionsstämmen als Donorstämmen zu Konjugationszwecken kokultiviert.
- Die Selektion der Transkonjuganten erfolgte auf Erythromycin-haltigem Medium.
- Ery^R-Transkonjuganten wurden auf Bakteriophagenresistenz mit Phagen getestet, für die der Ausgangsstamm FHCY1 sensitiv ist.
- Nach Auswahl geeigneter Phagen-resistenter Transkonjuganten wurde das Plasmid durch Plasmid Curing bei 37 °C entfernt. Der resultierende Stamm LR2 ist resistent gegenüber etwa 20 Laktokokken-Phagen. Er ist Ery^S und frei von Plasmidsequenzen (Hybridisierung).

Anzumerken ist, dass sowohl der Ausgangsstamm FHCY1 als auch der Phagen-resistente Stamm LR2 die gleiche Anzahl ISS1- oder ISS1-ähnlicher Elemente trägt, und in geringem Maße chromosomale Rearrangements stattgefunden haben.

Stellungnahme

Für die Erzeugung der beiden o.g. *L. lactis* Mutantenstämme wurden klassische genetische Methoden angewandt. Zur Erleichterung der Selektion wurden zusätzlich rekombinante Plasmide, die eine Antibiotikaresistenz enthielten, in die Ausgangsstämme eingeführt. Die Plasmide wurden nach Erhalt des gesuchten Phänotyps aus den Stämmen entfernt. Durch entsprechende Testmethoden konnte nachgewiesen werden, dass sie keine Plasmid-DNA enthalten.



Zu A) Stamm MC010

Der Ausgangsstamm *L. lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* DB0410 wächst nicht auf Medien, die das Antibiotikum Erythromycin enthalten. Der Stamm MC010 wurde als Leu^R Variante des Ausgangsstammes DB0410 selektiert. Die Leu^R Variante kann bereits Bestandteil der Population des Ausgangsstammes gewesen oder als spontane Mutation während des Selektionsprozesses entstanden sein.

Das Plasmid pMC004 diente als Hilfsmittel für die Selektionsstrategie. Es ist nicht Ursache für die Mutation zum Leu^R-Phänotyp und auch nicht am Mutationsvorgang beteiligt. Das Plasmid wurde aus der selektierten Leu^R-Mutante entfernt. Es wurde der Nachweis geführt, dass in dem resultierenden Stamm MC010 keine pMC004-Plasmid-DNA etabliert wurde.

Der Leu^R-Phänotyp wurde nicht durch gentechnische Verfahren hervorgerufen und es sind keine mit gentechnischen Verfahren eingeführte Nukleotidsequenzen in dem Stamm MC010 vorhanden. Der Stamm wurde somit nicht durch Verfahren der Veränderung genetischen Materials erzielt, er ist insbesondere nicht das Ergebnis von

- DNA-Rekombinationstechniken,
- Verfahren, bei denen in einen Organismus direkt Erbgut eingeführt wird, welches außerhalb des Organismus zubereitet wurde,
- Zellfusionen oder Hybridisierungsverfahren, bei denen lebende Zellen mit einer neuen Kombination von genetischem Material anhand von Methoden gebildet werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht auftreten.

Das genetische Material wurde in einer Weise verändert, wie sie unter natürlichen Bedingungen vorkommt. Es liegt eine spontane Mutation vor. Selbst eine induzierte Mutation (Verfahren der Mutagenese) gilt nicht als Verfahren der Veränderung genetischen Materials im Sinne des GenTG. Bei dem Stamm MC010 handelt es sich somit nicht um einen gentechnisch veränderten Organismus und die Verwendung des Stammes ist keine gentechnische Arbeit.

Zu B) Stamm LR2

Der Ausgangsstamm *L. lactis* subsp. *lactis* FHCY1 wächst nicht auf Medien, die das Antibiotikum Erythromycin enthalten.



Der Stamm LR2 wurde als 20-fach Phagen-resistente Variante des Ausgangsstammes FHCY1 selektioniert. Die Phagenresistenz wurde durch Konjugation mit ca. 30 *L. lactis* Produktionsstämmen als Donorstämmen erhalten.

Das Plasmid pGHost9::ISS1 diene als Hilfsmittel für die Selektionsstrategie. Es ist nicht Ursache für die Erzeugung des Phagen-resistenten Phänotyps und auch nicht am Konjugationsvorgang beteiligt. Das Plasmid wurde aus der selektionierten Phagen-resistenten Mutante entfernt. Es wurde der Nachweis geführt, dass in dem resultierenden Stamm LR2 keine pGHost9 Plasmid-DNA etabliert wurde.

Der Phagen-resistente Phänotyp wurde nicht durch gentechnische Verfahren hervorgerufen und es sind keine mit gentechnischen Verfahren eingeführte Nukleotidsequenzen in dem Stamm LR2 vorhanden. Der Stamm wurde somit nicht durch Verfahren der Veränderung genetischen Materials erzielt, er ist insbesondere nicht das Ergebnis von

- DNA-Rekombinationstechniken,
- Verfahren, bei denen in einen Organismus direkt Erbgut eingeführt wird, welches außerhalb des Organismus zubereitet wurde,
- Zellfusionen oder Hybridisierungsverfahren, bei denen lebende Zellen mit einer neuen Kombination von genetischem Material anhand von Methoden gebildet werden, die unter natürlichen Bedingungen nicht auftreten.

Das genetische Material wurde durch Konjugation verändert, d.h. in einer Weise, wie sie unter natürlichen Bedingungen vorkommt. Dieses Verfahren gilt nicht als Veränderung genetischen Materials nach § 3 Nr. 3 Satz 3 GenTG. Bei dem Stamm LR2 handelt es sich somit nicht um einen gentechnisch veränderten Organismus und die Verwendung des Stammes ist keine gentechnische Arbeit.