

**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von
Mycoplasma mycoides subsp. *capri*, *Mycoplasma capricolum* subsp.
capricolum und *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0
als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten
nach § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Mycoplasma mycoides subsp. *capri* und *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* sind Gram-positive Bakterien aus der Klasse der *Mollicutes* und gehören zur *Mycoplasma mycoides*-Gruppe. Diese Gruppe vereinigt einige eng verwandte Arten, die alle pathogen für Wiederkäuer sind. Kürzlich wurde die Art *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Large Colony ebenfalls der Art *M. mycoides* subsp. *capri* zugeordnet [1].

M. mycoides subsp. *capri* und *M. capricolum* subsp. *capricolum* gelten als Erreger der Infektiösen Agalaktie der Ziegen, die sich in Euterentzündungen, Arthritiden, Bindehautentzündungen, Lungenentzündungen, Aborten und vor allem bei Zicklein in Blutvergiftungen äußern kann. Die Infektiöse Agalaktie ist vor allem im Mittelmeerraum, in Asien und in Afrika verbreitet [2]. Sie wird über kontaminierte Milch, Futter, Wasser oder über Aerosole übertragen. Die Mortalität beträgt 20 % oder weniger, kann aber bis zu 70 % betragen, wenn es zu Blutvergiftungen kommt [3]. Die BG Chemie stuft beide Arten in die Risikogruppe 2 als für Tiere pathogene Erreger ein.

Bei *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 handelt es sich um einen Stamm, der durch die Übertragung eines *in vitro* synthetisierten Genoms von *M. mycoides* subsp. *capri* auf *M. capricolum* subsp. *capricolum* und die anschließende Selektion auf Markergene hergestellt wurde. Sequenzvergleiche ergaben, dass sich das Genom von *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0, neben den für die Vermehrung des Genoms in Hefe nötigen genetischen Elementen und Tetrazyklin- und β -Galaktosidasegenen für die Selektion der Transplantanten, durch einzelne bei der Synthese aufgetretene Polymorphismen in nicht-essentiellen Genen, eine Insertion des IS1-Transposons, eine Duplikation einer Nukleinsäuresequenz von 85 bp und vier sogenannte Wasserzeichen (ca. 1100 bp große Nukleinsäurefragmente) unterscheidet. Diese waren in das künstlich hergestellte Genom eingefügt worden, um *M. mycoides* subsp. *capri* und *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 anhand ihrer DNA-Sequenz unterscheiden zu können. Die Translation dieser Sequenzen in Peptide ist begrenzt [4]. Die Sequenzen enthalten verschlüsselt eine Internetadresse, je ein Zitat von James Joyce, Richard Feynman und J. Robert Oppenheimer und die Namen der 46 beteiligten Wissenschaftler [5].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* und *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* und *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn1.0 als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Bei *M. mycoides* subsp. *capri* und *M. capricolum* subsp. *capricolum* handelt es sich um umfassend charakterisierte Erreger, die eine Erkrankung bei Ziegen auslösen können. Das Wirtsspektrum ist auf Ziegen beschränkt.

Der Stamm *M. mycoides* JCVI-syn1.0 wurde durch die Übertragung eines nach dem Vorbild von *M. mycoides* subsp. *capri* synthetisierten Genoms auf *M. capricolum* subsp. *capricolum*-Zellen hergestellt. Mit jeder Zellteilung werden die Proteine und Zellbestandteile von *M. capricolum* subsp. *capricolum* 1:2 „verdünnt“ und unterliegen zusätzlich *turnover*-Prozessen. Legt man 30 Zellzyklen bis zur Bildung einer Kolonie zugrunde [6], sind die Komponenten der ursprünglichen Zelle mindestens 2^{30} fach (ca. 10^9 fach) verdünnt. Es ist also davon auszugehen, dass *M. mycoides* JCVI-syn1.0 in seiner Pathogenität und Physiologie nur minimal von *M. mycoides* subsp. *capri* abweicht. In der Tat zeigten Proteom-Untersuchungen, Elektronenmikroskopie und Wachstumstests, dass sich *M. mycoides* JCVI-syn1.0 in diesen Parametern kaum von *M. mycoides* subsp. *capri* unterscheidet [4]. Daher ist dieser Stamm ebenfalls in die **Risikogruppe 2** einzustufen.

Das Genom von *M. mycoides* JCVI-syn1.0 wurde schrittweise, ausgehend von *in vitro* synthetisierten Oligonukleotiden, hergestellt. Diese wurden zu Kassetten zusammengesetzt, die Überlappungen zu benachbarten Kassetten tragen. Je zehn dieser ca. 1 kb großen Kassetten wurden mithilfe eines Hefe-Rekombinationssystems in einen Vektor rekombiniert und auf *Escherichia coli* übertragen, um größere Mengen DNA zu erhalten. Die Plasmide, die die ca. 10 kb großen Fragmente enthielten, wurden restringiert und je zehn der 10 kb-Fragmente wurden wie beschrieben in Hefe zu 100 kb-Fragmenten rekombiniert. Im letzten Schritt wurden elf der 100 kb-Fragmente zum vollständigen Genom mit einer Größe von 1.077.947 bp zusammengesetzt [4].

Nach § 3 GenTG gelten Organismen als gentechnisch verändert, wenn ihr genetisches Material in einer Weise verändert worden ist, wie sie unter natürlichen Bedingungen durch Kreuzen oder natürliche Rekombination nicht vorkommt. Verfahren der Veränderung genetischen Materials sind „insbesondere Nukleinsäure-Rekombinationstechniken, bei denen durch die Einbringung von Nukleinsäuremolekülen, die außerhalb eines Organismus erzeugt wurden, in Viren, Viroide, bakterielle Plasmide oder andere Vektorsysteme neue Kombinationen von genetischem Material gebildet werden und diese in einen Wirtsorganismus eingebracht werden, in dem sie unter natürlichen Bedingungen nicht vorkommen“ (§ 3a GenTG). Da das Genom von *M. mycoides* JCVI-syn1.0 auf eine Weise synthetisiert wurde, die unter die o. g. Definition des GenTG fällt, ist *M. mycoides* JCVI-syn1.0 als **gentechnisch veränderter Organismus** zu betrachten.

Literatur

- [1] Manso-Silvan L, Vilei EM, Sachse K, Djordjevic SP, Thiaucourt F, Frey J (2009). *Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. Int J Syst Evol Microbiol. 59: 1353-8
- [2] Madanat A, Zendulková D, Pospíšil Z (2001). Contagious agalactia of sheep and goats. A review. Acta Vet Brno. 70: 403-12
- [3] http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/contagious_agalactia.pdf
- [4] Gibson DG, Glass JI, Lartigue C, Noskov VN, Chuang RY, Algire MA, Benders GA, Montague MG, Ma L, Moodie MM, Merryman C, Vashee S, Krishnakumar R, Assad-Garcia N, Andrews-Pfannkoch C, Denisova EA, Young L, Qi ZQ, Segall-Shapiro TH, Calvey CH, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter JC (2010). Creation of a Bacterial Cell Controlled by a Chemically Synthesized Genome. Science. 329 (5987): 52-6
- [5] http://www.openculture.com/2010/05/james_joyce_encoded_in_artificial_life.html
- [6] Lartigue C, Glass JI, Alperovich N, Pieper R, Parmar PP, Hutchison CA 3rd, Smith HO, Venter, JC (2007). Genome transplantation in bacteria: Changing one species to another. Science. 317 (5838): 632-8