

## **Stellungnahme der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) zu einem sog. Ames-Stamm**

Der Stamm *Salmonella* Typhimurium TA1535/pSK1002 wird in dem „Verfahren zur Bestimmung des erbgutverändernden Potentials von Wasser mit dem *umu*-Test“ verwendet, das als DIN Norm (DIN 38415-3) veröffentlicht ist.

Da der Stamm voraussichtlich auch zu gewerblichen Zwecken genutzt werden wird, schlägt das Landesumweltamt Nordrhein-Westfalen vor, Arbeiten mit dem gentechnisch veränderten Stamm in Sicherheitsstufe 1 zu gewerblichen Zwecken einzustufen.

### Herkunft und Eigenschaften des Stammes

Der Stamm *Salmonella* Typhimurium TA1535 wurde von Ames u. Mitarb. 1971 aus einem *S. Typhimurium* Lysotyp 2-Wildstamm durch Mutation und Selektion gewonnen.

**TA1535** ist ein Histidin-auxotropher Stamm, der die missense Mutation *hisG46* trägt. Die Reversion dieses histidinabhängigen Teststammes zur Histidinunabhängigkeit durch die Wirkung eines Mutagens kann durch das Wachstum auf histidinfreien Agarplatten detektiert werden. Dieses Verfahren stellte das ursprüngliche Testsystem dar.

Der Teststamm besitzt weiterhin eine Deletion des Locus *uvrB*, wodurch das excision-repair-System nicht mehr funktionsfähig ist. Durch die Ausschaltung dieses Reparaturmechanismus können die DNA-schädigenden Wirkungen der nachzuweisenden Mutagene mit einer höheren Empfindlichkeit bestimmt werden. Durch diese Deletion wurde auch das benachbarte *gal* Operon betroffen.

Durch die Mutation *rfa* (deep rough) wird die Lipopolysaccharidsynthese blockiert. Die Zellwand wird auf diese Weise für die nachzuweisenden mutagenen Chemikalien besser permeabel; die Empfindlichkeit des Teststammes wurde dadurch erhöht.

Dem Teststamm fehlt das chromosomale *lacZ* Gen.

**pSK1002** ist ein pBR322-Derivat, das neben dem Gen für  $\beta$ -Lactamase (Ampicillin-Resistenz) die Gene *lacY*, *lacZ*, *umuC* und *umuD* aus *E. coli* K12 enthält. Im Konstrukt ist das *lacZ* Gen an *umuC* des *umu*-Operons fusioniert, das noch Promotor und Operator enthält. Das *umu*-Operon wird durch die SOS-Gene *recA* (Co-Protease) und *lexA* (Repressor) reguliert. Nach DNA-Schädigung wird es verstärkt exprimiert.

Durch die Fusion von *umuC* (das noch unter der SOS-induzierbaren Regulation steht) mit *lacZ* kann ein chromogenes Substrat der  $\beta$ -Galaktosidase photometrisch als Maß für die DNA-schädigenden Effekte eingesetzt werden.

### Bewertung.

Es ist nicht zu erwarten, daß der Teststamm bei Menschen, Tieren oder Pflanzen Krankheiten verursachen kann. Er enthält eingebaute biologische Schranken, die die Lebens- und Replikationsfähigkeit in der Umwelt begrenzen und hat keine nachteiligen Folgen für die Umwelt.

*S. Typhimurium* TA1535 ist durch mehrere Mutagenese- und Selektionsschritte entstanden. Es handelt sich um eine attenuierte Mutante, die u.a. eine Deletion des *gal* Operons aufweist und daher gemäß „Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung von *Salmonella* Typhimurium LT2-

Stämmen und von *Salmonella* Typhimurium-Stämmen mit stabilen Mutationen in den Genen *aroA*, *galE* oder *cya* und *crp* als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten“ in Risikogruppe 1 einzustufen ist. Der Stamm ist durch Mutationen so verändert, daß durch die *rfa* Mutation und die Deletion des *gal* Operons die Lipopolysaccharidsynthese blockiert wird.

Der Ames-Stamm zeichnet sich weiterhin durch experimentell erwiesene und langfristig sichere Anwendung aus. In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, daß bestimmte *S. Typhimurium* Impfstämme schon lange, und mit Erfolg, bei Hühnern, Schweinen und Rindern im Einsatz sind, ohne so gut charakterisiert wie der Teststamm zu sein (siehe „Stellungnahme der ZKBS zur Einstufung von zwei *Salmonella* „enterica“-Serovar Typhimurium-Impfstämmen für Hühner (Impfstoffe Zoosalora H bzw. TAD *Salmonella vac T*), einem *Salmonella* „enterica“-Serovar *choleraesuis*-Impfstamm für Schweine (Impfstoff Suisaloral) sowie einem *Salmonella* „enterica“-Serovar *dublin*-Impfstamm für Rinder (Impfstoff Bovisaloral) als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten“).

Die Mutante enthält ein rekombinantes Plasmid, bestehend aus pBR322 und Genen aus *E. coli*. Die Replikationsfähigkeit des Plasmids (Replicon *ColE1*) beschränkt sich auf *E. coli* und eng verwandte Organismen wie *S. Typhimurium*. pBR322 ist ein rekombinanter Vektor, der über lange Zeit sicher angewendet wurde. Er ist gemeinsam mit dem Empfängerorganismus *E. coli* K12 als biologische Sicherheitsmaßnahme anerkannt.

### Sicherheitsmaßnahmen

Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 1 zu Forschungs- und gewerblichen Zwecken sind einzuhalten. Nach den Grundregeln mikrobiologischer Arbeitstechniken sind Abwasser und Abfall zu inaktivieren.