ZKBS
Zentrale Kommission
für die Biologische Sicherheit

Az. 45270_e Dezember 2021

# Stellungnahme der ZKBS zur Eignung von haploiden Laborstämmen von *Saccharomyces cerevisiae* als Teil biologischer Sicherheitsmaßnahmen gemäß § 8 Absatz 1 GenTSV

## 1. Allgemeines

Mit dem Inkrafttreten der Novelle der Gentechnik-Sicherheitsverordnung (GenTSV) zum März 2021 ist es erforderlich, dass entsprechend § 7 Abs. 5 GenTSV das Fortbestehen bereits anerkannter biologischer Sicherheitsmaßnahmen (hier: Vektor- und Empfängersysteme) durch die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit bestätigt wird. Unter § 8 Abs. 1 der novellierten GenTSV wird ausgeführt, nach welchen Voraussetzungen die Verwendung eines Empfängerorganismus als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt werden kann. Diese sind erfüllt, wenn 1. eine wissenschaftliche Beschreibung und eine taxonomische Einordnung des Empfängerorganismus vorliegen, 2. die Vermehrung des Empfängerorganismus nur unter Bedingungen möglich ist, die außerhalb gentechnischer Anlagen selten oder nicht angetroffen werden, 3. der Empfängerorganismus für Mensch, Tier und Pflanzen nicht pathogen ist und keine umweltgefährdenden Eigenschaften aufweist und 4. der Empfängerorganismus nur einen geringen horizontalen Genaustausch mit anderen Spezies betreibt.

In dieser Stellungnahme wird geprüft und bewertet, ob haploide Laborstämme von *Saccharomyces cerevisiae* die o. g. Voraussetzungen erfüllen.

Haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* wurden bereits in den seit 1978 geltenden „Richtlinien zum Schutz vor Gefahren durch *in-vitro* neukombinierte Nukleinsäuren“ (zuletzt in der 5. überarbeiteten Fassung von 1986) als geeignete Empfängerorganismen für biologische Sicherheitsmaßnahmen anerkannt. Dies wurde ebenso im Gentechnikgesetz von 1990 fortgeschrieben. In den Jahrzehnten der breiten Nutzung von haploiden *S. cerevisiae*-Laborstämmen als biologische Sicherheitsmaßnahme haben sich diese ausnahmslos als sicher erwiesen.

BVL_FO_05_4100_402_V1.7

### 1.1. Wissenschaftliche Beschreibung

Die Spezies *S. cerevisiae* gehört zur Familie der *Saccharomycetaceae*. Die Familie umfasst Hefen, die sich durch Knospung vermehren und gehört zu den Ascomyceten. *S. cerevisiae* ist weltweit verbreitet und kommt in einer Vielzahl an Lebensräumen vor. *S. cerevisiae*-Zellen sind fakultativ aerob und haben je nach Zahl der Chromosomensätze eine ellipsoide oder

sphäroide Form. *S. cerevisiae* kann sich sowohl durch geschlechtliche als auch durch ungeschlechtliche Fortpflanzung vermehren [1]. Die Mehrheit aller wilden und domestizierten *S. cerevisiae*-Stämme vermehrt sich vegetativ und besitzt einen diploiden Chromosomensatz [2, 3].

Unter nährstoffreichen Bedingungen vermehrt sich *S. cerevisiae* ungeschlechtlich durch Knospung. Hierbei entsteht an der Mutterzelle zunächst ein kleiner Auswuchs, der sich kontinuierlich vergrößert. Nach der Einwanderung eines Kerns in den Auswuchs wird dieser als Knospe abgeschnürt. Wenn Stickstoff und fermentierbare Kohlenstoffquellen fehlen, sporulieren diploide *S. cerevisiae*-Zellen, die sowohl MATa- als auch MATα-Paarungstypen enthalten. Hierbei kommt es zur meiotischen Teilung, bei der vier haploide Ascosporen entstehen. Diese Sporen sind resistenter gegenüber chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen als vegetative Zellen [4, 5]. Wenn die Sporen auf genügend Nährstoffe treffen, keimen sie, woraufhin zwei haploide Zellen des entgegengesetzten Paarungstyps zu einer diploiden Zelle fusionieren können. Die Mutterzelle selbst kann nach einer Teilung den Paarungstyp wechseln und sich mit der Tochterzelle paaren. Dieser Fortpflanzungsmechanismus wird Homothallie genannt. Die Umschaltung des Paarungstyps wird durch die *Homothallic switching*-Endonuklease initiiert, die via Rekombination ein neues a- oder α-Gen in den MAT-Genlokus einfügt [6]. Wenn die Zelle nicht in der Lage ist, den Paarungstyp zu wechseln, teilen sich haploide Zellen so lange mitotisch, bis sie auf eine ausgekeimte Spore des entgegengesetzten Paarungstypus treffen. Dieser Fortpflanzungsmechanismus wird Heterothallie genannt. Die meisten *S. cerevisiae*-Wildisolate sind homothallisch [7].

Seit den 1930er Jahren werden *S. cerevisiae*-Stämme in genetischen Studien untersucht. Die Stämme wurden dafür auf Agarplatten und Stichagar-Kulturen kultiviert und seit den 1950iger Jahren auch durch Kryokonservierung präserviert [8]. Frühe Fortschritte in der Hefegenetik wurden mit haploiden Laborstämmen erzielt. Haploide Stämme eignen sich dafür, da Genanalysen unabhängig von der Dominanz eines Alleles möglich sind. Ein Großteil der haploiden Laborstämme von *S. cerevisiae* stammen von dem heterothallischen Stamm S288c ab [9, 10]. Der Stamm wurde in den 1960er Jahren von Robert Mortimer für genetische und molekularbiologische Studien gezüchtet [10, 11]. Die spontanen und eingeführten Mutationen von haploiden *S. cerevisiae*-Laborstämmen sind vielfältig und gut charakterisiert, sodass die Stämme in der Grundlagenforschung und Biotechnologie vielseitig einsetzbar sind. Auxotrophien tragen z. B. dazu bei, die Überlebensfähigkeit von Hefen in der Umwelt zu verringern. Die Genome verschiedener haploider Laborstämme von *S. cerevisiae* sind vollständig sequenziert [12–14].

Bei haploiden Laborstämmen von *S. cerevisiae* handelt es sich um wissenschaftlich sehr gut charakterisierte Modellorganismen mit einer taxonomisch eindeutigen Einordnung.

BVL_FO_05_4100_402_V1.7

### 1.2. Pathogenes Potential von haploiden Laborstämmen von *S. cerevisiae*

Einige wenige *S. cerevisiae*-Stämme sind als humanpathogene Erreger beschrieben. Sie sind für 1 – 4 % aller schweren Pilzinfektionen beim Menschen verantwortlich [15]. Diese Stämme sind assoziiert mit Entzündungen der Haut und Schleimhäute bei immunkompetenten Patienten und systemischen Infektionen der Blutbahn bei immungeschwächten Patienten. Die meisten klinischen Stämme sind durch vier Virulenzfaktoren gekennzeichnet. Sie wachsen bei

Temperaturen über 37 °C, sind dazu befähigt Pseudohyphen auszubilden, können sich an Epithelzellen anheften und *in vivo* proliferieren [16].

In haploiden Laborstämmen von *S. cerevisiae* sind diese Eigenschaften nicht ausgeprägt. Die meisten Laborstämme sind nicht oder nur wenig in der Lage, bei Temperaturen über 37 °C zu wachsen [17, 18]. Aufgrund von Mutationen im *FL08*-Gen sind der Stamm S288c und davon abgeleitete Stämme nicht in der Lage, Pseudohyphen auszubilden [19]. Im Gegensatz zu klinischen Isolaten sind haploide Laborstämme nicht in der Lage, sich an Epithelzellen anzuheften [20]. Im Mausmodell können S288c-abgeleitete diploide Laborstämme bei intravenöser Injektion von 2 x $10^7$ koloniebildenden Einheiten keine Gewebe und Organe kolonisieren [21]. Klinische Isolate hingegen sind in der Lage, das Gehirn, die Bauchspeicheldrüse, Leber, Niere und Lunge der Tiere zu kolonisieren. Der haploide Laborstamm S288c sowie auch kommerzielle *S. cerevisiae*-Stämme werden bei Ferkeln als Probiotikum eingesetzt, ohne schädliche Auswirkungen für die Tiere [22, 23].

Einige *S. cerevisiae*-Stämme sind mit einer Phytopathogenität assoziiert. So ist eine schädigende Wirkung von Pseudohyphen-bildenden Isolaten bei Weinreben beschrieben [24]. Haploiden Laborstämme sind apathogen für Pflanzen, da sie zumeist nicht in der Lage sind Pseudohyphen auszubilden [25].

Haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* sind apathogen und stellen damit kein Risiko für Mensch, Tier und Pflanze dar.

### 1.3. Vermehrungsfähigkeit von haploiden Laborstämmen von *S. cerevisiae* außerhalb von gentechnischen Anlagen

Vielfältige Studien mit Boden- und Wasserproben zeigen, dass haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* nicht in der Umwelt überdauern können. So überleben haploide Laborstämme und kommerzielle Bäckerhefestämme nicht länger als 20 Tage in unsterilen suspendierten Bodenproben [26, 27]. Beim Zusatz von Nährmedium zu suspendierten Bodenproben werden haploide Laborstämme von der konkurrierenden Mikroflora überwachsen und sind nach weniger als 20 Tage nicht mehr nachweisbar [26, 28]. Bei einer Freisetzung in Abwässern sind nach 20 Tagen keine haploiden Laborstämme mehr nachweisbar [26].

Diese Daten zeigen, dass haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* nur kurzfristig in der Lage sind, in Böden und Gewässern zu überleben. Eine dauerhafte Etablierung in der Umwelt erfolgt nicht.

### 1.4. Horizontaler Gentransfer von haploiden Laborstämmen von *S. cerevisiae* zu anderen Organismen

Horizontaler Gentransfer bei Pilzen kann durch Prozesse wie Transformation und geschlechtliche Vererbung von genetischem Material stattfinden, deren molekulare Abläufe umfassend untersucht wurden [29–31].

Im Gegensatz zu verschiedenen Bakterienspezies sind die meisten Pilze nicht in der Lage, DNA aktiv aus der Umgebung aufzunehmen, und weisen somit keine natürliche Kompetenz für die Transformation mit freier DNA auf. Für *S. cerevisiae* liegen jedoch Daten vor, die auf eine natürliche Kompetenz hindeuten. So werden die Hefen während der stationären

Wachstumsphase in Anwesenheit von Zucker und der Abwesenheit anderer Nährstoffe kompetent für eine Aufnahme von DNA [32]. Weiterhin kann *S. cerevisiae* DNA nach dem Wechsel von einem isotonischen zu einem hypotonischen Nährmedium aufnehmen [33].

In gentechnischen Arbeiten gelangt DNA unter solchen Bedingungen in *S. cerevisiae*-Zellen, die die Zellwand und die Zellmembran hierfür durchlässig machen, z. B. durch die Anwendung physikalischer (Elektroporation) oder chemischer (Polyethylenglycol/$Ca^{2}$+-Schock) Methoden.

Neben der Aufnahme von DNA mittels Transformation sind Hefen in der Lage, genetisches Material über die geschlechtliche Fortpflanzung zu vererben. So können heterothallische haploide *S. cerevisiae*-Stämme mit verwandten Spezies der Gattung *Saccharomyces* lebensfähige Hybride hervorbringen. Die Wahrscheinlichkeit, dass Hybridzellen bei der Paarung entstehen, sinkt je weniger eng die Spezies miteinander verwandt sind. Die Nachkommen nah verwandter Elternspezies tragen meist das genetische Material beider Eltern, wohingegen bei entfernt verwandten Elternspezies die Nachkommen das genetische Material nur einer Elternspezies und Fragmente des genetischen Material des anderen Elternteils tragen [34].

Insgesamt ist der horizontale Gentransfer durch haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* nur in geringen Maße möglich und beschränkt sich auf eng verwandte Spezies.

## 2. Empfehlung

Nach § 8 Absatz 1 GenTSV werden haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* als Teil einer biologischen Sicherheitsmaßnahme anerkannt.

## 3. Begründung

Haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* erfüllen die Voraussetzungen des § 8 Abs. 1 GenTSV für die Anerkennung als Empfängerorganismen für biologische Sicherheitsmaßnahmen. Sie sind wissenschaftlich sehr gut beschrieben und apathogen für Mensch, Tier und Pflanze. Das Überleben von haploiden Laborstämmen außerhalb gentechnischer Anlagen ist gut untersucht und es ist gezeigt, dass die Hefen nur für kurze Zeiträume in Böden und Gewässern überlebensfähig sind. Diese Hefen stellen somit keine Gefahr für die Rechtsgüter nach § 1 Abs. 1 GenTG dar. Der horizontale Gentransfer von *S. cerevisiae* auf andere Mikroorganismen ist im Allgemeinen sehr niedrig und beschränkt sich auf nahe Verwandte derselben Gattung.

Haploiden Stämme, die nicht von etablierten Laborstämmen abstammen, sind meist nicht ausreichend wissenschaftlich und hinsichtlich ihres pathogenen Potentials für Mensch, Tier und Pflanze charakterisiert, um als Empfängerorganismen für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet zu sein.

Informationen dazu, ob einzelne haploide Laborstämme von *S. cerevisiae* entsprechend der in dieser Stellungnahme festgelegten Kriterien als Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen geeignet sind, werden in der Datenbank der Empfängerstämme für biologische Sicherheitsmaßnahmen gesammelt und zur Verfügung gestellt, die von der ZKBS-Geschäftsstelle geführt wird.

## Literatur


1. **Sherman F** (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**:3–41.
2. **Cubillos FA, Vásquez C, Faugeron S, Ganga A, Martínez C** (2009). Self-fertilization is the main sexual reproduction mechanism in native wine yeast populations. *FEMS Microbiol Ecol* **67**(1):162–70. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00600.x.
3. **Tsai IJ, Bensasson D, Burt A, Koufopanou V** (2008). Population genomics of the wild yeast Saccharomyces paradoxus: Quantifying the life cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(12):4957–62. doi:10.1073/pnas.0707314105.
4. **Knight SJ, Goddard MR** (2016). Sporulation in soil as an overwinter survival strategy in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **16**(1):1–8. doi:10.1093/femsyr/fov102.
5. **Neiman AM** (2011). Sporulation in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **189**(3):737–65. doi:10.1534/genetics.111.127126.
6. **Kostriken R, Strathern JN, Klar AJ, Hicks JB, Heffron F** (1983). A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**(1):167–74. doi:10.1016/0092-8674(83)90219-2.
7. **Katz Ezov TAL, Chang S-L, Frenkel Z'E, Segrè AV, Bahalul M, Murray AW, Leu J-Y, Korol A, Kashi Y** (2010). Heterothallism in *Saccharomyces cerevisiae* isolates from nature: effect of HO locus on the mode of reproduction. *Mol Ecol* **19**(1):121–31. doi:10.1111/j.1365-294X.2009.04436.x.
8. **Lindegren CC** (1949). The yeast cell. Its Genetics and Cytology., 1st ed.. Educational Publishers, Inc, St. Louis
9. **Louis EJ** (2016). Historical Evolution of Laboratory Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Protoc* **2016**(7):585 - 593. doi:10.1101/pdb.top077750.
10. **Mortimer RK, Johnston JR** (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics* **113**(1):35–43. doi:10.1093/genetics/113.1.35.
11. **Mortimer RK, Lerner RS, Barr JK** (1957). Ultraviolet-induced biochemical mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *UCRL US At Energy Comm* **1957**(3746):2–10.
12. **Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG** (1996). Life with 6000 Genes. *Science* **274**(5287):546–67. doi:10.1126/science.274.5287.546.
13. **Araya CL, Payen C, Dunham MJ, Fields S** (2010). Whole-genome sequencing of a laboratory-evolved yeast strain. *BMC Genomics* **11**(1):88. doi:10.1186/1471-2164-11-88.
14. **Matheson K, Parsons L, Gammie A** (2017). Whole-Genome Sequence and Variant Analysis of W303, a Widely-Used Strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)* **7**(7):2219–26. doi:10.1534/g3.117.040022.
15. **Raghavan V, Aquadro CF, Alani E** (2019). Baker's Yeast Clinical Isolates Provide a Model for How Pathogenic Yeasts Adapt to Stress. *Trends Genet* **35**(11):804–17. doi:10.1016/j.tig.2019.08.002.
16. **McCusker JH** (2006). *Saccharomyces cerevisiae:* an Emerging and Model Pathogenic Fungus. *In* Heitman J (ed), Molecular principles of fungal pathogenesis. ASM Press, Washington, D.C.
17. **Steinmetz LM, Sinha H, Richards DR, Spiegelman JI, Oefner PJ, McCusker JH, Davis RW** (2002). Dissecting the architecture of a quantitative trait locus in yeast. *Nature* **416**(6878):326–30. doi:10.1038/416326a.
18. **McCusker JH, Clemons KV, Stevens DA, Davis RW** (1994). *Saccharomyces cerevisiae* virulence phenotype as determined with CD-1 mice is associated with the ability to grow at 42 degrees C and form pseudohyphae. *Infect Immun* **62**(12):5447–55. doi:10.1128/iai.62.12.5447-5455.1994.
19. **Liu H, Styles CA, Fink GR** (1996). Saccharomyces cerevisiae S288C Has a Mutation in FL08, a Gene Required for Filamentous Growth. *Genetics* **144**(3):967–78.
20. **Murphy AR, Kavanagh KA** (2001). Adherence of clinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae* to buccal epithelial cells. *Med Mycol* **39**(1):123–7. doi:10.1080/mmy.39.1.123.127.
21. **Clemons KV, McCusker JH, Davis RW, Stevens DA** (1994). Comparative pathogenesis of clinical and nonclinical isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Infect Dis* **169**(4):859–67. doi:10.1093/infdis/169.4.859.

22. **Zhaxi Y, Meng X, Wang W, Wang L, He Z, Zhang X, Pu W** (2020). Duan-Nai-An, A Yeast Probiotic, Improves Intestinal Mucosa Integrity and Immune Function in Weaned Piglets. *Sci Rep* **10**(1):4556. doi:10.1038/s41598-020-61279-6.
23. **Trckova M, Faldyna M, Alexa P, Zajacova ZS, Gopfert E, Kumprechtova D, Auclair E, D'Inca R** (2014). The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *J Anim Sci* **92**(2):767–74. doi:10.2527/jas.2013-6793.
24. **Gognies S, Belarbi A, Ait Barka E** (2001). *Saccharomyces cerevisiae*, a potential pathogen towards grapevine, Vitis vinifera. *FEMS Microbiol Ecol* **37**(2):143–50. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00862.x.
25. **Gognies S, Barka EA, Gainvors-Claisse A, Belarbi A** (2006). Interactions Between Yeasts and Grapevines: Filamentous Growth, Endopolygalacturonase and Phytopathogenicity of Colonizing Yeasts. *Microb Ecol* **51**(1):109–16. doi:10.1007/s00248-005-0098-y.
26. **Fujimura H, Sakuma Y, Amann E** (1994). Survival of genetically-engineered and wild-type strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under simulated environmental conditions: a contribution on risk assessment. *J Appl Bacteriol* **77**(6):689–93.
27. **Ando A, Suzuki C, Shima J** (2005). Survival of Genetically Modified and Self-Cloned Strains of Commercial Baker's Yeast in Simulated Natural Environments: Environmental Risk Assessment. *Appl Environ Microbiol* **71**(11):7075–82. doi:10.1128/AEM.71.11.7075-7082.2005.
28. **Bröker M** (1990). A study on the survival of wild-type, laboratory and recombinant strains of the baker yeast *Saccharomyces cerevisiae* under sterile and nonsterile conditions. *Zentralbl Hyg Umweltmed* **190**(5-6):547–57.
29. **Fitzpatrick DA** (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiol Lett* **329**(1):1–8. doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02465.x.
30. **Mitrikeski PT** (2015). Pathways and Mechanisms of Yeast Competence: A New Frontier of Yeast Genetics . pp. 223–37. *In* Van den Berg, Marco A, Maruthachalam K (eds), Genetic Transformation Systems in Fungi, Volume 2. Springer
31. **Mitrikeski PT** (2013). Yeast competence for exogenous DNA uptake: towards understanding its genetic component. *Antonie Van Leeuwenhoek* **103**(6):1181–207. doi:10.1007/s10482-013-9905-5.
32. **Nevoigt E, Fassbender A, Stahl U** (2000). Cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are transformable by DNA under non-artificial conditions. *Yeast* **16**(12):1107–10. doi:10.1002/1097-0061(20000915)16:12<1107:AID-YEA608>3.0.CO;2-3.
33. **Neukamm B, Stahl U, Lang C** (2002). Endocytosis is involved in DNA uptake in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1572**(1):67–76. doi:10.1016/s0304-4165(02)00279-9.
34. **Marinoni G, Manuel M, Sulo P, Petersen RF, Piskur J** (1999). Horizontal Transfer of Genetic Material among *Saccharomyces* Yeasts. *J Bacteriol* **181**(20):6488–96. doi:10.1128/JB.181.20.6488-6496.1999.