

**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von
Bacillus anthracis BH490, BH500 und BH510
als Spender- oder Empfängerorganismen
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Bacillus anthracis ist ein Gram-positives Bakterium aus der Familie der *Bacillaceae*, das zur *Bacillus cereus*-Gruppe gehört und Endosporen bildet. Es ist eng verwandt mit *B. cereus*, so dass vermutet wird, dass sich *B. anthracis* ausgehend von einem gemeinsamen Ausgangsorganismus durch die Aufnahme von Plasmiden und durch Mutationen des Bakterienchromosoms weiterentwickelt hat [1; 2]. *B. anthracis* ist der Erreger des Milzbrandes und wird in der Liste der Spender- und Empfängerorganismen nach § 5 Abs. 6 der GenTSV der **Risikogruppe 3** zugeordnet.

Die Gene für die Hauptpathogenitätsfaktoren von *B. anthracis* sind auf den Virulenzplasmiden pXO1 und pXO2 lokalisiert. Bei den auf pXO1 lokalisierten Virulenzfaktorengen handelt es sich um die Gene für die Komponenten des Toxincomplexes, den Letalfaktor LF, den Ödemfaktor EF und das protektive Antigen PA. Darüber hinaus befindet sich auch das Gen für den Virulenzregulator AtxA auf diesem Plasmid. Dieser reguliert die Expression der Gene des Toxincomplexes, aber auch die Expression der Biosynthesegene für die Polyglutaminsäurekapsel [3; 4]. Auf dem Plasmid pXO2 sind die Gene lokalisiert, die für Synthese und Abbau der Polyglutaminsäurekapsel benötigt werden.

Daneben liegen weitere Pathogenitätsfaktorogene auf dem Bakterienchromosom vor. Hierbei handelt es sich um Gene für Enterotoxine, Phospholipase C, sezernierte Proteasen wie p60, Immuninhibitor A und HtrA [5], Eisenaufnahmesysteme und Siderophore [6], Mangantransporter [7], eine Stickoxidsynthase [8], Anthrolysin O (Cyto- bzw. Hämolyisin) [9] und Superoxiddismutasen [10].

Den für die Impfung gegen Anthrax eingesetzten Veterinär- bzw. Humanimpfstoffen fehlt meist eines der Plasmide. Impfstämmen vom „Pasteur-Typ“ fehlt das Plasmid pXO1, *B. anthracis*-Impfstämmen wie Sterne oder dem russischen Stamm STI-1 fehlt dagegen das Plasmid pXO2. Diese Impfstämme werden der **Risikogruppe 2** zugeordnet, da sie zwar attenuiert sind, aber eine Restpathogenität erhalten bleibt. Diese äußert sich darin, dass die Impfstämme im besonders suszeptiblen Wirtsorganismus Maus letal sein können. Es wurde gezeigt, dass die Injektion von 10^6 Sporen eines *B. anthracis* Sterne-Stammes (pXO2⁻) in die Pfote für 50 % der Mäuse letal ist (LD₅₀). Im Gegensatz dazu war die Injektion von mehr als 10^9 Sporen eines von *B. anthracis* Sterne abgeleiteten, plasmidlosen Stammes (pXO1⁻ pXO2⁻) für Mäuse nicht letal, genauso wie die Injektion von mehr als 10^9 Sporen der apathogenen Spezies *Bacillus subtilis*.

Allerdings zeigte die Analyse der Wachstumskurven nach der Injektion von jeweils 10^8 Sporen, dass der plasmidlose *B. anthracis*-Stamm trotz des Fehlens der Hauptvirulenzfaktoren eine Infektion im Versuchstier etablieren kann. Fünf Tage nach der Injektion der Sporen wurden die Pfoten abgetrennt und die Zahl der Bakterien bestimmt. Während die Zellzahl von *B. subtilis*

fünf Tage nach der Injektion nur $10^{4.2}$ colony forming units (CFU) pro Pfote betrug, wurden der plasmidlose Stamm (pXO1⁻ pXO2⁻) genauso wie der Ausgangsstamm (pXO2⁻) deutlich langsamer eliminiert. Die Zellzahl beider Stämme betrug nach fünf Tagen noch ca. 10^8 CFU pro Pfote [11].

Die Pathogenität der Impfstämme für den Menschen ist deutlich geringer als für Mäuse. Der Stamm *B. anthracis* STI-1 (pXO2⁻) wurde seit 1953 in der früheren UdSSR als Anthrax-Lebendvakzine verabreicht. Im Laufe der Jahrzehnte wurden mehrere Millionen Personen geimpft. Die Nebenwirkungen bewegten sich im Rahmen des Üblichen (leichtes Fieber, Rötungen oder Verhärtungen an der Einstichstelle oder Schwellungen der benachbarten Lymphknoten) [12]. Es ist nicht bekannt, ob die Attenuierung von *B. anthracis* STI-1 ausschließlich aus dem Verlust des Plasmides pXO1⁻ oder auch auf dem Verlust von weiteren Virulenzfaktoren beruht.

Der Stamm *B. anthracis* BH490 basiert auf dem Wildtyp-Stamm *Bacillus anthracis* Ames 35. Aus dem Genom wurden die Plasmide pXO1 und pXO2 entfernt und das Gen für den Sporulationsregulator SpoOA deletiert, so dass *B. anthracis* BH490 weder die Plasmide mit den Hauptvirulenzfaktorgenen trägt, noch zur Sporulation in der Lage ist. Im Genom des Stammes wurden darüber hinaus einige Proteasegene deletiert, um die Menge und Stabilität von sezernierten Proteinen zu verbessern. Bei den deletierten Genen handelt es sich um Gene für die Proteasen NprB, TasA, Cam, CysP1, VpR, InhA1, InhA2, MmpZ und NprC [13]. Im Genom des Stammes *B. anthracis* BH500 wurde zusätzlich das Gen für die Protease S41 [14] und im Genom des Stammes *B. anthracis* BH510 das Gen für die Serinprotease HtrA deletiert, die ein Virulenzfaktor von *B. anthracis* ist [5].

Der Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe hat den ebenfalls plasmidlosen Stamm *B. anthracis* CDC1014 in die Risikogruppe 2 eingestuft [15].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden *Bacillus anthracis* BH490, BH500 und BH510 als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Es ist davon auszugehen, dass *B. anthracis*-Stämme, denen beide Virulenzplasmide fehlen, im Vergleich zum Wildtyp deutlich attenuiert sind. Im Genom von *B. anthracis* BH490, BH500 und BH510 wurden zudem Gene für sezernierte Proteasen deletiert, von denen einige ebenfalls Virulenzdeterminanten sind. Ein geringes Gefährdungspotential ist dennoch nicht auszuschließen, weil *B. anthracis* weitere chromosomal kodierte Virulenzfaktoren besitzt. Es liegen keine experimentellen Daten vor, die belegen, dass plasmidlose Stämme von *B. anthracis* im Allgemeinen bzw. *B. anthracis* BH490, BH500 und BH510 im Besonderen vollständig attenuiert sind.

Literatur

1. **Okinaka R, Pearson T, Keim P** (2006). Anthrax, but not *Bacillus anthracis*? *PLOS Pathogens*. 2(11):e122.
2. **Slamti L, Perchat S, Gominet M, Vilas-Bôas G, Fouet A, Mock M, Sanchis V, Chaufaux J, Gohar M, Lereclus D** (2004). Distinct mutations in PlcR explain why some strains of the *Bacillus cereus* group are nonhemolytic. *J Bacteriol.* 186(11):3531-8.

3. **Koehler TM** (2002). *Bacillus anthracis* genetics and virulence gene regulation, p. 143-164. In: Anthrax. Springer.
4. **Drysdale M, Bourgogne A, Hilsenbeck SG, Koehler TM** (2004). *atxA* controls *Bacillus anthracis* capsule synthesis via *acpA* and a newly discovered regulator, *acpB*. *J Bacteriol.* **186**(2):307-15.
5. **Chitlaru T, Zaide G, Ehrlich S, Inbar I, Cohen O, Shafferman A** (2011). HtrA is a major virulence determinant of *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol.* **81**(6):1542-59.
6. **Read TD, Peterson SN, Tourasse N, Baillie LW, Paulsen IT, Nelson KE, Tettelin H, Fouts DE, Eisen JA, Gill SR, Holtzapple EK, Økstad OA, Helgason E, Rilstone J, Wu M, Kolonay JF, Beanan MJ, Dodson RJ, Brinkac LM, Gwinn M, DeBoy RT, Madpu R, Daugherty SC, Durkin AS, Haft DH, Nelson WC, Peterson JD, Pop M, Khouri HM, Radune D, Benton JL, Mahamoud Y, Jiang L, Hance IR, Weidman JF, Berry KJ, Plaut RD, Wolf AM, Watkins KL, Nierman WC, Hazen A, Cline R, Redmond C, Thwaite JE, White O, Salzberg SL, Thomason B, Friedlander AM, Koehler TM, Hanna PC, Kolstø A-B, Fraser CM** (2003). The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature.* **423**(6935):81-6.
7. **Gat O, Mendelson I, Chitlaru T, Ariel N, Altboum Z, Levy H, Weiss S, Grosfeld H, Cohen S, Shafferman A** (2005). The solute-binding component of a putative Mn (II) ABC transporter (MntA) is a novel *Bacillus anthracis* virulence determinant. *Mol Microbiol.* **58**(2):533-51.
8. **Shatalin K, Gusarov I, Avetissova E, Shatalina Y, McQuade LE, Lippard SJ, Nudler E** (2008). *Bacillus anthracis*-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages. *Proc Nat Acad Sci.* **105**(3):1009-13.
9. **Shannon JG, Ross CL, Koehler TM, Rest RF** (2003). Characterization of anthrolysin O, the *Bacillus anthracis* cholesterol-dependent cytolysin. *Infect Immun.* **71**(6):3183-9.
10. **Cybulski RJ, Sanz P, Alem F, Stibitz S, Bull RL, O'Brien AD** (2009). Four superoxide dismutases contribute to *Bacillus anthracis* virulence and provide spores with redundant protection from oxidative stress. *Infect Immun.* **77**(1):274-85.
11. **Pezard C, Berche P, Mock M** (1991). Contribution of individual toxin components to virulence of *Bacillus anthracis*. *Infect Immun.* **59**(10):3472-7.
12. **Shlyakhov EN, Rubinstein E** (1994). Human live anthrax vaccine in the former USSR. *Vaccine.* **12**(8):727-30.
13. **Pomerantsev AP, Pomerantseva OM, Moayeri M, Fattah R, Tallant C, Leppla SH** (2011). A *Bacillus anthracis* strain deleted for six proteases serves as an effective host for production of recombinant proteins. *Protein Expr Purif.* **80**(1):80-90.
14. **Pomerantsev AP, McCall RM, Chahoud M, Hepler NK, Fattah R, Leppla SH** (2017). Genome engineering in *Bacillus anthracis* using tyrosine site-specific recombinases. *PLOS One.* **12**(8):e0183346.
15. **ABAS** (2012). Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen in Risikogruppe 2 nach Biostoffverordnung. <https://www.baua.de/DE/Aufgaben/Geschaeftsfuehrung-von-Ausschuessen/ABAS/pdf/Bacillus-anthraxis.pdf>.