

Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von
***Mycoplasma mycoides* JCVI-syn2.0 und *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn3.0 als**
Spender- oder Empfängerorganismus
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Bei *M. mycoides* JCVI-syn2.0 und *M. mycoides* JCVI-syn3.0 handelt es sich um Minimalorganismen, die im Jahr 2016 am J. Craig Venter Institut (JCVI) fertiggestellt wurden [1]. Sie leiten sich vom synthetischen Stamm *M. mycoides* JCVI-syn1.0 [2] ab, welcher im Jahr 2010 durch die ZKBS (Az. 6790-05-01-94) in die **Risikogruppe 2** eingestuft wurde. Das Genom von *M. mycoides* JCVI-syn1.0 wurde *in vitro* synthetisiert und enthält im Wesentlichen dieselbe genetische Information wie *M. mycoides* subsp. *capri* (**Risikogruppe 2**). *M. mycoides* subsp. *capri* ist ein gut charakterisiertes, Gram-positives Bakterium aus der Klasse der *Mollicutes* und Erreger der infektiösen Agalaktie der Ziege [3]. Die Letalität beträgt 20 % oder weniger, kann aber bis zu 70 % erreichen, wenn es zu Blutvergiftungen kommt [4].

Mykoplasmen sind an die stabile, nährstoffreiche Umgebung des tierischen Wirtes angepasst. Typische Virulenzfaktoren wie Toxine, Zytolysine und Invasine fehlen i. d. R.. Die komplexen Pathogenitätsmechanismen sind für viele Mykoplasmen nicht vollständig aufgeklärt [5-7]. Als ein Virulenzfaktor von *M. mycoides* subsp. *mycoides* (früher: *M. mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony) wurde die α -Glycerophosphat-Oxidase beschrieben. Dieses Enzym, welches vermutlich auch von *M. mycoides* subsp. *capri* gebildet wird [5], liefert durch den Abbau von Glycerin signifikante Mengen von H_2O_2 , welches die Wirtszellen schädigt. Auch ein ABC-Transporter zur Glycerin-Aufnahme, der in weniger virulenten Stämmen fehlt, trägt vermutlich zur Pathogenität bei [6].

M. mycoides JCVI-syn3.0 wurde mit dem Ziel hergestellt, eine autonom replizierende Zelle zu erhalten, welche nur die absolut essenziellen Gene für das Überleben unter idealen Bedingungen besitzt [1; 8]. Für das Überleben in komplexen Medien wurden nicht-essenzielle Gene mithilfe der wissenschaftlichen Literatur und Daten aus Transposonmutagenese-Experimenten identifiziert und anschließend deletiert. Generell wurden die kodierenden Regionen der nicht-essenziellen Gene, einschließlich des Start- und Stopp-Kodons, vollständig entfernt. Bei Genclustern wurden auch die intergenischen Regionen entfernt. Nur regulatorische Nukleotidsequenzen, die zur Expression weiterer Gene nötig sind (z.B. Ribosomenbindestellen oder Promotoren) blieben erhalten. Die *in vitro*-Synthese des JCVI-syn3.0-Genoms erfolgte nach der Gibson Assembly®-Methode [2]. Das reduzierte Genom wurde schließlich auf *M. capricolum* subsp. *capricolum*-Zellen (**Risikogruppe 2**) übertragen und überlebensfähige Bakterien, die nur noch dieses reduzierte Genom aufwiesen, mithilfe eines Selektionsmarkers selektiert [1].

Nach drei Verbesserungszyklen lag mit **JCVI-syn2.0** ein Stamm vor, dessen Genom mit 576 kb kleiner war als das aller bekannten natürlichen Bakterien (517 bekannte Gene: 478 Protein-

kodierend, 38 RNA-kodierend). **JCVI-syn3.0** wurde von JCVI-syn2.0 abgeleitet, indem weitere 42 Gene aus dem Genom entfernt wurden. Das Genom ist mit 531 kb (473 bekannte Gene: 439 Protein-kodierend, 35 RNA-kodierend) nur noch halb so groß wie das von JCVI-syn1.0 (1079 kb; 901 bekannte Gene) [1]. Im Vergleich zum Genom von JCVI-syn1.0 fehlen 428 Gene, davon ~ 63 % mit unbekannter Funktion, alle 73 mobilen Elemente und Gene, die für die Restriktion der DNA benötigt werden, sowie fast alle Lipoprotein-Gene. Da das Genom von JCVI-syn3.0 für das Wachstum in Vollmedium optimiert ist, fehlen zudem viele Gene für den Transport und Metabolismus, so z. B. die meisten Gene, die für die Verwertung anderer Kohlenstoffquellen als Glukose benötigt werden. Die noch vorhandenen 473 Gene lassen sich hauptsächlich in vier Kategorien einteilen: Fast alle Gene (195), die zur Genexpression sowie der Genom-Erhaltung (34 Gene) benötigt werden, blieben erhalten. Ein großer Anteil der Gene (84) kodiert für Bestandteile der Zellmembran (z. B. Transporter für die Aufnahme von kleinen Molekülen sowie Lipoproteine) oder für Proteine des Metabolismus (81). 79 Genen konnte keine biologische Funktion zugeordnet werden. Für einige ist eine Grundfunktion bekannt. Für 55 Gene ist die Funktion vollständig unbekannt. Potenzielle Homologe für einige dieser Gene finden sich in Genomen diverser Organismen. Vermutlich gibt es also noch bisher unentdeckte Funktionen, die essenziell für das Leben sind [1]. JCVI-syn3.0 hat eine ähnliche Kolonie-Morphologie wie JCVI-syn1.0 und wildtypische *M. mycoides* subsp. *capri*. Die JCVI-syn3.0-Kolonien sind jedoch kleiner und JCVI-syn3.0 weist eine erhöhte Verdopplungszeit von ~ 180 min (gegenüber ~ 60 min für JCVI-syn1.0 und ~ 92 min für JCVI-syn2.0) in statischer Flüssigkultur auf. Während JCVI-syn1.0 in Flüssigkultur hauptsächlich als Einzelzelle wächst, bildet JCVI-syn3.0 Sedimentgefüge. Die Zellen erscheinen darin mikroskopisch polymorph: enthalten sind lange, filamentöse Strukturen, große *vesicular bodies*, aber auch kleine replikationskompetente Zellen, die Filter mit einer Porengröße von 0,2 µm passieren können [1].

Eine kürzlich erschienene Publikation von Jores *et al.* (2019) beschreibt ein von *M. mycoides* subsp. *capri* Stamm GM12 abgeleitetes Bakterium, in dessen Genom 68 für das Wachstum nicht essenzielle Gene deletiert wurden [9]. 67 dieser Gene gehören zu den 437 in JCVI-syn3.0 deletierten Genen und kodieren unter anderem für Bestandteile des Glycerin-abhängigen Wasserstoffperoxid-Stoffwechselwegs und für Lipoproteine. In JCVI-syn2.0 sind drei dieser Gene, die für einen Wasserstoffperoxid-Stoffwechselweg kodieren [6], nicht deletiert. Die Wachstumsrate des in Jores *et al.* beschriebenen Stamms *M. mycoides* GM12::YCpMmyc1.1-Δ68 ist mit der des Ausgangsstamms vergleichbar. Im Tierexperiment wurden 10⁹ *colony forming units* von *M. mycoides* GM12::YCpMmyc1.1-Δ68 transtracheal an Ziegen verabreicht. Jeweils acht Ziegen erhielten den Wildtypstamm *M. mycoides* subsp. *capri* Stamm GM12 und acht Ziegen *M. mycoides* GM12::YCpMmyc1.1-Δ68. Die mit dem Wildtypstamm infizierten Tiere zeigten bereits nach kurzer Zeit Symptome wie nekrotisierende Entzündungen an der Inokulationsstelle, Fieber und Sepsis und mussten innerhalb von 5 bis 6 Tagen nach der Infektion getötet werden. Die mit *M. mycoides* GM12::YCpMmyc1.1-Δ68 infizierten Tiere zeigten bis zum Ende der Studie (28 Tage) keine klinischen Symptome. Bei der Euthanasie an Tag 28 wurden keine pathologischen Läsionen, Entzündungen oder Nekrosen festgestellt. Im Gegensatz zu den mit dem Wildtypstamm infizierten Ziegen konnten zudem aus dem Blut der mit *M. mycoides* GM12::YCpMmyc1.1-Δ68 infizierten Ziegen keine Bakterien isoliert werden.

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn2.0 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** und *Mycoplasma mycoides* JCVI-syn3.0 der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

Bei den Stämmen *M. mycoides* JCVI-syn2.0 und *M. mycoides* JCVI-syn3.0 handelt es sich um Minimalorganismen, die sich vom Stamm *M. mycoides* JCVI-syn1.0 ableiten. Ihr Genom ist im Vergleich zu diesem erheblich reduziert, so dass sie deutlich langsamer wachsen.

Es ist naheliegend, dass Gene, die für die Besiedelung eines Wirtes und die parasitische Lebensweise benötigt werden, in JCVI-syn2.0 und JCVI-syn3.0 nicht mehr vorhanden sind, da eine Selektion außerhalb des Wirtes und in Vollmedium erfolgte. Ein Vergleich und die funktionelle Zuordnung von Gensequenzen verschiedener Mykoplasmen, insbesondere derer, die an der Pathogenität beteiligt sind, gestaltet sich jedoch schwierig. Eine Analyse der Proteindomänen ergab, dass 26 von den 479 *core*-Domänen, die bei in Blut und Gewebe lebenden Mykoplasmen gefunden werden, in JCVI-syn3.0 fehlen [10].

Mykoplasmen besitzen eine Vielzahl potenzieller Virulenzfaktoren, wobei bereits der Verlust nur eines Pathogenitätsmechanismus zu einer Attenuierung führen kann [6]. So ist beispielsweise die Virulenz von *M. mycoides* subsp. *mycoides*-Stämmen, deren Kapsel-Polysaccharidbiosynthese verringert ist, stark reduziert, obwohl diese Stämme noch große Mengen an H₂O₂ produzieren [6; 11]. Die genaue Zuordnung und Bedeutung von Genen, die an der Pathogenität von *M. mycoides*-Subspezies beteiligt sind, ist bislang nicht vollkommen aufgeklärt. *M. mycoides* GM12::YCpMmyc1.1-Δ68, dem 67 der auch in JCVI-syn3.0 deletierten Gene fehlen, erwies sich in einem Tierexperiment als vollkommen apathogen. Da diese Gene auch bei JCVI-syn3.0 deletiert sind und JCVI-syn3.0 zudem eine im Vergleich zu JCVI-syn1.0 deutlich erhöhte Verdopplungszeit aufweist, wird JCVI-syn3.0 der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

In JCVI-syn2.0 sind 42 der in JCVI-syn3.0 deletierten Gene noch vorhanden, so auch die Gene *glpF*, *glpK* und *glpO*, die in GM12::YCpMmyc1.1-Δ68 ebenfalls deletiert sind. Die Produkte dieser Gene ermöglichen als *bypass pathway* den Import, die Phosphorylierung und die Oxidierung von Glycerin, was die Freisetzung toxischen H₂O₂ in die Wirtszelle ermöglicht [7]. Normalerweise erfolgt der Glycerin-Import über einen ABC-Transporter, dessen Operon *gtsABC* sowohl in JCVI-syn2.0 als auch in JCVI-syn3.0 deletiert ist. Da nicht klar ist, ob die verbliebenen Gene für den Glycerintransport Virulenzfaktoren darstellen und bisher keine experimentellen Daten zur Pathogenität von JCVI-syn2.0 vorliegen, wird JCVI-syn2.0 weiterhin der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Literatur

1. **Hutchison III et al.** (2016). Design and synthesis of a minimal bacterial genome. *Science* **351**:aad6253.
2. **Gibson et al.** (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science* **329**:52-6.
3. **Madanat et al.** (2001). Contagious agalactia of sheep and goats. A review. *Acta Vet Brno* **70**:403-12.
4. http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/contagious_agalactia.pdf
5. **Pilo et al.** (2005). A Metabolic Enzyme as a Primary Virulence Factor of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Small Colony. *J Bacteriol* **187**:6824-31.
6. **Pilo et al.** (2007). Molecular mechanisms of pathogenicity of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC. *Vet J* **174**:513-21.
7. **Hegde et al.** (2015). Simultaneous Identification of Potential Pathogenicity Factors of *Mycoplasma agalactiae* in the Natural Ovine Host by Negative Selection. *Infect Immun* **83**:2751-61.
8. **Sleator et al.** (2016). JCVI-syn3.0 – A synthetic genome stripped bare! *Bioengineered* **7**:53-6.
9. **Jores et al.** (2019). Removal of a Subset of Non-essential Genes Fully Attenuates a Highly Virulent *Mycoplasma* Strain. *Front Microbiol* **10**: 664.

10. **Kamminga et al.** (2017). Persistence of Functional Protein Domains in Mycoplasma Species and their Role in Host Specificity and Synthetic Minimal Life. *Front Cell Infect Microbiol* **7**:31.
11. **March & Brodlie** (2000). Comparison of the virulence of European and African isolates of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* small colony type. *Vet Rec* **147**:20-1.