



**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**

I. Einführung:

S. enterica subsp. *enterica* Serovar Typhimurium ist ein zur Familie der Enterobacteriaceae zählender Organismus, der als Wildtyp für den Menschen und verschiedene Tiere obligat pathogen ist und gemäß § 5 Abs. 2 und 6 i. V. m. Anhang I Teil B GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet wird.

Für gentechnische Arbeiten werden vielfach Stämme (z. B. Mutanten) von *S. Typhimurium* verwendet, die über eine stark abgeschwächte Virulenz verfügen. Es stellt sich daher die Frage, ob auch diese Stämme der **Risikogruppe 2** zuzuordnen sind.

Wildtypstämme von *S. Typhimurium* verursachen, nach Aufnahme von wenigstens 10^5 - 10^6 Bakterien mit der Nahrung, beim gesunden erwachsenen Menschen eine Gastroenteritis. Dabei dringen die Bakterien in die Epithelzellen des unteren Dünndarmes ein, werden zum darunterliegenden Bindegewebe (Lamina propria) transportiert und vermehren sich, zum Teil im Inneren von Makrophagen. Infolge der entzündlichen Reaktion unter Beteiligung des bakteriellen Endotoxins und Enterotoxins kommt es zu Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolyttransportes und zu Durchfällen, Erbrechen und Fieber. Das Krankheitsbild hält wenige Tage an. Die Salmonellen sind häufig im Stuhl noch 4-6 Wochen nach Krankheitsbeginn nachweisbar. Dauerausscheider kommen hingegen selten vor.

Das Pathogenitätsprinzip von *S. Typhimurium* besteht aus einer Reihe von Faktoren, die z.T. in ihrer Bedeutung noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Hierzu gehören u. a. das Lipopolysaccharid (LPS) der Zellwand mit dem O-Antigen und dem als Endotoxin wirkenden Lipoid A, ein Enterotoxin mit ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Chopra et al., 1987), ein Cytolysin mit hemmender Wirkung auf die Proteinsynthese (Koo et al., 1984) und eine Reihe plasmidkodierter Faktoren, die vermutlich an der Serumresistenz beteiligt sind (Hackett et al., 1987; Vandenbosch et al., 1987). Darüber hinaus verfügt *S. Typhimurium* über Faktoren, die die invasiven Eigenschaften vermitteln. Das Ausschalten einzelner Faktoren des Pathogenitätsprinzips, wie z. B. das des vollständigen O-Antigens der Zellwand, führt in der Regel zu einer starken Verminderung oder sogar zum vollständigen Verlust der Virulenz der Bakterien (Groisman et al., 1990; Jimenez-Lucho & Leive, 1990).

1. *S. Typhimurium* LT2-Stämme

Die bei gentechnischen Arbeiten eingesetzten Stämme von *S. Typhimurium* gehören meistens dem Lysotyp LT2 an. In der wissenschaftlichen Literatur werden *S. Typhimurium* LT2-Wildtypstämme mitunter als schwach pathogen bezeichnet (Hoiseh & Stocker, 1981). Die im Laborbereich eingesetzten *S. Typhimurium* LT2-Laborstämme werden teilweise wie *E. coli* K12 seit vielen Jahren auch für gentechnische Arbeiten eingesetzt, ohne daß es, bei Einhaltung "guter mikrobiologischer Praxis", zu einer Infektion des Personals gekommen ist (Sanderson & Stocker, 1987). In den USA unterliegen *S. Typhimurium* LT2-Stämme für gen-

technische Arbeiten nicht den Richtlinien des NIH und können wie *E. coli* K12 unter den Laborsicherheitsmaßnahmen der niedrigsten Stufe gehandhabt werden. Allgemeingültige sicherheitsrelevante Marker scheint es für Stämme des Lysotyps LT2 allerdings nicht zu geben. So ist im klinischen Bereich der Lysotyp LT2 bei epidemiologischen Untersuchungen häufig anzutreffen und hinsichtlich seines Gefährdungspotentiales nicht anders zu beurteilen als die übrigen Lysotypen von *S. Typhimurium* (Kühn & Tschäpe, Robert Koch-Institut, pers. Mittg.).

2. *S. Typhimurium* Mutanten

Von *S. Typhimurium*-Stämmen wurden in den letzten Jahren eine Reihe stabiler Mutanten (Revertantenhäufigkeit $<10^{-9}$ pro Bakterium und Generation) erzeugt, mit dem Ziel der Entwicklung von avirulenten Lebendimpfstämmen (Cardenas & Clements, 1992). Die in die Salmonellen eingeführten Mutationen führten u. a. zu Auxotrophien für bestimmte Aminosäuren und Purine (Fields et al., 1986) oder zu Störungen im bakteriellen Stoffwechsel, z. B. bei der Transkription von Genen (Curtiss et al., 1989). Die Auswirkung der Mutationen auf die Virulenz wurde überwiegend an Mäusen getestet, bei denen *S. Typhimurium* ähnliche Krankheitssymptome hervorruft wie der Erreger des Typhus abdominalis, *Salmonella* Typhi, beim Menschen. Während bei *S. Typhimurium*-Wildtypstämmen bereits eine intraperitoneale Verabreichung von etwa 10 Bakterien zum Tod der Mäuse führen kann, steigt die LD_{50} für die attenuierten Mutanten, je nach Art der Applikation, auf 10^5 bis über 10^9 Bakterien, so daß diese Stämme als schwach virulent anzusehen sind.

a) *S. Typhimurium* Mutanten mit defektem *aroA* Gen

Mutanten, die einen Defekt im Gen *aroA* aufweisen, sind nicht mehr in der Lage, das Enzym 3-Enolpyruvylshikimat-5-phosphat-Synthetase zu synthetisieren, das die Umsetzung von Shikimat-3-phosphat und Phosphoenolpyruvat in 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphat katalysiert. Durch eine Inaktivierung dieses Gens wird der Syntheseweg für einige aromatische Verbindungen, u.a. für die aromatischen Aminosäuren und die Metabolite p-Aminobenzoat und 2,3-Dihydroxybenzoat, die Vorstufen des Vitamins Folsäure bzw. des Enterochelins (Eisen-bindendes Siderophor) darstellen, blockiert (Hoiseith & Stocker, 1981). Da die letztgenannten Metabolite im Gewebe von Säugetieren nicht vorkommen, können sich die Mutanten dort schlecht vermehren und sind somit in ihrer Virulenz abgeschwächt (Dougan et al., 1988).

b) *S. Typhimurium* Mutanten mit defektem *galE* Gen

Das Gen *galE* kodiert für das Enzym Galactose-Epimerase, das die Umsetzung von UDP-Glucose in UDP-Galactose bei der Synthese der bakteriellen Zellwand katalysiert. Durch eine Inaktivierung dieses Gens kommt es zu einer Störung in der Synthese des Lipopolysaccharids (LPS). Die Mutanten verfügen daraufhin nicht mehr über ein vollständiges O-Antigen mit entsprechend glattem (*smooth*-Form) LPS und sind in ihrer Virulenz abgeschwächt, da sie vom Immunsystem (Complement, Makrophagen) eliminiert werden (Hone et al., 1987; Jimenez-Lucho & Leive, 1990).

c) *S. Typhimurium* Mutanten mit defekten *cya* und *crp* Genen

Mutanten mit einem Defekt in den Genen *cya* und *crp* können nicht mehr die Adenylatcyclase (*cya*) bzw. das cAMP-Rezeptorprotein (*crp*) synthetisieren (Curtiss & Kelly, 1987). Die Adenylatcyclase katalysiert in den Zellen die Umwandlung von ATP in cAMP. Das cAMP kann an das cAMP-Rezeptorprotein gebunden werden und mit diesem einen Komplex bilden, der die Transkription einer Vielzahl von Genen aktivieren kann (Pastan & Adhya, 1976). Hier-von betroffen sind insbesondere Gene, die für den Transport und den Abbau von Koh-

lenhydraten und Aminosäuren benötigt werden. Durch die eingeführten Mutationen sind die Bakterien u. a. nicht mehr in der Lage, eine Reihe von Kohlenhydraten zu verwerten und haben eine etwa doppelt so lange Generationszeit wie Wildtypstämme von *S. Typhimurium*. Untersuchungen mit Revertanten, die die Fähigkeit zur Verwertung bestimmter Kohlenhydrate wiedererlangt haben, haben ergeben, daß auch die Revertanten attenuiert waren. Hieraus ist zu schließen, daß die Attenuierung der erzeugten Mutanten auch auf andere noch nicht identifizierte Faktoren zurückzuführen ist.

II. Empfehlung 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:

Salmonella Typhimurium LT2-Stämme sind grundsätzlich der **Risikogruppe 2** zuzuordnen. Eine Herabstufung in die **Risikogruppe 1** gemäß § 5 Abs. 2 i. V. m. Anhang I Teil B GenTSV kann nur nach einer Einzelfallbetrachtung vorgenommen werden, wenn sichergestellt ist, daß die verwendeten Organismen nicht pathogen sind.

Salmonella Typhimurium-Stämme, die stabile Mutationen in den Genen *aroA*, *galE* oder *cya* und *crp* tragen, sind gemäß § 5 Abs. 2 i. V. m. Anhang I Teil B GenTSV der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, wenn sie bei gentechnischen Arbeiten als Empfängerorganismen eingesetzt werden. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Mutanten durch Klonierung von Fremd-DNA, insbesondere der Gene *aroA*, *galE* oder *cya* und *crp*, die auch in einem Gemisch von DNA-Sequenzen (z. B. Genbanken) vorliegen können, zum Wildtyp komplementiert werden können. Eine Höherstufung der GVOs in die **Risikogruppe 2** ist dann im Einzelfall notwendig. Gentechnische Arbeiten, bei denen bakterielle Nukleinsäuresequenzen in die Mutanten eingeführt werden, die die Überlebensfähigkeit der Bakterien erhöhen können oder die für Virulenzfaktoren anderer pathogener Bakterien kodieren, sind zur Einstufung der ZKBS vorzulegen.

Literatur

- Cardenas, L., & J. D. Clements. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clinical Microbiology* **5**:328-342
- Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W., Prasad, R. & J. J. Mekalanos. 1987. Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* **169**:5095-5100
- Curtiss, R., III & S. M. Kelly. 1987. *Salmonella* Typhimurium deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infection and Immunity* **55**:3035-3043
- Curtiss, R., III, Kelly, S. M., Gulig, P. A. & K. Nakayama. 1989. Selective delivery of antigens by recombinant bacteria. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **146**:35-49
- Dougan, G., Chatfield, S., Pickard, D., Bester, J., O'Callaghan, D. & D. Maskell. 1988. Construction and characterization of vaccine strains of *Salmonella* harboring mutations in two different *aro* genes. *Journal of Infectious Diseases* **158**:1329-1335
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. & F. Heffron. 1986. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**:5189-5193
- Groisman, E. A., Fields, P. I. & F. Heffron. 1990. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. In: *The Bacteria*. Vol. XI: Molecular basis of bacterial pathogenesis. B. H. Iglewski & V. L. Clark eds. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Hackett, J., Wyk, P., Reeves, P. & V. Mathan. 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella* Typhimurium by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *Journal of Infectious Diseases* **155**: 540-549
- Hoiseth, S. K., & B. A. D. Stocker. 1981. Aromatic-dependent *Salmonella* Typhimurium are non-virulent and effective as live vaccines. *Nature (London)* **291**:238-239

- Hone, D., Morona, R., Attridge, S. & J. Hackett. 1987. Construction of defined *galE* mutants of *Salmonella* for use as vaccines. *Journal of Infectious Diseases* **156**:167-174
- Jimenez-Lucho, V. E. & L. L. Leive. 1990. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide in *Salmonella* in protection against complement action. In: *The Bacteria*. Vol. XI: Molecular basis of bacterial pathogenesis. B. H. Iglewski & V. L. Clark eds. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Koo, F. C. W., Peterson, J. W., Houston, C. W. & N. C. Molina. 1984. Pathogenesis of experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infection and Immunity* **43**:93-100
- Pastan, I. & S. Adhya. 1976. Cyclic adenosine 5'-monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews* **40**:527-551
- Sanderson, K. E., & B. A. D. Stocker. 1987. *Salmonella* Typhimurium strains used in genetic analysis. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium. Cellular and Molecular biology. F. C. Neidhardt ed. i. C. American Soc. for Microb., Washington DC
- Vandenbosch, J. L., Rabert, D. K. & G. W. Jones 1987. Plasmid-associated resistance of *Salmonella* Typhimurium to complement activated by the classical pathway. *Infection and Immunity* **55**:2645-2652