



**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung des
Yersinia enterocolitica-Stammes W22703 pYV⁻
als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Innerhalb der *Enterobacteriaceae* beinhaltet die Gattung *Yersinia* derzeit drei Spezies mit einer Pathogenität für den Menschen, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica*. Bei *Y. enterocolitica* handelt es sich um den Erreger der Yersiniose, einer zoonotischen Erkrankung, die beim Menschen eine akute Enterocolitis auslösen, jedoch auch von einer mesenterialen Lymphadenitis begleitet sein kann. Die enteritische Erkrankung ist i. d. R. selbstlimitierend und heilt nach zwei Wochen aus. Die Gram-negativen, fakultativ anaeroben Kokken werden fäkal-oral übertragen oder über Nahrungsmittel aufgenommen [1]. Je nach Antigen-Variation der Zellwand-Lipopolysaccharide lassen sich mehr als 50 verschiedene Serotypen unterscheiden. Physiologische und biochemische Analysen erlauben zudem eine Differenzierung in sechs Biotypen [2, 3]. Dabei korreliert die Pathogenität der Biotypen 2 - 6 mit der Präsenz des Virulenzplasmides pYV sowie chromosomal lokalisierten Virulenzgenen [4]. Es handelt sich bei diesen Biotypen um Stämme mit geringer Pathogenität für Mensch und Maus [5]. Stämme des Biotyp 1B weisen im Genom zusätzlich eine *high pathogenicity island* (HPI) auf. Hier sind Gene angesiedelt, die für Synthese und Aufnahme des Siderophors Yersiniabactin kodieren. Infektionen mit diesem Biotyp führen zu schweren Erkrankungen und sind für Mäuse letal [6]. Die meisten Stämme des Biotyps 1A gelten als apathogen. Ihnen fehlen sowohl das Virulenzplasmid pYV als auch für die Pathogenität wichtige, chromosomal kodierte Gene [7, 8]. *Y. enterocolitica* ist gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Y. enterocolitica W22703 ist ein niedrigpathogener Stamm des Biotyp 2 und Serotyp O:9 und trägt natürlicherweise das Virulenzplasmid pYVe227 [9]. Dieses ist typisch für pathogene Yersinien und für die Etablierung einer Infektion in Mammalia-Wirten essentiell. Neben Genen, die die Adhäsion und Invasion (YadA) der Bakterien an eine Epithelzelle ermöglichen, kodiert es für ein Typ-III-Sekretionssystem (Injektisom, T3SS), für die Yop-Effektorproteine, die mithilfe des Injektisoms in die eukaryote Zelle eingebracht werden, für Translokatoren und Chaperone. Die Expression der plasmidkodierten Virulenzfaktoren ist abhängig von der Temperatur (37°C) und von der Konzentration an Ca²⁺-Ionen [9-14]. Initialer Schritt der Infektion nach einer oralen Aufnahme ist die Bindung der Bakterien an die Oberflächenrezeptoren der M-Zellen im unteren Ileum. Diese wird durch chromosomal kodierte Fimbrien und Adhäsine (*myfA*, *ail*) und durch das ebenfalls chromosomal kodierte Invasin (*inv*) ermöglicht. Die Sekretion des zytotoxischen Enterotoxins (chromosomal kodiert, *ystABC*) ist mit einer erhöhten apikalen Permeabilität der epithelialen Zellen verbunden, die zu einer erhöhten Osmolalität des Darmlumen führt und auch in der Lyse der Epithelzellen

resultieren kann. Die Passage der Yersinien durch die M-Zellen zum basolateralen Gewebe ist mit einer Zytokinausschüttung der epithelialen Zellen verbunden, wodurch Granulozyten angelockt werden. Der massive Einstrom an Granulozyten führt zu Gewebeerstörung und Abzessbildung. Des Weiteren ist die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol der M-Zellen sehr niedrig und die Temperatur liegt bei ca. 37°C , so dass die Expression der Virulenzplasmid-kodierten Gene initiiert wird. Dabei vermittelt das Oberflächenprotein YadA eine Adhärenz der Bakterien an die Granulozyten / Makrophagen, die Ausbildung des Injektisoms wird ermöglicht und die Yop-Proteine werden von den Bakterien in die Immunzellen transloziert. Dies ist mit der Verhinderung der Phagozytose durch die Makrophagen verbunden sowie dem Einfluss auf das zelluläre *signalling*, so dass die Makrophagen in Apoptose gehen. Die Bakterien können sich im Folgenden vermehren und verbreiten [3,4,12].

An einer Infektion mit *Y. enterocolitica* sind zusammenfassend sowohl chromosomal-kodierte als auch vom Virulenzplasmid kodierte Gene beteiligt. Der Verlust des Plasmides resultiert in Stämmen mit einer abgeschwächten Virulenz; eine Penetration der *Lamina propria* ist nicht möglich und damit eine Persistenz ausgeschlossen [9, 10]. So führte der Knockout einzelner plasmidkodierter Gene nach oraler Applikation zu reduzierten Kolonisierungs- und Persistenzeigenschaften dieser *Y. enterocolitica*-Stämme um bis zu 5 Größenordnungen [9, 13]. Im Mausmodell wurde für den Stamm W22703 mit pYVe227 eine LD_{50} von $10^{3,5}$ Bakterien/Maus nach intravenöser Applikation in Leber und Milz bestimmt, für den Stamm ohne Plasmid (W22703 pYV) eine $\text{LD}_{50} > 10^8$ Bakterien/Maus [9]. Die vollständige Sequenz des W22703-Genoms liegt vor. Die durchgeführten *shotgun sequencing*-Experimente lassen Rückschlüsse auf vorhandene bzw. nicht vorhandene Pathogenitätsfaktoren im Vergleich zu Stämmen anderer Biotypen zu [16]. Die HPI, welche für Yersiniabactin kodiert und kennzeichnend für den Biotyp 1B ist, ist im Chromosom des Stammes W22703 nicht vorhanden. Ebenso wenig können YstABC-homologe Enterotoxine im Proteinexpressionsmuster des Stammes W22703 pYV mithilfe einer BLAST-Analyse aufgezeigt werden. Nachgewiesen wurden Gene mit Homologien zu virulenzassoziierten Genen, wie z. B. *inv*, Autotransporter- und Typ-V-Sekretionssysteme sowie eine *pathogenicity island* (TC-PAI_{ve}) mit Genen, die für einen Toxin-Komplex kodieren, welcher mit Insektiziden in Verbindung gebracht wird. Im Genom sind ebenfalls Zwei-Komponenten-Systeme kodiert, von welchen zumindest eines an der Hämolysin-Sekretion beteiligt zu sein scheint. Hämolysin selbst liegt nicht kodiert vor. Des Weiteren wurden Peptidasen kodierende Gene identifiziert, welche an der Abwehr gegen wirtseigene antibakterielle Peptide beteiligt sein könnten [16].

Bewertung

Gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird der Stamm W22703 pYV als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet, sofern keine Gene des Virulenzplasmides bei den gentechnischen Arbeiten in die Zellen verbracht werden.

Begründung

Der *Y. enterocolitica* Stamm W22703 einschließlich des Virulenzplasmides pYV gilt als gering pathogener Stamm, der beim Menschen einen selbstlimitierenden Durchfall auslösen kann. Entscheidend für die Virulenz der Bakterien im Organismus ist die Expression der Gene des Virulenzplasmides. Fehlt das Plasmid, sind die Bakterien nicht kolonisierungsfähig, wie *in vivo*-Studien im Mausmodell belegen. Die chromosomal kodierten Virulenzfaktoren sind für eine Persistenz der Bakterien im Darm nicht ausreichend, so dass eine Kolonisierung durch den Stamm *Y. enterocolitica* W22703 pYV nicht möglich ist.

Literatur

- [1] Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 47(3):315-329.
- [2] Wauters G, Kandolo K, Janssens M (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* 9:14.
- [3] Sabina Y, Rahman A, Ray RC, Montet D (2011). *Yersinia enterocolitica*: Mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. *J Pathol* Article ID 429069.
- [4] Revell PA, Miller VL (2001). *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 205:159-164.
- [5] Howard SL, Gaunt MW, Hinds J, Witney AA, Stabler R, Wren BW (2006) Application of comparative phylogenomics to study the evolution of *Yersinia enterocolitica* and to identify genetic differences relating to pathogenicity. *J Bacteriol* 188 (10):3645-3653.
- [6] Carniel E, Guilvout I, Prentice M (1996). Characterization of large chromosomal "high-pathogenicity island" in biotype 1B *Yersinia enterocolitica*. *J Bacteriol* 178 (23):6743-6751.
- [7] Tennant SM, Grant TH, Robins-Browne RM (2005). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* Biotyp 1A. *FEMS Immunol Med Microbiol* 38:127-137.
- [8] Baghat N, Viridi JS (2007). Distribution of virulence-associated genes in *Yersinia enterocolitica* biovar 1A correlates with clonal groups and not the source of isolation. *FEMS Microbiol Lett* 266(2):177-183.
- [9] Mulder B, Michiels T, Simonet M, Sory MP, Cornelis G (1989). Identification of additional virulence determinants on the pYV plasmid of *Yersinia enterocolitica* W227. *Inf Immun* 57(8):2534-2541.
- [10] Ben-Gurion R, Shafferman A (1981). Essential virulence determinants of different *Yersinia* species are carried on a common plasmid. *Plasmid* 5:183-187.
- [11] Cornelis GR, Wolf-Watz H (1997). The *Yersinia* virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 23(5):861-867.
- [12] Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, et al. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol and Mol Biol Rev* 62 (4):1315-1352.
- [13] Truelzsch K, Sporleder T, Igwe E, Russmann H, Heesemann J (2004). Contribution of the major secreted Yops of *Yersinia enterocolitica* O:8 to the pathogenicity in the mouse infection model. *Infect Immun* 72(9):5227-5234.
- [14] Cornelis GR (2002). The *Yersinia* YSC-YOP Type III Weaponry. *Nat Rev Mol Cell Bio* 3:742-752.
- [15] Sory MP, Cornelis G (1988). *Yersinia enterocolitica* O:9 as a potential live oral carrier for protective antigens. *Microbiol Pathogen* 4:431-442.
- [16] Fuchs TM, Brandt K, Starke M, Ratter T (2011). Shotgun sequencing of *Yersinia enterocolitica* strain W22703 (biotype 2, serotype O:9): genomic evidence for oscillation between invertebrates and mammals. *BMC Genomics* 12:168.