



6790-10-67

02.11.1999

## Stellungnahme der ZKBS

### zur Einstufung von *Listeria monocytogenes*-Stämmen mit Deletionen in den Genen *prfA*, *hly*, *actA*, *actA* und *plcB*

#### I. Einführung:

*Listeria monocytogenes* ist ein Gram-positives, bewegliches, stäbchenförmiges Bakterium, das als Wildtyp beim Menschen und bei Tieren Infektionen mit zum Teil schweren Erkrankungen hervorrufen kann [1]. Der Organismus wird gemäß § 5 Abs. 2 und 6 i.V.m. Anhang I Teil B GenTSV der Risikogruppe 2 zugeordnet.

Da *L. monocytogenes* in Mäusen systemische Infektionen verursacht und in permanente intestinale Zelllinien einzudringen vermag, ist dieser Organismus zu einem besonders geeigneten Objekt für das Studium des intrazellulären Parasitismus und der Überwindung von Schutzbarrieren durch Bakterien geworden [2, 3]. Für gentechnische Arbeiten werden vielfach Mutanten von *L. monocytogenes* 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 *L. monocytogenes* sind ubiquitär vorkommende Bakterien, die aus dem Erdboden, aus Abwasser und von Pflanzen isoliert werden können. Darüber hinaus liegen diese Bakterien häufig im Intestinaltrakt von Säugetieren, Vögeln, Fischen und Krebstieren vor. Etwa 5-20% der Menschen sowie der Tiere sind gesunde intestinale Träger von *L. monocytogenes*.

Diese Organismen sind fakultativ intrazelluläre Bakterien mit der Fähigkeit, in einem breiten Temperaturbereich zwischen 1°C und 45°C zu wachsen. Die Eigenschaft der Psychrotrophie (Wachstum bei 4°C) stellt ein besonderes Problem in der Lebensmittelproduktion und -lagerung dar.

Die Listeriose, eine häufig durch Lebensmittel übertragene Infektionskrankheit, verläuft unter Immunsuppression, bei Schwangerschaft, hohem Lebensalter oder im Säuglingsalter besonders schwer [4, 5]. Typische Verlaufsformen einer Listeriose sind Meningitis, Meningoenzephalitis und Sepsis, Gastroenteritis, grippeähnliche Symptomatik und lokale Abszesse. Eine Infektion während der Schwangerschaft kann zu Tot- oder Frühgeburten bzw. auch zu einer septisch oder meningitisch verlaufenden Erkrankung des Neugeborenen führen.

Eine Exposition des Menschen gegenüber dem Erreger *L. monocytogenes* ist sehr häufig gegeben. Faktoren wie die Empfänglichkeit des Wirtes, die aufgenommene Infektionsdosis, die Azidität des Magensaftes und die Virulenz des Erregers beeinflussen die klinische Manifestation. Eine minimale Infektionsdosis ist nicht bekannt, die Inkubationszeit wird mit etwa 3 - 90 Tagen angenommen.

Epidemische und sporadische Listeriose-Erkrankungen beim Menschen treten nahezu ausschliesslich nach dem Genuß kontaminierter Lebensmittel (Milch und Milchprodukte, Salate) auf. Nosokomiale Ausbrüche auf Stationen mit Säuglingen bzw. mit immunsupprimierten Erwachsenen sind beschrieben worden. Selten sind primäre Listeriose-Herde an der Haut bei ausgeprägter beruflicher Exposition gegenüber infizierten Tieren.

*L. monocytogenes* - Bakterien gelangen durch eine spontane (Makrophagen) oder bakteriell induzierte (andere Zelltypen) Phagozytose in das Zellinnere. An diesem Prozess sind die beiden durch die Gene *inlA* und *inlB* kodierten Invasionsproteine Internalin A und B und das transmembrane Glykoprotein E-Cadherin als Wirtszellrezeptor beteiligt [2].

Die Freisetzung der aufgenommenen Listerien aus dem Phagosom erfolgt unter Einwirkung des durch das Gen *hly* kodierten Listeriolysins O, eines porenbildenden Toxins, sowie durch die Aktivität des Enzyms Phosphatidyl-Inositol-Phospholipase C (*plcA*).

*L. monocytogenes* verfügt über einen sehr effektiven Mechanismus, um sich im Zytoplasma und von Zelle zu Zelle zu bewegen. Das von *actA* kodierte Membranprotein umgibt die Bakterienzelle mit fibrillosem Aktin, das an einem Zellpol akkumuliert wird und dem Bakterium eine kometenartige intrazelluläre Fortbewegung ermöglicht [6, 7].

Die Ausbreitung von Listerien in Nachbarzellen ist von der Aktivität einer weiteren Phospholipase, der durch das Gen *plcB* kodierten Phosphatyl-Cholin-spezifischen Phospholipase C, abhängig. An dem Prozess der Freisetzung der Bakterien aus der Doppelmembranvakuole nach dem Übertritt in die Nachbarzelle ist das Listeriolysin O beteiligt.

Eine Metalloprotease (*mpl*) spielt eine Rolle bei der Prozessierung der Genprodukte der Gene *plcB* und *actA*.

Alle genannten Virulenzgene werden durch das Gen *prfA*, das für einen Regulationsfaktor kodiert, positiv reguliert.

## II. Deletionsmutantenstämme von *L. monocytogenes*

Alle hier beschriebenen *L. monocytogenes*-Mutanten sind chromosomale Deletionsmutanten, die mit Hilfe eines Suizidvektors hergestellt wurden. Der Vektor besitzt einen temperatursensitiven „origin of replication“ und ein Antibiotikaresistenzgen. Wird ein Gen mit einer Deletion in den Vektor inseriert, kann durch Anzucht ohne Antibiotika-Selektion bei 28°C durch homologe Rekombination das intakte Gen gegen das mutierte Gen ausgetauscht werden. Die stabilen, Antibiotika-sensitiven Deletionsmutanten wurden durch PCR und DNA-Sequenzierung charakterisiert.

### a) *L. monocytogenes*-Mutante mit dem defekten Gen *actA*

Das gesamte *actA*-Gen wurde deletiert, die Mutante ist daher nicht mehr in der Lage, in der eukaryoten Zelle Aktin zu akkumulieren. Die Bakterien sind daher intrazellulär unbeweglich und vermögen sich nicht mehr von Zelle zu Zelle auszubreiten. Die Virulenzabschwächung wurde durch Infektionsversuche an Mäusen dokumentiert. In den Untersuchungen von Goosens et al. [8] ergab sich an C3H-Mäusen für die Mutante eine 1000-fach erhöhte LD<sub>50</sub>. Chakraborty und Domann [9] bestimmten an BALB/c-Mäusen die LD<sub>50</sub>-Werte  $2,5 \times 10^7$  ( $\Delta actA$ ) gegenüber  $8,0 \times 10^3$  (Wildtyp).

### b.) *L. monocytogenes*-Mutante mit den defekten Genen *actA* und *plcB*

Bei dieser Doppelmutante ist neben dem Gen *actA* auch das Gen *plcB* deletiert worden. Damit kann weder in der eukaryoten Zelle Aktin akkumuliert, noch die Phosphatidyl-Cholin-spezifische Phospholipase C synthetisiert werden [6, 10]. Dies unterbindet die Erregerausbreitung von Zelle zu Zelle. *ActA*-Mutanten sind in der Lage, bei Mäusen eine Immunität gegenüber *L. monocytogenes*- Wildtyp-Infektionen zu erzeugen.

Im Mäuseinfektionsversuch an BALB/c-Mäusen betrug für die Mutante ( $\Delta actA \Delta plcB$ ) die LD<sub>50</sub>  $3,0 \times 10^7$  gegenüber  $8,0 \times 10^3$  für den Wildtyp [9].

### c.) *L. monocytogenes*-Mutante mit dem defekten Gen *prfA*

Die Mutante enthält eine Deletion im Bereich des *prfA*-Gens, dessen Genprodukt, ein DNA-bindendes Protein mit einem Molekulargewicht von 24 kD, die Aktivität der Virulenz-Gene *hly*,

*plcB*, *actA* sowie der Gene *inIA* und *inIB* und sich selbst reguliert [11]. Diese Mutante bildet weder Listeriolysin, Phospholipasen noch Internaline, kann sich nicht von Zelle zu Zelle ausbreiten [11], persistiert aber in dendritischen Zellen [12].

Die Mutante liegt in der LD<sub>50</sub> um einen Faktor von  $4 \times 10^5$  höher als der Wildtyp ( $3,0 \times 10^9$  gegenüber  $8,0 \times 10^3$ ) [9].

#### d.) *L. monocytogenes*-Mutante mit dem defekten Gen *hly*

Das Listeriolysin O-Gen *hly* wurde deletiert, die Mutante ist wegen des Defektes bei der Phagosomenlyse nicht mehr in der Lage, aus den Phagosomen zu entweichen und daher attenuiert, persistiert aber in dendritischen Zellen [12, 6]. Infektionsversuche mit BALB/c-Mäusen zeigen eine stark erhöhte LD<sub>50</sub> ( $2,0 \times 10^9$ ) gegenüber dem Wildtyp ( $8,0 \times 10^3$ ) [9].

## II. Empfehlungen der ZKBS zur Einstufung von *Listeria monocytogenes*-Stämmen mit Deletionen in den Genen *actA*, *actA* und *plcB*, *prfA* oder *hly* als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten:

*Listeria monocytogenes* -Stämme, die stabile Mutationen in den Genen *actA*, *actA* und *plcB*, *prfA* oder *hly* 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 Nukleinsäurefragmenten, die die fehlenden Funktionen ersetzen und die auch in einem Gemisch von DNA-Sequenzen (z. B. Genbanken) vorliegen können, zum Wildtyp komplementiert werden können. Eine Höherstufung der GVO 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

1. Jones D, Seeliger H (1992) The genus *Listeria*. In The Prokaryotes, 2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, Heidelberg, pp 1595-1616
2. Salyers AA, Whitt DD (1994) Bacterial Pathogenesis - A molecular approach, Chapter 15 *Listeria monocytogenes*. ASM Press, Washington, pp 182-189
3. Chakraborty T, Wehland J (1997) The host cell infected with *Listeria monocytogenes*. In: Kaufmann SHE Host response to intracellular pathogens. R.G. Landes Company, Austin, Texas, U.S.A., pp 271-290
4. Bille J, Rocourt J, Swaminathan B (1999) *Listeria*, *Erysipelothrix*, and *Kurthia*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds) Manual of Clin. Microbiology, 7<sup>th</sup> ed., ASM Press, Washington, pp 346-356
5. Schuchat A, Swaminathan B, Broome CV (1991) Epidemiology of Human Listeriosis. Clin Microb Rev 4, 169-183
6. Cossart P, Lecuit M (1998) Interaction of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. EMBO-Journal, 17, 3797-3806
7. Ireton K, Cossart P (1997) Host-pathogen interactions during entry and actin-based movement of *Listeria monocytogenes*. Annual Rev Genet 31, 113-138
8. Goossens PL, Milon G (1991) Induction of protective CD8+ T lymphocytes by an attenuated *Listeria monocytogenes actA* mutant. Int Immunol, 4, 1413-1418
9. Chakraborty T, Domann E (1999) Persönliche Mitteilung
10. Songer JG (1997) Bacterial phospholipases and their role in virulence. Trends Microbiol. 5, 156-161
11. Freitag NE, Rong L, Portnoy DA (1993) Regulation of the *prfA* transcriptional activator of *Listeria monocytogenes*: Multiple promoter elements contribute to intracellular growth and cell-to-cell spread. Infect. Immun. 61, 2537-2544

12. Guzman CA, Rohde M, Chakraborty T, Domann E, Hudel M, Wehland J, Timmis KN (1995)  
Interaction of *Listeria monocytogenes* with mouse dendritic cells. *Infect. Immun.* 63, 3665-3673