



**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von  
*Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhimurium  $\chi$ 11218  
als Spender- oder Empfängerorganismus gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

### Allgemeines

*S. enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium ist ein zur Familie der *Enterobacteriaceae* zählendes invasives Darmbakterium, das für den Menschen und verschiedene Tiere pathogen ist und gemäß § 5 Abs. 1 und 6 i. V. m. Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet wird. Wildtypstämme von *S. Typhimurium* verursachen, nach oraler Aufnahme von  $10^5$  -  $10^6$  colony forming units (CFU), 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. 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.

*S. Typhimurium* heftet sich an Darmepithelzellen an und sezerniert über Typ-III-Sekretionssysteme Effektoren, die durch die intrazelluläre Bildung von Aktinfilamenten ein Aufstülpen der Zellmembran, das sog. *membrane ruffling*, und die Aufnahme der Bakterien in die Zelle in einem Phagozytose-ähnlichen Vorgang bewirken. Nach erfolgreicher Endozytose liegen die Bakterien zum Großteil unbeweglich in der *Salmonella*-enthaltenden Vakuole (SCV), wo sie sich vermehren können, zu einem kleineren Teil aber auch frei und beweglich im Cytosol vor. Diese begeißelten Bakterien replizieren schnell, können sich frei zwischen Wirtszellen bewegen und sind daher hoch invasiv [1]. Die Infektion führt zur Apoptose der Zellen und zum Freiwerden der Bakterien ins Darmlumen, wo sie einen neuen Infektionszyklus beginnen.

Zurzeit werden verschiedene *S. Typhimurium*-Stämme entwickelt, die als attenuierte Lebendvakzine dienen sollen, da durch die intrazelluläre Vermehrung Antigene effizient eine mukosale Zell-vermittelte Immunantwort auslösen können. Einer dieser potentiellen Impfstämme ist *S. Typhimurium*  $\chi$ 11218, der sich vom hochpathogenen Wildtypstamm *S. Typhimurium* UK-1 ableitet. Dieser Stamm wurde zuerst 1991 aus Pferden isoliert und danach im Huhn passagiert [2]. *S. Typhimurium* UK-1 kann zu Todesfällen bei Mäusen, Hühnern, Kälbern, Schweinen und Pferden führen [3; 4]. Aufgrund der hohen Virulenz verspricht man sich eine starke Immunantwort der geimpften Tiere [4].

Das Genom von *S. Typhimurium*  $\chi$ 11218 enthält umfangreiche Mutationen, die den Stamm attenuieren, aber auch zum Einbringen von auf Plasmiden vorliegenden DNA-Vakzinen in tierische Zielzellen befähigen sollen. Diese Mutationen umfassen im Einzelnen:

#### $\Delta$ asdA19::araC P<sub>BAD\_c2</sub>:

Diaminopimelinsäure (DAP) ist ein unverzichtbarer Bestandteil der Zellwand von *S. Typhimurium*. Mutationen im DAP-Synthesegen *asdA* führen sowohl zum Zelltod als auch zur Lyse der Bakterienzellen [5]. Im Chromosom von *S. Typhimurium*  $\chi$ 11218 wurde *asdA* durch das Gen des Repressors C2 des Phagen P22 ersetzt, wobei *c2* vom durch Arabinose aktivierten P<sub>BAD</sub>-Promotor des *araC*-Gens aus *Escherichia coli* aktiviert wird [6].

### $\Delta P_{murA7}::araC P_{BAD} murA$ :

Eine weitere unverzichtbare Komponente der Zellwand von *S. Typhimurium* ist Muraminsäure. Der Promotor des Muraminsäuresynthesegens *murA* wurde gegen den Arabinose-induzierten  $P_{BAD}$ -Promotor aus *E. coli* ausgetauscht, so dass die Transkription von *murA* in Abhängigkeit von Arabinose erfolgt. Ist keine Arabinose verfügbar, wird das Wachstum eingestellt und die Bakterienzellen lysieren [6].

Für eine erfolgreiche Immunisierung ist es erforderlich, in *S. Typhimurium*  $\chi$ 11218 ein Plasmid einzubringen, das das Wachstum der Bakterien ermöglicht und die Lyse der Bakterien in der Wirtszelle sicherstellt. Dabei enthält das Plasmid ein Konstrukt von *murA* (aus *E. coli*, um die Rekombination von Plasmid und Bakterienchromosom zu verhindern) und *asdA* unter Kontrolle des Promotors  $araC P_{BAD}$ , das einerseits bei Anwesenheit von Arabinose die Expression der essentiellen Gene sicherstellt. Andererseits werden *asdA* und *murA* zusätzlich in 3'-/5'-Richtung vom in umgekehrter Polarität einklonierten C2-abhängigen  $P_{22} P_R$ -Promotor abgelesen, wenn bei Arabinosemangel der C2-Repressor nicht mehr exprimiert wird, gegen dessen Gen das chromosomale *asdA*-Gen ausgetauscht worden war. Dies führt dazu, dass bei Arabinosemangel *asdA* und *murA* durch *antisense*-RNA-vermitteltes *gene silencing* reprimiert werden und die Translation der noch vorhandenen mRNA verhindert wird.

### $\Delta(gmd-fcl)26$ :

Es wurde beschrieben, dass *asdA*-Mutanten Kolansäure synthetisieren, um den Verlust von DAP in der bakteriellen Peptidoglykanschicht zu kompensieren [7]. Daher wurden die GDP-Fucosesynthesegene *gmd* und *fcl* deletiert [6].

### $\Delta relA1123$ :

Die Stringente Kontrolle dient in Bakterien dazu, bei Aminosäuremangelbedingungen Replikation, Transkription und Translation zu hemmen [8]. Als Auslöser hierfür dient die Akkumulation des Signalmoleküls Guanosintetraphosphat (ppGpp), das u. a. von RelA synthetisiert wird. Die Deletion von *relA* führt dazu, dass ppGpp bei Aminosäuremangel nicht mehr akkumulieren kann und somit die Stringente Kontrolle nicht ausgelöst wird. So wird einerseits das Zellwachstum nicht gehemmt, obwohl die Zellwand fehlerhaft ausgebildet wird, so dass die Lyse der Bakterien verstärkt eintritt. Zusätzlich wird verhindert, dass die Proteinexpression und damit die Antigenexpression aufgrund des durch die Deletion von *asdA* verursachten Aspartat-semialdehydmangels reprimiert wird [6].

### $\Delta endA2311$ :

Die Deletion der periplasmatischen Endonuklease I führt dazu, dass DNA-Vakzinen nicht mehr abgebaut werden [6].

### $\Delta araBAD, \Delta araE$ :

Die Deletion der Gene *araBAD*, deren Genprodukte aus Arabinose Xylulose bilden, bewirkt, dass zum Zeitpunkt der Infektion noch in der Bakterienzelle vorhandene Arabinose weniger schnell abgebaut wird. Zusätzlich sorgt die Deletion des Arabinose-Transporters AraE dafür, dass keine Arabinose durch *leakage* aus den Bakterienzellen gelangt. Durch diese beiden Mutationen verzögert sich die Lyse der Bakterien in der Wirtszelle um ein bis zwei Zellteilungen, so dass mehr Bakterien in der Zelle vorliegen, die eine verbesserte Immunantwort auslösen können [9].

### $\Delta sifA26$ :

*sifA* kodiert für ein Typ-III-Sekretionssystem. Die Deletion von *sifA* bewirkt das Freiwerden von *S. Typhimurium* aus der SCV [10; 11], so dass die Bakterien im Cytosol statt in endosomalen Kompartimenten vorliegen. Auf diese Weise können DNA-Vakzinen nach der Lyse der Bakterien besser in den Zellkern gelangen, als wenn die Bakterien in der SCV lysieren [12].

### $\Delta tlpA181$ :

Bei TlpA handelt es sich um einen Genregulator, dessen Fähigkeit zur DNA-Bindung und DNA-abhängigen Genregulation von der Temperatur abhängt [13]. TlpA ist möglicherweise ein Virulenzfaktor von Salmonellen, da ähnliche Operatorsequenzen wie im Promotor von *tlpA* konserviert in vielen Promotoren von bekannten Virulenzfaktoren pathogener *Salmonella* sp. vorliegen und *tlpA* selbst im Virulenzplasmid vieler pathogener *Salmonella* sp. konserviert ist. Die Deletion von *tlpA* soll zu einer Verringerung der durch die Infektion ausgelösten Apoptose führen, um eine ausreichende Immunantwort sicher zu stellen [12].

### $\Delta sseL116$ :

Bei dieser Mutation handelt es sich um eine weitere Mutation, die die Auslösung der Apoptose behindern soll. *sseL* kodiert für eine Deubiquitinase, die entscheidend an der Auslösung der Apoptose der Zielzelle beteiligt ist, indem sie I $\kappa$ B $\alpha$  deubiquitiniert. Die Deubiquitinierung führt zu verminderter Aktivität des antiapoptotischen NF- $\kappa$ B-Signalwegs [14].

### $\Delta P_{hilA}::P_{trc} \Delta lacO888$ *hilA*:

Auf dem *Salmonella*-Virulenzplasmid SPI-1 liegt die Mehrzahl der Gene vor, die für den invasiven Phänotyp von *S. Typhimurium* erforderlich sind. HilA ist der Transkriptionsfaktor, der die auf SPI-1 vorliegenden Gene aktiviert. Im Genom von *S. Typhimurium*  $\chi$ 11218 wurde der Promotor von *hilA* durch einen modifizierten  $P_{trc} \Delta lacO888$ -Promotor ersetzt, der statt des *lacO*-Operators eine Zufallssequenz trägt. Dadurch wird auch bei Anwesenheit des Repressors LacI *hilA* konstitutiv exprimiert und somit der Anteil der frei beweglichen, virulenteren Bakterien außerhalb der SCV zusätzlich erhöht. Dies führt ebenso wie die Deletion von *sifA* zu einer verbesserten Verfügbarkeit von DNA-Vakzinen [12].

*Salmonella* Typhimurium  $\chi$ 11218 wurde in einer Dosis von  $1,2 \times 10^9$  CFU weiblichen BALB/c-Mäusen oral verabreicht. Zusätzliche booster-Immunisierungen erfolgten eine, vier und sieben Wochen nach Erstinfektion. Dabei überlebten alle Mäuse und zeigten keinerlei Krankheitssymptome wie Durchfall, struppiges Fell oder Reizbarkeit [12]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass der Vorgängerstamm  $\chi$ 8937 (ohne die Mutationen  $\Delta araBAD$ ,  $\Delta araE$ ,  $\Delta sifA26$ ,  $\Delta tlpA181$ ,  $\Delta sseL116$  und  $\Delta P_{hilA}::P_{trc} \Delta lacO888$  *hilA*) bei einer oralen Verabreichung von  $10^9$  CFU ebenfalls apathogen für Mäuse ist und das Lymphgewebe der Tiere nur vorübergehend kolonisiert. Nach vier Wochen können keine Bakterien mehr aus dem Gewebe isoliert werden [6].

## **Empfehlung**

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird *Salmonella* Typhimurium  $\chi$ 11218 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

## **Begründung**

Bei *Salmonella* Typhimurium  $\chi$ 11218 handelt es sich um einen gut charakterisierten Kandidaten für einen Impfstamm, dessen Apathogenität durch die Verabreichung von hohen Dosen lebensfähiger Bakterien an Mäuse gezeigt wurde.

## **Literatur**

1. **Knodler LA, Vallance BA, Celli J, Winfree S, Hansen B, Montero M, Steele-Mortimer O** (2010). Dissemination of invasive *Salmonella* via bacterial-induced extrusion of mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*. **107**(41):17733-8.

2. **Curtiss III R, Porter SB, Munson M, Tinge SA, Hassan JO** (1991). Nonrecombinant and recombinant avirulent *Salmonella* live vaccines for poultry, p. 168-198. *In: Blankenship LC, Bailey JS, Cox NA, Craven SE, Meinersmann RJ* (eds.), *Colonization control of human bacterial enteropathogens in poultry*. Academic Press, Inc., San Diego, CA.
3. **Barrow PA, Page K, Lovell MA** (2001). The virulence for gnotobiotic pigs of live attenuated vaccine strains of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis. *Vaccine*. **19**(25):3432-6.
4. **Zhang X, Kelly SM, Bollen W, Curtiss III R** (1999). Protection and immune responses induced by attenuated *Salmonella* Typhimurium UK-1 strains. *Microb Pathog*. **26**(3):121-30.
5. **Loessner H, Endmann A, Rohde M, Curtiss III R, Weiss S** (2006). Differential effect of auxotrophies on the release of macromolecules by *Salmonella enterica* vaccine strains. *FEMS Microbiol Lett*. **265**(1):81-8.
6. **Kong W, Wanda SY, Zhang X, Bollen W, Tinge SA, Roland KL, Curtiss III R** (2008). Regulated programmed lysis of recombinant *Salmonella* in host tissues to release protective antigens and confer biological containment. *Proc Natl Acad Sci USA*. **105**(27):9361-6.
7. **Curtiss III R** (1976). p. 45-56. *In: Beers RF and Bassett EG* (eds.), *Recombinant Molecules: Impact on Science and Society*. Raven, New York, NY.
8. **Cashel M, Gentry DR, Hernandez VJ, Vinella D** (1996). The stringent response, p. 1458-1496. *In: Neidhardt FC* (ed.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. 2 ed., vol. 1. American Society for Microbiology Press, Washington, DC.
9. **Ameiss K, Ashraf S, Kong W, Pekosz A, Wu WH, Milich D, Billaud JN, Curtiss III R** (2010). Delivery of woodchuck hepatitis virus-like particle presented influenza M2e by recombinant attenuated *Salmonella* displaying a delayed lysis phenotype. *Vaccine*. **28**(41):6704-13.
10. **Beuzón CR, Salcedo SP, Holden DW** (2002). Growth and killing of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *sifA* mutant strain in the cytosol of different host cell lines. *Microbiol*. **148**(9):2705-15.
11. **Brumell JH, Goosney DL, Finlay BB** (2002). SifA, a Type III Secreted Effector of *Salmonella typhimurium*, Directs *Salmonella*-Induced Filament (Sif) Formation Along Microtubules. *Traffic*. **3**(6):407-15.
12. **Kong W, Brovold M, Koeneman BA, Clark-Curtiss J, Curtiss III R** (2012). Turning self-destructing *Salmonella* into a universal DNA vaccine delivery platform. *Proc Natl Acad Sci USA*. **109**(47):19414-9.
13. **Hurme R, Berndt KD, Normark SJ, Rhen M** (1997). A proteinaceous gene regulatory thermometer in *Salmonella*. *Cell*. **90**(1):55-64.
14. **Rytkönen A, Poh J, Garmendia J, Boyle C, Thompson A, Liu M, Freemont P, Hinton JC, Holden DW** (2007). SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*. **104**(9):3502-7.