

**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von
attenuierten *Yersinia enterocolitica* E40-Stämmen
als Spender- oder Empfängerorganismen
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 sich beim Menschen in einer akuten Enterocolitis äußert, 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 Stäbchen werden fäkal-oral übertragen oder über Nahrungsmittel aufgenommen (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006).

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 (Wauters et al., 1987; Sabina et al., 2011). Bei den Biotypen 2 – 6 handelt es sich um Stämme mit geringer Pathogenität für Mensch und Maus (Howard et al., 2006). Dabei korreliert die Pathogenität dieser Biotypen mit der Präsenz des Virulenzplasmids pYV (*plasmid of Yersinia virulence*) sowie chromosomal lokalisierter Virulenzgene (Revell & Miller, 2001). Stämme des Biotyps 1B weisen im Genom zusätzlich eine *high pathogenicity island* (HPI) auf. Hier sind Gene angesiedelt, die für die Synthese und Aufnahme des Siderophors Yersiniabactin kodieren. Infektionen mit diesem Biotyp führen zu schweren Erkrankungen und sind für Mäuse letal (Carniel et al., 1996). Die meisten Stämme des Biotyps 1A gelten als apathogen. Ihnen fehlen sowohl das Virulenzplasmid pYV, als auch für die Pathogenität wichtige, chromosomal lokalisierte Gene (Tennant et al., 2003; Baghat & Viridi, 2007).

Das Plasmid pYV ist typisch für pathogene Yersinien und für die Etablierung einer Infektion in Säugetieren essenziell (Cornelis & Wolf-Watz, 1997). Neben Proteinen, die die Adhäsion und Invasion (YadA) der Bakterien an eine Epithelzelle ermöglichen, kodiert es für ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS, Injektisom), für die Yop-Effektorproteine, die mithilfe des Injektisoms in die eukaryote Zelle eingebracht werden, für Translokatoren und Chaperone sowie für eine Arsenat-Resistenz (Hacker & Kaper, 2012). Die Expression der plasmidkodierten Virulenzfaktoren ist abhängig von der Temperatur (37 °C) und von der Konzentration an Ca²⁺-Ionen (Bhaduri & Smith, 2011).

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 chromosomal kodierten, zytotoxischen Enterotoxins (*y-stABC*) führt zu einer erhöhten apikalen Permeabilität der Epithelzellen und dadurch zu einer erhöhten Osmolarität des Darmlumens, die auch in der Lyse der Epithelzellen resultieren kann. Die Passage der Yersinien durch die M-Zellen zum basolateralen Gewebe ist mit einer Zytokinausschüttung der Epithelzellen verbunden, wodurch Granulozyten rekrutiert werden. Der massive Einstrom an Granulozyten führt zu Gewebeerstörung und Abzessbildung. Des Weiteren ist die Ca²⁺-Konzentration im Zytosol der M-Zellen sehr niedrig und die Temperatur liegt bei ca. 37 °C, so dass die Expression der Virulenzplasmid-lokalisierten 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 wer-

den von den Bakterien in die Immunzellen transloziert. Auf diese Weise wird die Phagozytose durch die Makrophagen verhindert sowie das zelluläre *signalling* beeinflusst, so dass die Makrophagen in Apoptose gehen. Die Bakterien können sich im Folgenden vermehren und verbreiten (Sabina et al., 2011; Revell & Miller, 2001; Cornelis & Wolf-Watz, 1997).

An einer Infektion mit *Y. enterocolitica* sind zusammengefasst sowohl chromosomale, als auch Gene des Virulenzplasmids beteiligt. Der Verlust des Plasmids resultiert in Stämmen mit einer abgeschwächten Virulenz; eine Penetration der *Lamina propria* ist nicht möglich und damit eine Persistenz ausgeschlossen (Mulder et al., 1989; Ben-Gurion & Shafferman, 1981). *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.

Der Wildtyp-Stamm *Y. enterocolitica* E40 ist ein niedrig-pathogener Stamm des Biotyps 2 und Serotyps O:9, der natürlicherweise das Virulenzplasmid pYV trägt (Sory et al., 1995). Der Stamm W22703 ist ein biochemisch mit dem Stamm E40 identisches Isolat (Sory et al., 1995). Für ihn wurde im Mausmodell eine LD₅₀ von 10^{3,5} Bakterien/Maus nach intravenöser Applikation in Leber und Milz bestimmt, für den Stamm ohne Plasmid (W22703 pYV⁻) eine LD₅₀ > 10⁸ Bakterien/Maus (Mulder et al., 1989). Die HPI, welche für das Siderophor Yersiniabactin kodiert und kennzeichnend für den hochpathogenen Biotyp 1B ist, ist im Chromosom der Stämme W22703 und E40 nicht vorhanden. Entsprechend wurde der attenuierte *Y. enterocolitica* Stamm W22703 pYV⁻, bei dem das Virulenzplasmid entfernt wurde, von der ZKBS im Juli 2013 in die Risikogruppe 1 eingestuft (Az. 45241.0125).

Die gentechnisch veränderten *Y. enterocolitica* E40-Stämme $\Delta blaA$ (pYV40 yopO _{Δ 2-427} yopE₂₁ yopH _{Δ 1-352} yopM₂₃ yopP₂₃ yopT₁₃₅), kurz ***Y. enterocolitica* E40 $\Delta blaA$ (pYV40 $\Delta HOPEMT$)**, und $\Delta blaA \Delta asd$ (pYV40 yopO _{Δ 2-427} yopE₂₁ yopH _{Δ 1-352} yopM₂₃ yopP₂₃ yopT₁₃₅), kurz ***Y. enterocolitica* E40 $\Delta blaA \Delta asd$ (pYV40 $\Delta HOPEMT$)**, enthalten eine Deletionsvariante des Virulenzplasmids pYV: Die Gene der sechs Effektorproteine (YopH, -O, -P, -E, -M, -T), die vom T3SS in die Wirtszelle injiziert werden, wurden deletiert (Iriarte & Cornelis, 1998). Bereits die Deletion einzelner plasmidkodierter Yop-Proteine, wie YopH, -E oder -M, führt zu einer Reduktion der Kolonisierungs- und Persistenzfähigkeit eines solchen *Y. enterocolitica*-Stammes nach oraler Applikation um bis zu fünf Größenordnungen (Sory & Cornelis, 1988; Mulder et al., 1989; Grosdent et al., 2002; Trueltzsch et al., 2004; Pha et al., 2016). Stämme, in deren Plasmid mehrere Effektoren deletiert sind, werden aufgrund des Verlusts der Resistenz gegen die primäre Immunantwort des Wirtes als avirulent beschrieben (Trueltzsch et al., 2004; Pha et al., 2016). Darüber hinaus weisen beide Stämme eine chromosomale Deletion auf: Das für die Ampicillin-Resistenz verantwortliche *blaA*-Gen wurde entfernt. Die Stämme sind folglich Ampicillin-sensitiv. Im Stamm E40 $\Delta blaA \Delta asd$ (pYV40 $\Delta HOPEMT$) wurde außerdem das *asd*-Gen für die Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase entfernt. Die Bakterien können somit einen essenziellen Bestandteil ihrer Zellwand, die Diaminopimelinsäure, nicht mehr selbst herstellen. Der Stamm ist obligat auxotroph für Diaminopimelinsäure. Die Bakterien sind somit außerhalb des Labors oder in einem Wirt nicht lebensfähig. Dieser Stamm wurde durch das Bundesamt für Gesundheit der Schweiz (Meldung A010088/2 vom 14.02.2003) und laut dem Antragsteller auch in Großbritannien bereits in die Risikogruppe 1 herabgestuft.

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden die gentechnisch veränderten, attenuierten *Yersinia enterocolitica*-Stämme mit der Bezeichnung *Y. enterocolitica* E40 $\Delta blaA$ (pYV40 $\Delta HOPEMT$) und *Y. enterocolitica* E40 $\Delta blaA \Delta asd$ (pYV40 $\Delta HOPEMT$) der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

Der das Virulenzplasmid pYV enthaltende *Y. enterocolitica*-Stamm E40 gilt als gering pathogener Stamm, der beim Menschen einen selbstlimitierenden Durchfall auslösen kann. Ent-

scheidend für die Virulenz der Bakterien im Organismus ist die Expression der Gene des Virulenzplasmids. 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. Ein Gen für das Siderophor Yersiniabactin ist nicht vorhanden. In den hier zu bewertenden *Y. enterocolitica* E40-Stämmen mit der Bezeichnung *Y. enterocolitica* E40 Δ *blaA* (pYV40 Δ HOPEMT) und *Y. enterocolitica* E40 Δ *blaA* Δ *asd* (pYV40 Δ HOPEMT) sind die sechs Virulenzeffektoren des Plasmids deletiert. Des Weiteren besitzen beide Stämme kein chromosomales *blaA*-Gen mehr, welches eine Resistenz gegenüber Ampicillin verleiht. Der Stamm *Y. enterocolitica* E40 Δ *blaA* Δ *asd* (pYV40 Δ HOPEMT) besitzt weiterhin eine Mutation in einem Gen, das für die Peptidoglykansynthese essenziell ist. Er ist somit auxotroph für Diaminopimelinsäure und die Bakterien sind außerhalb des Labors oder in einem Wirt nicht lebensfähig. Insgesamt ist für diese beiden Stämme nicht von einem Risiko für Mensch, Tier und Umwelt auszugehen.

Literatur

- Bach S, Buchrieser C, Prentice M, Guiyoule A, Msadek T & Carniel E** (1999). The high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica* Ye8081 undergoes low-frequency deletion but not precise excision, suggesting recent stabilization in the genome. *Infect Immun* **67**:5091-9.
- Baghat N & Virdi 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.
- Ben-Gurion R & Shafferman A** (1981). Essential virulence determinants of different *Yersinia* species are carried on a common plasmid. *Plasmid* **5**:183-187.
- Bhaduri S & Smith JL** (2011). Virulence Plasmid (pYV)-Associated Expression of Phenotypic Virulent Determinants in Pathogenic *Yersinia* Species: A Convenient Method for Monitoring the Presence of pYV under Culture Conditions and Its Application for Isolation/Detection of *Yersinia pestis* in Food. *Journal of Pathogens*, doi:10.4061/2011/727313.
- 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.
- Cornelis GR** (2002). The *Yersinia* YSC-YOP Type III Weaponry. *Nat Rev Mol Cell Bio* **3**:742-752.
- Cornelis GR & Wolf-Watz H** (1997). The *Yersinia* Yop virulon: a bacterial system for subverting eukaryotic cells. *Mol Microbiol* **23**(5):861-867.
- Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, et al.** (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an anti-host genome. *Microbiol and Mol Biol Rev* **62**(4):1315-1352.
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A & Korkeala H** (2006). Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**(3):315-329.
- 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.
- Grosdent N, Maridonneau-Parini I, Sory MP & Cornelis GR** (2002). Role of Yops and Adhesins in Resistance of *Yersinia enterocolitica* to Phagocytosis. *Infection and Immunity* **70**(8): 4165–4176
- Hacker J & Kaper J** (2012). Pathogenicity Islands and the Evolution of Pathogenic Microbes, Vol. 1. *Springer Science & Business Media*.
- Haller JC, Carlosn S, Pederson KJ & Pierson DE** (2000). A chromosomally encoded type III secretion pathway in *Yersinia enterocolitica* is important in virulence. *Mol Microbiol* **36**:1436-46.
- 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.
- Iriarte M & Cornelis GR** (1998). YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells. *Mol Microbiol* **29**(3):915-929.
- 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.
- Pha K et al.** (2016). *Yersinia* effectors perturb host immune responses. *World J Biol Chem* **7**(1):1-13.
- Rakin A, Schubert S, Pelludat C, Brem D & Heesemann J** (1999). The high-pathogenicity island of *Yersinia*. pp. 77-90 In: Hacker J, Kaper JB (eds) Pathogenicity islands and other mobile virulence elements, American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Revell PA & Miller VL** (2001). *Yersinia* virulence: more than a plasmid. *FEMS Microbiol Lett* **205**:159-164.
- Sabina Y, Rahman A, Ray RC & Montet D** (2011). *Yersinia enterocolitica*: Mode of transmission, molecular insights of virulence, and pathogenesis of infection. *J Path Article* doi:10.4061/2011/429069.
- Sory MP, Boland A, Lambermont I & Cornelis GR** (1995). Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(26):11998-12002.
- Sory MP & Cornelis G** (1988). *Yersinia enterocolitica* O:9 as a potential live oral carrier for protective antigens. *Microbiol Pathogen* **4**:431-442.
- Tennant SM, Grant TH & Robins-Browne RM** (2003). Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**:127-137.
- 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.
- Wauters G, Kandolo K & Janssens M** (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**:14.