



Globale Genexpression von *Vibrio parahaemolyticus* bei Hitze- und Kältestress

Sara Urmersbach¹, Thomas Alter¹, Tommi Aho² and Stephan Huehn¹
1 Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Deutschland
2 Department of Signal Processing, Tampere University of Technology, Tampere, Finnland



Hintergrund

Vibrio (V.) parahaemolyticus ist ein marines Bakterium, welches ubiquitär vorkommt und human-pathogenes Potential besitzt. Regelmäßige Nachweise des Genus *Vibrio* erfolgen aus Meerwasser, Sediment und Meerestieren (z.B. Krustentiere, Muscheln). Muscheln sind hierbei in der Lage, eine bis zu 1000-fache Anreicherung der Bakterien im Vergleich zum umgebenden Meerwasser zu realisieren. Werden rohe kontaminierte oder unzureichend erhitzte Muscheln und Fischprodukte verzehrt, können *Vibrio*-Infektionen auftreten.

Die Genexpression von *V. parahaemolyticus* wird durch Umwelteinflüsse beeinflusst und verändert. So führen z.B. sich ändernde Temperaturen während Lagerung oder Hitzebehandlung zu veränderten Genexpressionsprofilen. Nicht-letale Kälte- bzw. Hitzestress können zelluläre Schutzmechanismen durch z.B. Chaperonproduktion bei Hitzestress verursachen. Diese veränderte Genexpression kann die Überlebensrate von *V. parahaemolyticus* in veränderlichen Umgebungen erhöhen.

Bei der Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln werden Kälte und Hitzebehandlungen genutzt, um die Anzahl lebensfähiger Bakterien zu reduzieren. Eine Induktion der Änderung der Genexpression überlebender Mikroorganismen kann erwartet werden. Die Genexpression von *V. parahaemolyticus* im Grenzbereich zwischen subletaler Schädigung und Temperatur-basierter Inaktivierung ist bisher nicht sehr ausführlich untersucht worden. Aufgrund dessen wurde der Einfluss der unterschiedlichen Temperaturen auf das Transkriptom im Detail analysiert.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Qualitätskontrolle wurde die Expression einiger Gene (z.B. *groES*, *cspA*) mittels qPCR bei den verschiedenen Temperaturen mit den generierten Microarray-Daten verglichen. Die \log_2FC -Werte der qPCR und Microarrays wiesen mit einem R^2 -Wert von 0.7825 (Daten nicht gezeigt) eine gute Korrelation auf.

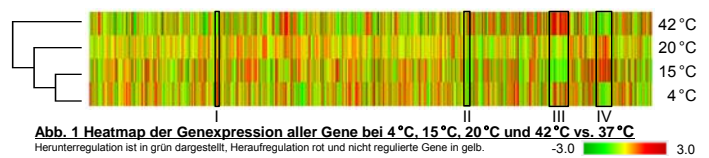


Abb. 1 Heatmap der Genexpression aller Gene bei 4°C, 15°C, 20°C und 42°C vs. 37°C. Herunterregulation ist in grün dargestellt, Heraufregulation rot und nicht regulierte Gene in gelb.

Heatmaps biologischer Replikate zeigten eine gute Reproduzierbarkeit der Experimente. Die Microarray-Signale wurden gegen das 37 °C-Set normalisiert. Heatmaps wurden generiert, um die Hybridisierungsqualität und Reproduzierbarkeit zu untersuchen (Abb. 1). Bei 4 °C und 15 °C konnte ein ähnliches Expressionsverhalten beobachtet werden, wohingegen bei 42°C ein unterschiedliches Genset exprimiert wurde. Lediglich 0.4 % der Gene waren bei 20 °C reguliert.

Nach Normalisation gegen 37°C wurde eine Clusteranalyse durchgeführt (Abb. 2). Normalisierte Genexpression bei 37°C wurde \log_2 gleichgesetzt. Die Analyse zeigte Gengruppen auf, die auf die jeweiligen Inkubationstemperaturen ähnlich reagierten und auch in den heatmaps erkennbar waren (Abb. 1). In Cluster I zeigte das Genset (n=627) Heraufregulation bei 4°C und 15°C, geringe Regulation bei 20 °C und Herunterregulation bei 42 °C. Gene des Cluster II (n=274) wiesen ein antagonistisches Verhalten auf. Alle Gene des Clusters III (n=412) wiesen erhöhte Expression bei 4 °C und 42 °C auf, sowie Herunterregulation bei 15 °C und 20 °C. Auch für Cluster III wurde ein Cluster mit antagonistischem Verhalten identifiziert, IV (n=538). Hierbei zeigten Gene Herunterregulation bei extremen Temperaturen (4°C und 42°C) und leichte Heraufregulation bei 15°C und 20°C.

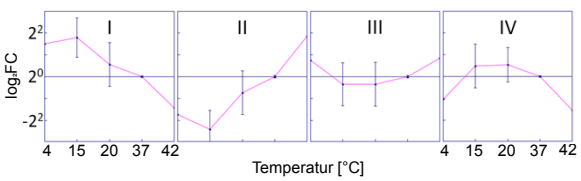


Abb. 2 Clusteranalyse aller Gene mit ähnlichem Expressionsmuster. \log_2 der x-fachen Änderung = \log_2FC

Die Volcanoplot-Analyse veranschaulicht die Verteilung aller 4820 Datenpunkte (Abb. 3). Gene mit einer mindestens $\log_2 1.5$ -fachen Änderung der Expression (bezogen auf die Expression bei 37 °C) und einem angepassten Signifikanzwert (adjusted p -value) $\leq 0,05$ sind in rot dargestellt. Unregulierte Gene wurden in blau dargestellt und von den Analysen ausgeschlossen. Insgesamt 0.4 % (n=19) der Gene bei 20 °C, 4 % (n=193) bei 4 °C, 13 % (n=625) bei 42 °C und 13.3 % (n=639) bei 15 °C wurden differentiell exprimiert.

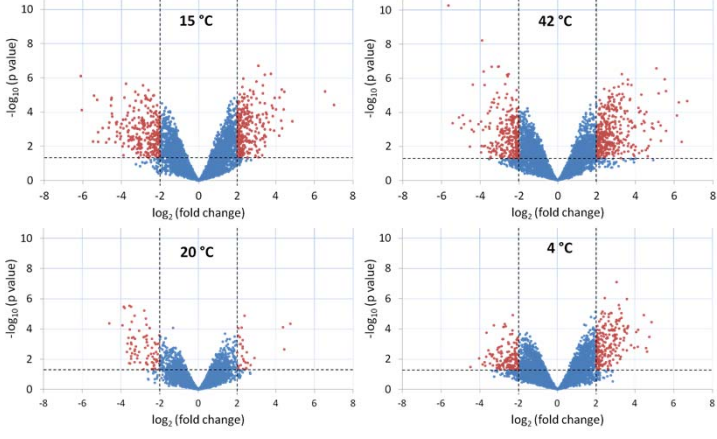


Abb. 3 Volcanoplots der normalisierten Genexpression

Material und Methoden

Inkubation und RNA-Extraktion
Kulturen des sequenzierten Stammes *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 wurden mit 10^8 bis 10^9 CFU/ml in alkalischem Peptonwasser (pH 8.6) bei 4 °C, 15 °C, 20 °C, 37 °C und 42 °C für 30 min inkubiert. Gesamt-RNA-Extraktion wurde von mindestens drei biologischen Replikaten pro Bedingung durchgeführt (peqGold Bacterial RNA Kit; Peqlab).

Qualitätskontrolle
Qualität und Integrität der RNA wurde analysiert (Agilent RNA 6000 Nano Kit, 2100 Bioanalyzer; Agilent Technologies); lediglich Proben mit einer RNA-Integritätszahl (RIN) von >9 wurden genutzt.

Labeling und Hybridisierung
Die RNA wurde mit Cy3 gelabelt und auf 8x15k *Vibrio* pan-genome-arrays (Agilent) hybridisiert.

RT-qPCR
Aliquots der RNA wurden in cDNA transkribiert (RevertAid Premium First Strand cDNA Synthesis Kit and random hexamer primer, Fermentas). In den qPCR-Versuchen wurde Sybr-Green Reaktionsmix genutzt (SsoFast Eva Green Supermix; BioRad). Zur Prozess- und Qualitätskontrolle wurde die erhaltenen \log_2FC mit den Mikroarrayergebnissen korreliert.

Datenanalyse
Software-Pakete R und Bioconductor [1] wurden zur Datenanalyse genutzt. Bibliotheken wurden mittels Limma [2] und Amap [3] erstellt. Heatmaps und Clustering wurden mittels Genesis 1.7.6 [4] realisiert. Die „Geneset enrichment analysis“ wurde mit der Web-basierten Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) [5, 6] bewerkstelligt.

Die Genexpressionsmuster wiesen bei 15 °C und 42 °C ähnliche Trends auf. Jedoch konnte antagonistische Expression in Genen der Kategorie Zellmetabolismus gezeigt werden (Abb. 4). Insgesamt waren 85 Gene bei 15 °C heraufreguliert, während diese bei 42 °C herunterreguliert waren; 13 Gene zeigten homologes Verhalten (8 Gene herunterreguliert). Beide Temperaturen, 15 °C und 42 °C, weichen um 5 °C vom natürlichen Temperaturbereich (20-37 °C) ab. Dies könnte das ähnliche Expressionsverhalten erklären. Bei 20 °C wurden Gene häufiger herunterreguliert, wohingegen bei 4 °C mehr Gene heraufreguliert waren.

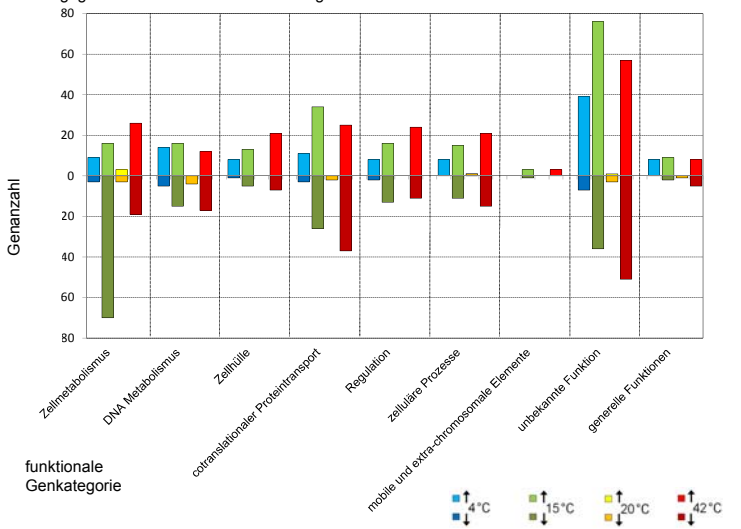


Abb. 4 signifikante, normalisierte Genexpression

Die Analyse der differentiellen Genexpression (Abb. 4) zeigte gerade bei 15°C und 42°C eine Regulation einer Vielzahl von Genen. Speziell Gene die als „unbekannte Funktion“ klassifiziert wurden zeigten starke Regulation. Weiterhin waren Gene der Kategorien „zelluläre Prozesse“, „cotranslationaler Proteintransport“ und „Zellmetabolismus“ häufig reguliert. Von den 85 antagonistisch regulierten Genes war bei 15°C ca. die Hälfte (n=49) herauf- bzw. herabreguliert (n=36). Ca. 62 % (n=9) der Gene mit homologem Verhalten waren herunterreguliert.

Bei Umgebungstemperaturen (20 °C und 37 °C) wurden lediglich 0.4 % aller Gene des Stammes mit signifikanter Expression detektiert.

Die Mustererkennung gemeinsam regulierter Gensets via DAVID ermöglichte die Identifikation von simultan exprimierten Sets und damit speziell, der Temperatur entsprechenden, biologischen Prozessen. Bei 15 °C waren 259 Gene in 26 Gruppen simultan reguliert. Zwei Hauptgruppen bildeten die wichtigsten Cluster: integrale sowie intrinsische Membrankomponenten mit jeweils 41 (11.2 %) Genen. Von den restlichen DAVID-Kategorien waren 21 Gruppen entweder mit Metabolismus, Transport, Transporteraktivität oder deren Komponenten verknüpft. Bei 42 °C wurden 383 Gene in 58 Kategorien simultan reguliert. Viele der regulierten Kategorien waren mit dem Zellmetabolismus, z.B. Kohlenhydratstoffwechsel, PTS, Peptidstoffwechsel oder der Zellbewegung, wie etwa der Flagellumbildung und -erhaltung verknüpft.

Conclusio

Die Analyse der globalen Genexpression von *Vibrio parahaemolyticus* RIMD 2210633 zeigte deutliche Unterschiede in der Temperatur-abhängigen Genregulation.

Bei 20 °C wiesen bezogen auf die Genregulation bei 37°C lediglich 0.4 % der Gene eine signifikante Expressionsänderung auf, wobei mehr Gene herunterreguliert waren. Im Gegensatz dazu zeigten bei 4 °C 4 % der Genes signifikante Expression.

Bei 42 °C und 15 °C wurden 13 % bzw. 13.3 % der Gene differentiell exprimiert (auf 37 °C bezogen). Hier wurden Gene der Kategorien „zelluläre Prozesse“, „cotranslationaler Proteintransport“ und „Zellmetabolismus“ häufig reguliert. Im Vergleich von 15 °C und 42 °C wurden 85 Gene antagonistisch reguliert. 26 Gene zeigten homologe Expression, wobei 69 % heraufreguliert wurden.

Die web-basierte „Geneset enrichment Analysis“ (DAVID) identifizierte bei 15 °C zwei Hauptgruppen mit jeweils 41 Genen (integrale sowie intrinsische Membrankomponenten) wohingegen bei 42 °C hauptsächlich metabolische Kategorien exprimiert wurden.

Teile des Projektes wurden durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) im Rahmen des VibrioNet gefördert.

