

# Veränderung der Genexpression als Hitzeschockantwort bei *Campylobacter jejuni*, *coli* und *lari*

Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin  
 Carolin Riedel, Greta Gölz, Thomas Alter

## Einleitung

*Campylobacter* (*C.*) spp. treten in Deutschland, sowie in anderen europäischen Ländern, als häufigste bakterielle Erreger für lebensmittelassoziierte Durchfallerkrankungen beim Menschen auf. Dabei wird *C. jejuni* vornehmlich in Geflügel und Geflügelfleisch und *C. coli* in Schweinen und Schweinefleisch detektiert. *C. lari* wird meist aus Gewässern, Muscheln, Vögeln und Fischen isoliert. Im Allgemeinen liegt die Wachstumstemperatur von *Campylobacter* spp. zwischen 30°C und 47°C, mit einem Optimum von ca. 37°C - 42°C. Das Ziel dieser Studie war, die Antwort von *C. jejuni*, *coli* und *lari* bei 37°C, 42°C, 46°C und 50°C darzustellen. Dafür wurden zunächst die Überlebensraten ausgewählter Isolate bei diesen Temperaturen untersucht. Es wurden Genexpressionsstudien durchgeführt, die auf Grundlage bereits veröffentlichter Daten über die Hitzeschockantwort von *C. jejuni* konzipiert wurden.

## Material und Methoden

### Verwendete Stämme

Für die phänotypischen Studien wurden 9 *Campylobacter*-Isolate verschiedener Herkunft verwendet. Um Primer für die Genexpressionsstudien designen zu können, wurde für jede Spezies auch ein sequenziertes Isolat (Referenzstamm) untersucht. (Tab. 1).

Tab. 1: Verwendete *Campylobacter*-Isolate und deren Herkunft. Sequenzierte Isolate sind in grün dargestellt

Isolat	Quelle	Isolat	Quelle	Isolat	Quelle
<i>C. jejuni</i> 252	Legehennen	<i>C. coli</i> 250	Legehennen	<i>C. lari</i> 494	Miesmuscheln
<i>C. jejuni</i> 292	Muschel	<i>C. coli</i> 651	Schwein	<i>C. lari</i> 496	Miesmuscheln
<i>C. jejuni</i> NCTC11168	Human	<i>C. coli</i> RM2228	Hühnerkarkasse	<i>C. lari</i> RM2100	Human

### Phänotypische Untersuchungen

Kolonien der Isolate wurden von Müller-Hinton-Blut-Agar (MHA)-Platten (Oxoid, Deutschland, Wesel) in 10 ml Brucella Bouillon (BD, Frankreich, Le Pont-de-Claix) überführt und für 11-16 h bei 37°C microaerob inkubiert. Die Vorkulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,01 (ca. 10<sup>8</sup> KBE/ml) eingestellt. Diese wurden anschließend bei 37°C, 42°C, 46°C und 50°C im Wasserbad für 24 h inkubiert und in unterschiedlichen Zeitabständen die Zellzahl bestimmt. Hierfür wurden 1:10 Verdünnungen hergestellt, als technische Duplikate auf MHA ausplattiert und für 48 h bei 37°C microaerob bebrütet. Die Zellzahlen wurden auf den jeweiligen 0 h-Wert normalisiert.

### RNA-Isolierung und quantitative Real-Time PCR (RT-qPCR)

Eine 4 ml Vorkultur, mit Koloniematerial von MHA-Platten (Oxoid) inokuliert, wurde für 11-16 h in Brucella Bouillon bei 37°C microaerob inkubiert. Aus dieser wurde eine weitere Flüssigkultur angesetzt, die über Nacht microaerob bei 37°C bebrütet wurde, bis eine OD von 0,1 bis 0,2 erreicht war. Anschließend wurden die Proben bei 42°C, 46°C und 50°C für 30 min im Wasserbad dem Hitzestress ausgesetzt, während eine 37°C -Kontrolle mitgeführt wurde. Die RNA-Isolation wurde mit dem peqGold Bacterial RNA Kit (Peqlab, Deutschland, Erlangen) und die sich anschließende cDNA-Synthese mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Deutschland, St. Leon-Rot.) nach Anleitung der Hersteller durchgeführt. Für die RT-qPCR wurde der Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Deutschland, München) und die von Froeb-Borgwardt (2009) beschriebenen Primer für *C. jejuni* verwendet. Das Design der Primer für *C. coli* und *lari* wurden mithilfe der DNASTAR- Software (Lasergene) durchgeführt. Die RNA-Extraktionen wurden im biologischen Triplicat durchgeführt und die anschließende RT-qPCR im technischen Duplikat. Die quantitative Expressionsanalyse wurde mit der CFX Manager Software (BioRad) durchgeführt. Die Genexpression wurde auf die Haushaltsgene *thiC* und *rpoA* normalisiert.

## Ergebnisse

### Phänotypische Untersuchungen

Über einen Zeitraum von 8 h wurde die phänotypische Stressantwort bei 46°C bei 9 *Campylobacter*-Isolaten untersucht (Abb. 1). Die *C. lari*-Stämme zeigen eine stärkere Reduktion als die *C. jejuni*-Stämme. Die Isolate von *C. coli* zeigen untereinander signifikante Unterschiede in ihren Überlebensraten. Ihre Kurvenverläufe zeigen sowohl mit den *C. jejuni*-Isolaten als auch den *C. lari*-Isolaten Ähnlichkeiten. Innerhalb einer Spezies zeigen sich Unterschiede in der Hitzetoleranz.

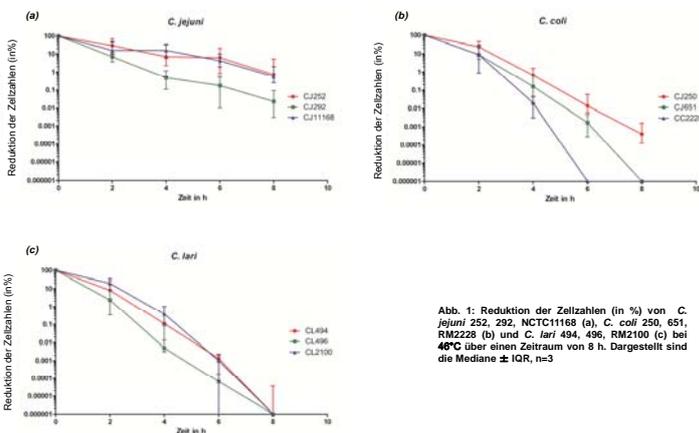


Abb. 1: Reduktion der Zellzahlen (in %) von *C. jejuni* 252, 292, NCTC11168 (a), *C. coli* 250, 651, RM2228 (b) und *C. lari* 494, 496, RM2100 (c) bei 46°C über einen Zeitraum von 8 h. Dargestellt sind die Mediane  $\pm$  IQR, n=3

Die Wachstumskurven bei 37°C sind bei den drei Isolaten (*C. jejuni* NCTC11168, *C. coli* RM2228 und *C. lari* RM2100) nahezu identisch und zeigen einen Anstieg der Zellzahl (Abb. 2a). Während *C. lari* bei 42°C gegenüber 37°C ein leicht verstärktes Wachstum zeigt, sind bei *C. jejuni* und *C. coli* keine signifikanten Unterschiede festzustellen (Abb. 2b).

Bei einer Temperaturerhöhung auf 46°C konnten bei *C. coli* und *C. lari* nach 8 h keine Zellen mehr detektiert werden, wobei die Kurve von *C. coli* steiler abfällt. Die Überlebensrate von *C. jejuni* ist signifikant höher als bei den anderen beiden Isolaten (Abb. 2c).

Bei 50°C waren bei *C. coli* nach 4 h keine Zellen mehr nachweisbar. Bei *C. jejuni* und *C. lari* tritt eine vollständige Reduktion der Zellzahl erst nach 6 h ein, wobei *C. jejuni* diesen Wert mit einem flacheren Kurvenverlauf erreicht als *C. lari* (Abb. 2d).

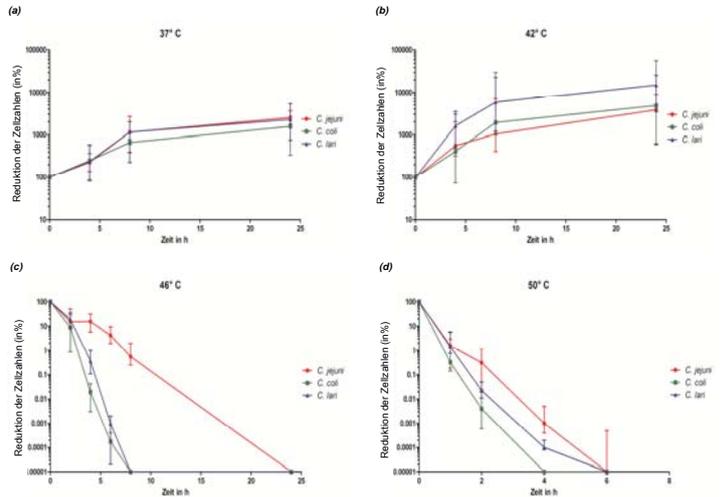


Abb. 2: Reduktion der Zellzahlen (in %) von *C. jejuni* NCTC11168, *C. coli* RM2228 und *C. lari* RM2100 bei 37°C (a), 42°C (b), 46°C (c) und 50°C (d) über einen Zeitraum von 24 bzw. 8 h. Dargestellt sind die Mediane  $\pm$  IQR, n=3

### Genexpressionsanalysen

Die Hitzeschockgene *clpB*, *dnaJ*, *dnaK*, *groEL*, *groES* und *grpE* wurden hinsichtlich ihrer Expression bei verschiedenen Temperaturen untersucht (Abb. 3 a-c).

Bei 42°C zeigen die untersuchten Gene bei *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* eine erhöhte Transkriptmenge und folglich eine Beteiligung an der Hitzeschockantwort. Die unterschiedlichen Expressionsraten der einzelnen Gene führen zu einem Expressionsmuster, welches bei *C. jejuni* und *C. coli* gleichförmig auftritt. Dieses ist bei *C. lari* nicht zu erkennen (Abb. 3a).

Auch bei 46°C bleiben die Expressionsraten der Hitzeschockgene bei *C. jejuni* und *C. coli* relativ zueinander konstant. Bei *C. lari* sind die Expressionsraten so gering, dass eine Beteiligung der Gene an der Hitzeschockantwort unwahrscheinlich ist (Abb. 3b).

Die Hochregulation der untersuchten Gene ist bei 50°C bei *C. jejuni* deutlich reduziert, sodass nur noch 3 von 6 Genen eine zweifach höhere Expression als die Kontrolle zeigen. Bei *C. coli* sind 4 der 6 Gene weiterhin hoch reguliert. Bei *C. lari* ist keine Induktion der Expression der Hitzeschockgene messbar. Da die Stabilität der Haushaltsgene *rpoA* und *thiC* bei 50°C nicht mehr gegeben war, ist die Validität der Ergebnisse allerdings nicht gesichert (Abb. 3c).

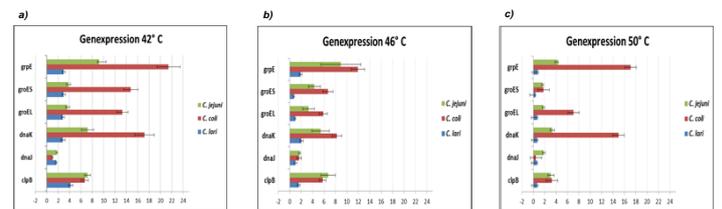


Abb. 3: Relative Quantifizierung von 6 ausgewählten Hitzeschockgenen bei *C. jejuni* NCTC 11168, *C. coli* RM2228, und *C. lari* RM2100 mittels RT-qPCR bei einer Temperaturerhöhung von 37°C auf 42°C, 46°C und 50°C

## Diskussion

Die Isolate der Spezies *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* zeigen Unterschiede in der Fähigkeit sich an Temperaturänderungen zu adaptieren. Isolate von *C. jejuni* zeigen die größte Hitzetoleranz. *C. coli* und *C. lari* weisen eine stärkere Reduktion ihrer Zellzahlen bei erhöhten Temperaturen auf. Die Isolate einer Spezies zeigen untereinander deutliche Unterschiede in ihrer Hitzetoleranz. Die Ergebnisse der Genexpressionsstudien, welche lediglich den Daten der Referenzstämmen zugrunde liegen, sind daher nicht repräsentativ für die gesamte Spezies.

Bei dem Vergleich zwischen Überlebensraten und Genexpression fällt auf, dass keine enge Korrelation besteht. So zeigen die drei Spezies bei 42°C ein phänotypisch ähnliches Verhalten, unterscheiden sich aber in der Expression der analysierten Gene. Bei 46°C weist *C. jejuni* deutlich höhere Überlebensraten als die anderen beiden Isolate auf. Die Kurvenverläufe von *C. coli* und *C. lari* sind bei dieser Temperatur nahezu deckungsgleich, während die untersuchten Hitzeschockgene bei *C. lari* eine wesentlich geringere Expression zeigen. Folglich müssten bei *C. lari* andere Gene die Adaption an Temperaturstress leisten.

Die erhöhte Expression der Hitzeschockgene bei *C. jejuni* und *C. coli* deuten darauf hin, dass die untersuchten Gene Teil der Hitzeschockantwort sind. Damit konnte die Beteiligung dieser Gene an der Hitzeschockantwort bei *C. coli* erstmals nachgewiesen werden. Die Unterschiede zur phänotypischen Stressantwort könnten damit erklärt werden, dass neben den untersuchten Genen noch andere Gene bei einer Temperaturerhöhung induziert werden.

### Literatur

Froeb-Borgwardt, Genexpressionsanalysen zum Studium der Hitzeschockantwort von *Campylobacter jejuni* auf einen milden Temperaturstress. Dissertation 2009

