

GENEXPRESSION VON *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* IN DER FRÜHEN STATIONÄREN PHASE

Lu Meng¹, Thomas Alter¹, Tommi Aho², Stephan Huehn¹

¹ Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Königsweg 69, 14163 Berlin, Deutschland;
² Fakultät für Chemie und Bioingenieurwissenschaften, Technische Universität Tampere, Tampere, Finnland

Hintergrund

Vibrio (V.) parahaemolyticus ist ein aquatisches und ubiquitäres potentiell pathogenes Bakterium. Ein Nachweis dieser Spezies gelingt kontinuierlich aus aquatischen Proben (z. B. Meerwasser, Sediment) sowie rohen oder nicht ausreichend gegarten Lebensmitteln (z. B. Shrimps, Muscheln). Der Verzehr dieser Meeresfrüchte kann bei Kontamination zu *Vibrio*-Infektionen führen. In der Umwelt und in Lebensmitteln werden *V. parahaemolyticus*-Zellen üblicherweise in den Übergang in die stationäre Phase gedrängt, da diese das Überleben in der Umwelt sicherstellt. Wenn sich Bakterien in der stationären Phase befinden, treten physiologische Veränderungen auf, die zu einer höheren Stressresistenz führen können, welche physikalische und chemische Stressoren einschließen, die während der Prozessierung von Lebensmitteln einwirken. Der Eintritt in die stationäre Phase geht mit massiven Änderungen des bakteriellen Metabolismus einher. Bisher ist die globale Genexpression von *V. parahaemolyticus* in der frühen stationären Phase nicht beschrieben worden.

Material und Methoden

Bakterienstamm und Kulturbedingungen

Vibrio parahaemolyticus RIMD 2210633 wurde als Modellorganismus genutzt. Eine Einzelkolonie wurde von Thiosulfat-Zitrat-Gallensalz-Sucrose- (TCBS) Agar in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das mit ca. 25 ml alkalischem Peptonwasser (APW) gefüllt war. Die Kulturen wurden bei 37 °C unter konstantem Schütteln (200 rpm) für 7 h inkubiert, bis sie sich in der stationären Phase befanden.

Inkubation und RNA-Extraktion

Kulturen mit 10⁸ bis 10⁹ CFU/ml des vollständig sequenzierten *V. parahaemolyticus*-Stammes RIMD 2210633 wurden unter aeroben Bedingungen bei 4 °C, 15 °C, 20 °C, 37 °C und 42 °C für 30 min inkubiert und anschließend die gesamt-RNA isoliert (peqGold Bacterial RNA Kit; Peqlab, Erlangen, Deutschland). Es wurden mindestens 3 biologische Replikate je Bedingung analysiert.

Qualitätskontrolle

Die RNA-Proben wurden mittels Agilent RNA 6000 Nano Kit im 2100 Bioanalyzer überprüft (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) und nur weiterverwendet, wenn der RNA-Integritätswert >9 betrug.

Labeling, Hybridisierung und Generierung der Signale

Die RNA-Proben wurden mit Cy3 gelabelt und auf 8x15k *Vibrio* Pangenom-Arrays (Agilent) hybridisiert.

RT-qPCR

Aliquots der RNA-Proben wurden in cDNA umgeschrieben (RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthesis Kit mit random hexamer Primern; Fermentas) und für RT-qPCR Sybr-Green Assays (SsoFast Eva Green Supermix; BioRad, Hercules, USA) verwendet. Die resultierenden log₂ FC dienen zur Qualitätskontrolle mittels Korrelation mit den Microarray-Ergebnissen.

Datenanalyse

Für die Datenanalyse wurden R und Bioconductor [1] genutzt. Die Bibliotheken wurden mit Limma [2] und Amap [3] erstellt. Die Genset-Anreicherungsanalysen wurden mittels der Internet-basierten Datenbank für Annotierung, Visualisierung und integrierter Genermittlung (DAVID) [4,5] erstellt.

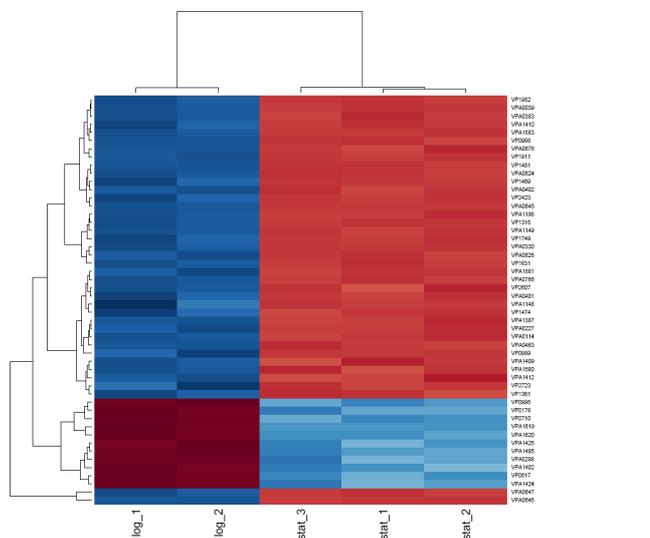


Abb.1 Heatmap 2D-Cluster der Top 50 Gene der logarithmischen und stationären Phasen

Expressionsintensitäten wurden nach Z-Wert normalisiert. Induzierte Gene werden in rot dargestellt, wohingegen blau unterreprimierte Gene hinweist.

Literatur:
 [1] Gentleman RC, Carey VJ, Bates BM, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biology*, vol. 5, article number R80, 2004. [2] Smyth G. K. Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*. R. Gentleman, V. Carey, S. DuBois, R. Izzi, W. Huber (eds), Springer, New York, pages 397(420), 2005. [3] Antoine Lucas, amap: Another Multidimensional Analysis Package, R package version 0.8-7. <http://CRAN.R-project.org/package=amap>, 2011. [4] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nature Protoc.*, vol. 4(11), pp. 44-57, 2009. [5] Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.*, vol. 37(11), pp. 1-13, 2009.

Ergebnisse

Zur Qualitätssicherung wurde die Expression ausgewählter Gene (z.B. *groES*, *groEL*, *cspA*) mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) bestimmt. Die Microarray-Ergebnisse wiesen im Vergleich zur qPCR einen R² Wert von 0,961 auf (Daten nicht gezeigt). Dieser zeigt an, wie gut die Korrelation der Daten ist, und stellt sicher, dass aussagekräftige Daten vorliegen. Die Vergleiche der Hybridisierungen einer Temperatur wurden mittels Heatmaps auf Reproduzierbarkeit geprüft (Abb. 1). Alle Temperaturen wurden auf 37 °C normalisiert. Herunterregulation wird hierbei in blau angezeigt, Heraufregulation hingegen in rot.

Die Expressionsprofile der Bakterienpopulationen in log- und stationärer Phase wurden verglichen. Unter den 4820 untersuchten Genen waren 172 Gene signifikant heraufreguliert, wohingegen 61 Gene signifikant reprimiert (adjusted *P*-value < 0,05) waren. Das Expressionsverhalten der beiden Chromosomen war leicht unterschiedlich. Im Vergleich zur log-Phase waren 22% (n = 68) der Gene auf dem Chromosom 1 signifikant heraufreguliert, wohingegen 19% (n = 34) eine Herunterregulation zeigten. Auf dem Chromosom 2 zeigten 34% (n = 104) der Gene eine mindestens vierfache Heraufregulation, wohingegen 15% (n = 27) herunterreguliert waren. Insgesamt zeigten Gene 17 funktioneller Kategorien Expressionsänderungen (Abb. 2).

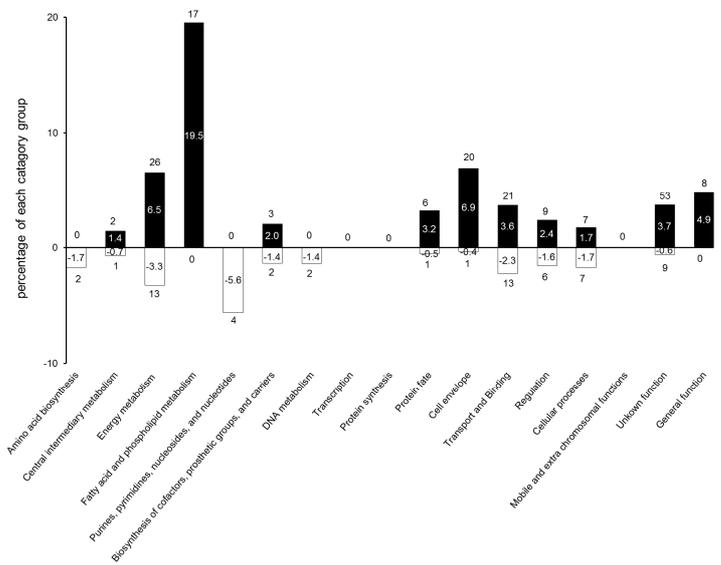


Abb.2 Funktionale, differentielle Genexpression (p-value < 0,05)

Der Fettsäure- (FS) und Phospholipidstoffwechsel (PL) wies mit 19,5% die höchste Induktion auf. Neun der 17 induzierten Gene konnten dem FS bzw. PL-Abbau zugeordnet werden. Das *fadR* Gen funktioniert als Repressor, vornehmlich der β -Oxidation. Da das Operon während des Eintritts in die stationäre Phase jedoch nicht induziert war, wurde angenommen, dass andere Gene die Versorgung mit Metaboliten, z.B. Acetyl-CoA sicherstellen. Vermutliche Enzyme der β -Oxidation mit induzierter Expression konnten detektiert werden: VPA0616, VPA0622, VPA0623, VPA0624, VPA1119, VPA1120, VPA1121, VPA1127 sowie VPA1152.

Der Energiestoffwechsel wies 26 induzierte Gene auf. Beispielsweise waren *mmsA* und *mmsB*, die für eine Methylmalonat-semialdehyddehydrogenase und eine 3-Hydroxyisobutyratehydrogenase codieren, induziert. Hierbei wird über die Degradierung von Isoleuzin und Valin Propionyl-CoA gebildet, welches als wichtiger Metabolit dient.

Weiterhin sind viele der Gene (n = 53), die eine Induktion der Expression zeigten, bis dato in Ihrer Funktion noch unbekannt.

Diskussion

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zur exponentiellen Phase 172 Gene in der frühen stationären Phase induziert waren, wohingegen 61 Gene herunterreguliert waren. Drei funktionelle Kategorien zeigten unveränderte Genexpression. In 10 funktionellen Kategorien überwog die Induktion von Genen gegenüber der Herunterregulation. Die globale Regulation des Überganges in die stationäre Phase wurde über die Aktivierung von *rpoS* realisiert. Die so adaptierten Bakterien sind üblicherweise schwieriger zu inaktivieren, was in höheren Überlebensraten in Lebensmitteln resultieren könnte.

Obwohl Gene, die mit dem endogenen Metabolismus assoziiert waren, herunterreguliert wurden, konnte massive Induktion in der frühen stationären Phase detektiert werden, was darauf hinweist, dass das exprimierte Genset von *V. parahaemolyticus* für das Überleben in der Umwelt und in Lebensmitteln elementar ist.

Das Projekt wurde im Rahmen des VibrioNet durchgeführt, welches mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 01K1015A gefördert wurde.

