

Hintergrund

Zahlreiche Bakterien regulieren über Quorum sensing (zell-dichte-abhängige Kommunikation) physiologische Prozesse wie z. B. Wachstum, Überleben und die Produktion von Virulenzfaktoren. Die Regulation dieser Prozesse erfolgt über das interspezies-spezifische Signalmolekül Autoinducer 2 (AI-2). AI-2 ist ein Nebenprodukt, dass durch LuxS während des Methioninzyklus produziert wird. Die Rolle von AI-2 vermitteltem Quorum sensing bei *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Verschiedene Studien von *C. jejuni luxS*-Mutanten zeigten unterschiedliche Resultate. Außerdem wurde bei den meisten Studien die *luxS*-Mutation nicht komplementiert. Die teilweise widersprüchlichen Resultate könnten aufgrund von unterschiedlichen Versuchsbedingungen, Mutationsarten oder auch aufgrund der Stammdiversität zustande kommen. Wir untersuchten den Einfluss des Stammes, der Mutationsstrategie und Kulturbedingungen auf das Wachstum und die Motilität von *C. jejuni luxS*-Mutanten. Zudem komplementierten wir jeden Versuch mit synthetischen AI-2 und/oder Homocystein.

Material und Methoden

Bakterienstämme

Die *C. jejuni* Stämme wurden bei 37 °C und 42 °C in Brucella-Bouillon (BB) oder auf Mueller-Hinton-Blut-Agar-Platten mikroaerob inkubiert. Die Deletionsmutante ($\Delta luxS$) von *C. jejuni* NCTC 11168 wurde von N. Corcionivoschi (University College Dublin, Ireland), die $\Delta luxS$ von *C. jejuni* 81-176 von Y. He (U.S. Department of Agriculture, USA) und die Insertionsmutante ($::luxS$) von *C. jejuni* 81-176 von B. Quinones (U.S. Department of Agriculture, USA) zur Verfügung gestellt.

Wachstum von *C. jejuni*

Für die Wachstumsversuche wurden die Kulturen auf ca. 2×10^5 KBE/ml eingestellt und mikroaerob bei 37 °C oder 42 °C für 48 h inkubiert und die Zellzahl über serielle Verdünnungsreihen bestimmt. Die Kulturen wurden mit synthetischem AI-2 (OMM Scientific), Homocystein (HC; Sigma Aldrich) oder beidem in Kombination (jeweils 10 μ M) komplementiert.

Schwärmverhalten

Da *luxS*-Mutanten z. T. eine verringerte Motilität aufweisen, wurde das Schwärmverhalten auf Schwärmplatten (0,4 % Agar) aus BB-Agar (BBA) und Mueller-Hinton-Agar (MHA) bei 37 °C und 42 °C untersucht. Für die Komplementationen wurden synthetisches AI-2, HC oder AI-2+HC (jeweils 10 μ M) in den BBA eingegossen. 1 μ l Kultur (ca. 10^5 KBE) wurde auf BBA bzw. MHA pipettiert und nach 24 h die Durchmesser der Schwärmringe ermittelt. Die Schwärmringe der *luxS*-Mutanten wurde auf den Wildtyp (wt) normalisiert (100 %).

Ergebnisse

Wachstumsversuche

Die Zellzahl der $\Delta luxS$ -Mutante von *C. jejuni* 11168 war in der mittleren exponentiellen (8 h) und mittleren stationären Phase (32 h) im Vergleich zum wt bei beiden Temperaturen signifikant verringert (Abb. 1 A-B). Dahingegen zeigte sich bei den beiden *C. jejuni* 81-176 *luxS*-Mutanten im Vergleich zum wt lediglich eine leichte Verringerung der Zellzahlen (Abb.1 C-F).

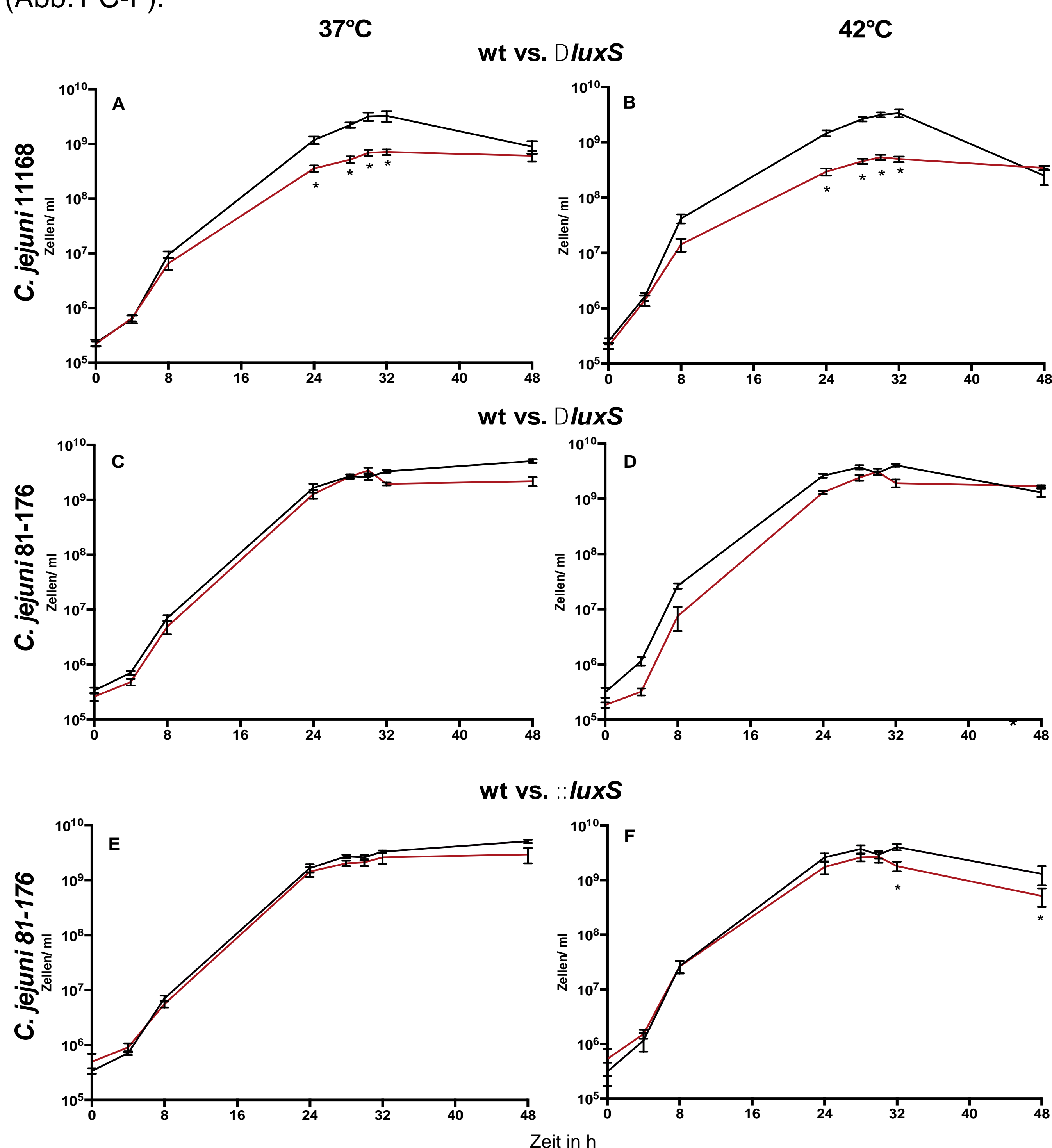


Abb. 1: Wachstumskurven von *C. jejuni* 11168 und *C. jejuni* 81-176 wt und Mutanten bei 37 °C und 42 °C: A-B) *C. jejuni* 11168 wt/ $\Delta luxS$, C-D) *C. jejuni* 81-176 wt/ $\Delta luxS$, E-F) *C. jejuni* 81-176 wt/ $::luxS$. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD (n=3); Wildtyp (schwarz), *luxS* Mutante (rot), -p<0.05 (Mann-Whitney-U Test)

Abb. 2 zeigt die Wachstumskurven von *C. jejuni* 11168 $\Delta luxS$ mit der Zugabe von AI-2 und AI-2+HC. Die Komplementierung mit AI-2 und AI-2+HC erhöhte signifikant die Zellzahl der $\Delta luxS$ -Mutante in der stationären Phase im Vergleich zur unkomplementierten $\Delta luxS$ -Mutante (Abb. 2), wohingegen HC alleine keinerlei signifikanten Effekt auf die Zellzahlen bei diesen Temperaturen zeigte (Daten nicht gezeigt). Durch keine dieser Komplementationen konnte die Zellzahl auf das wt-Niveau angehoben werden.

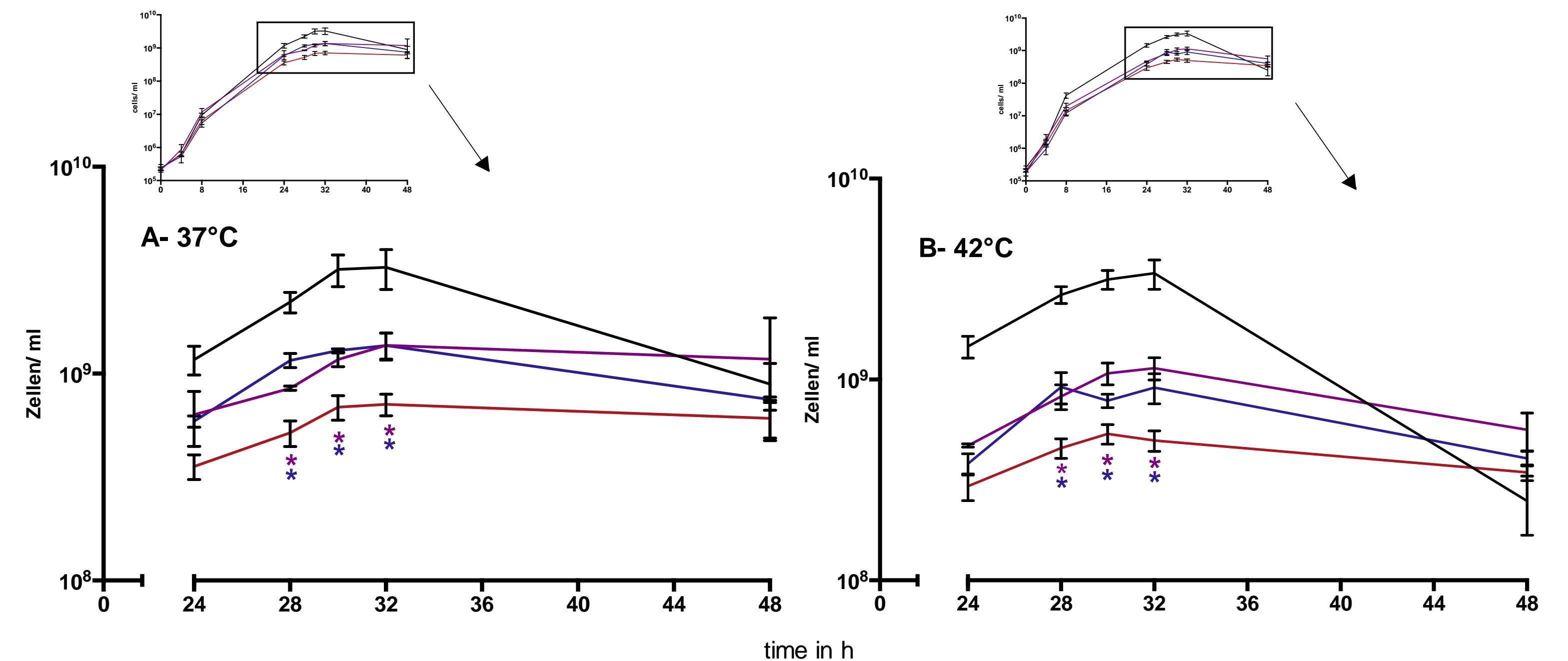


Abb. 2: Wachstumskurve von chemisch komplementiertem *C. jejuni* 11168 $\Delta luxS$: A- 37 °C, B- 42 °C. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD (n=5). Wildtyp (schwarz), $\Delta luxS$ (rot), $\Delta luxS$ +AI-2 (lila), $\Delta luxS$ + AI-2+HC (blau), -- p<0.05 im Vergleich zu $\Delta luxS$ (Mann-Whitney-U Test)

Schwärmverhalten

C. jejuni 11168 $\Delta luxS$ und *C. jejuni* 81-176: $::luxS$ zeigten im Vergleich zum entsprechenden wt bei 37 °C und 42 °C ein signifikant vermindertes Schwärmen (Abb. 3). Die Komplementation mit AI-2 zeigt nur bei *C. jejuni* 11168 $\Delta luxS$ (37 °C) eine Erhöhung der Schwärmfähigkeit im Vergleich zum wt. Die Zugabe von AI-2+HC erhöhte die Schwärmfähigkeit von *C. jejuni* 81-176: $::luxS$ bei 37 °C. Das Schwärmverhalten von *C. jejuni* 81-176 $\Delta luxS$ war bei keiner dieser Bedingungen signifikant verändert.

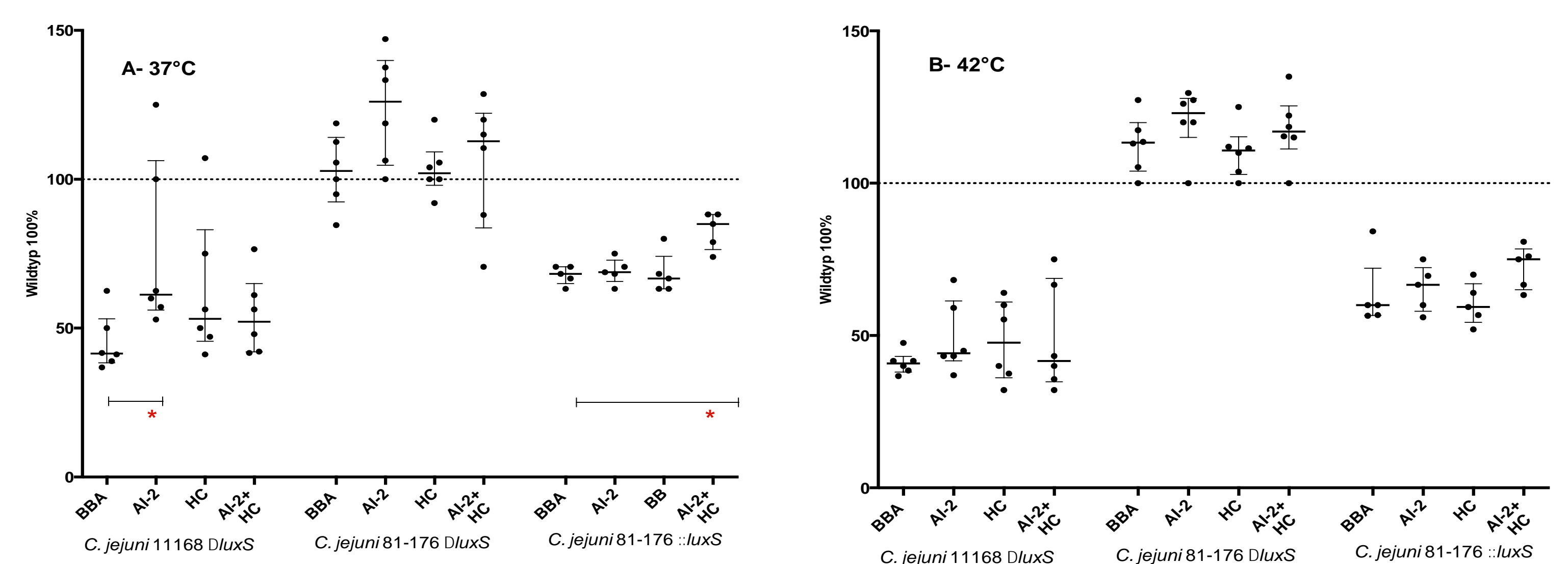


Abb.3: Schwärmfähigkeit von chemisch komplementierten *C. jejuni luxS* Mutanten: A- 37 °C, B- 42 °C, Komplementation mit AI-2, HC, AI-2+HC, gezeigt sind die normalisierte Mediane mit Interquartilsabstand (n= 6), - p<0.05 (Mann-Whitney-U Test)

C. jejuni 81-176 $\Delta luxS$ zeigte signifikant reduziertes Schwärmen auf MHA im Vergleich zum Schwärmen auf BBA bei beiden Temperaturen (Abb. 4). Das Schwärmen von *C. jejuni* 81-176: $::luxS$ ist bei 42 °C auf MHA im Vergleich zu BBA leicht erhöht. Bei beiden Temperaturen konnte keinerlei Unterschied des Schwärmens von *C. jejuni* 11168 $\Delta luxS$ auf MHA oder BBA ermittelt werden.

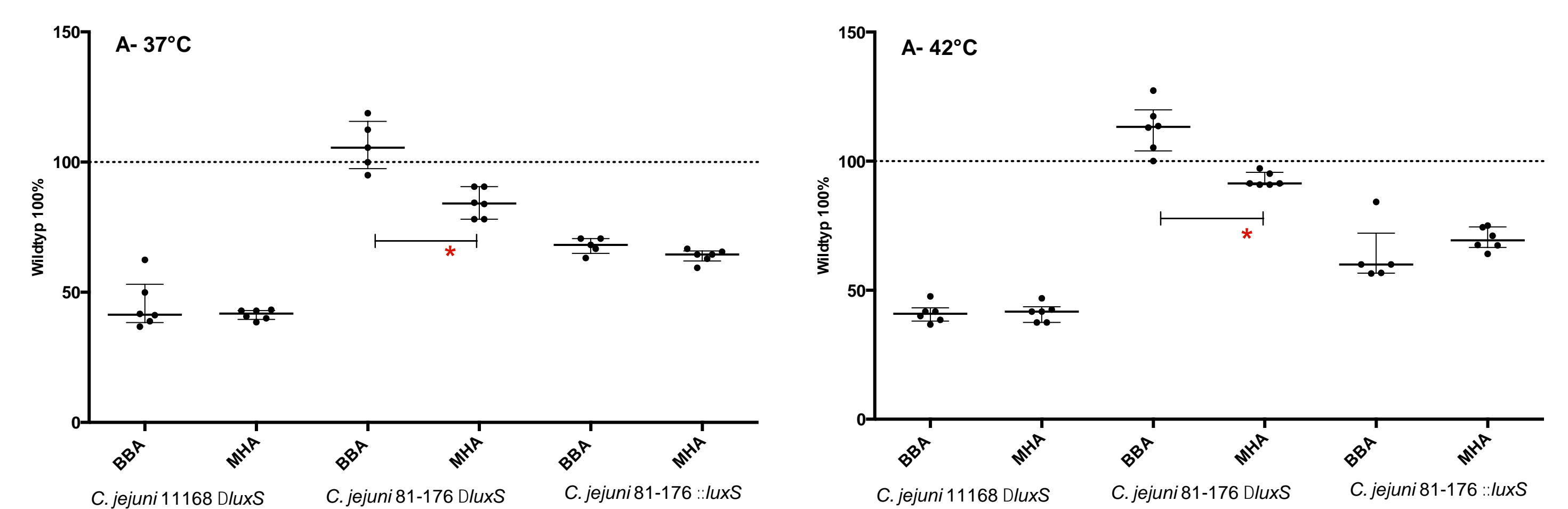


Abb.4: Schwärmverhalten von *C. jejuni luxS* Mutanten auf verschiedenen Medien: A- 37 °C, B- 42 °C; gezeigt ist der normalisierte Median mit Interquartilsabstand (n= 6), - p<0.05 (Mann-Whitney-U Test) Signifikanzermittlung zwischen: BBA vs. MHA

Diskussion

Unsere Studie hat gezeigt, dass die Phänotypen von *C. jejuni luxS*-Mutanten abhängig vom Stamm, von der Art der Mutation und den Versuchsbedingungen sind.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phänotypen von *luxS*-Mutanten nicht immer als Konsequenz von fehlendem AI-2 auftreten. Die Zugabe von AI-2 zu *C. jejuni* 11168 $\Delta luxS$ konnte während des Wachstums und Schwärmens das wt-Niveau nicht komplett wiederherstellen (Abb. 2 und 3). Die Zugabe von HC zeigte keine Veränderungen des Phänotyp der *luxS*-Mutanten.

Demnach lässt sich vermuten, dass die Unterbrechung des Methioninzyklus nicht für die auftretenden Phänotypen verantwortlich ist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Akkumulation von Komponenten im Methioninzyklus, unbekannte Funktionen von LuxS oder auch mutationsbedingte Effekte einen Einfluss auf hier vorliegende Phänotypen haben.

Um eine Aussage über die Beteiligung von AI-2 an den beobachteten Phänotypen der *luxS*-Mutanten treffen zu können, ist eine ausreichende Komplementierung unumgänglich.

