

# Vorkommen von Virulenzgenen, Adhäsion und Invasion von *Arcobacter butzleri*

Gül Karadas<sup>1</sup>, Thomas Alter<sup>1</sup>, Soroush Sharbati<sup>2</sup>, Roland Bucker<sup>3</sup>, Ute Messelhäuser<sup>4</sup>, Greta Gölz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin, Königsweg 69, 14163 Berlin;

<sup>2</sup> Institut für Veterinär-Biochemie, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin;

<sup>3</sup> Institut für Klinische Physiologie, Charité Berlin, Hindenburgdamm 30, 12203 Berlin;

<sup>4</sup> Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Veterinärstr. 2, 85764 Oberschleißheim

## Einleitung

Die tatsächliche Rolle von *Arcobacter* (*A.*) als humanpathogener Erreger ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Daher wurde in dieser Studie das Virulenzpotential von *A. butzleri* untersucht. Dazu wurde für unterschiedliche *A. butzleri*-Stämme das Vorkommen von putativen Virulenzgenen, die Induktion von Apoptose sowie die adhäsiven und invasiven Fähigkeiten an verschiedenen Zelllinien bestimmt. Außerdem wurden die Aminosäuresequenzen von CiaB, CadF und Cj1349 verglichen.

## Material und Methoden

### *Arcobacter butzleri*-Stämme

46 Lebensmittel- und Umwelt-Isolate, 5 Human-Isolate (vom NRZ *Helicobacter pylori*) sowie die Stämme *A. butzleri* CCUG 30485 und *Campylobacter* (*C.*) *jejuni* 81-176 wurden verwendet. Alle Stämme wurden in Brucella Bouillon (Oxoid) oder auf Mueller-Hinton (Oxoid) Blut- (MHB) Agarplatten unter mikroaeroben Bedingungen (5 % O<sub>2</sub>, 10 % CO<sub>2</sub>) bei 30 °C für *A. butzleri* bzw. 37 °C für *C. jejuni* inkubiert.

### DNA Extraktion

Bakterielle DNA wurde mit Chelex extrahiert und bei 4 °C gelagert.

### Bestimmung der putativen Virulenzgene

Putative Virulenzgene wurden mittels PCR bestimmt (Karadas et al., 2013).

### Vergleich der Aminosäure (AS)-sequenzen von CadF, CiaB und Cj1349

Die Gene *cj1349*, *ciaB* und *cadF* wurden sequenziert, mittels EditSeq analysiert (DNASTAR Lasergene v7) und die AS-Sequenz abgeleitet. Die Aminosäuresequenz-Alignments wurden mit Multalin v5.4.1 (Corpet, 1988) durchgeführt.

### HT-29 and HT-29/B6 Zelllinie

Die humanen Kolon Adenokarzinom-Zellen HT-29 und HT-29/B6 wurden in RPMI1640-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum Superior (beides Biochrom) kultiviert. In jedes Well einer 24-well-Platte wurden 2 x 10<sup>5</sup> Zellen ausgesät und für 48 h kultiviert.

### Caco-2 Zelllinie

Die humanen Kolon Adenokarzinom-Zellen Caco-2 wurden in DMEM-Medium mit 10 % fötalem Kälberserum Superior, 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren (Biochrom) und 5 µg/ml Gentamicin (Roth) kultiviert. In jedes Well einer 24-well-Platte wurden 5 x 10<sup>4</sup> Zellen ausgesät und für drei Wochen inkubiert. Alle 3 Tage erfolgte ein Medienwechsel.

### IPEC-J2 Zelllinie

Die porzinen jejunalen Zellen IPEC-J2 wurden in DMEM/F-12/HAM-Medium (Biochrom) mit 5 % adultem Schweineserum (Sigma), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Insulin/Transferrin/Selenium (Gibco) und 5 ng/ml epidermalem Wachstumsfaktor (Sigma) kultiviert. In jedes Well einer 24-well-Platte wurden 2,5 x 10<sup>5</sup> Zellen ausgesät und für zwei Wochen inkubiert.

### Adhäsions- und Invasions-Versuche

Die Zellen wurden mit ca. 1 x 10<sup>8</sup> Bakterien von jeweils 3 Human (H)- und 3 Hähnchen (C)-*A. butzleri*-Isolaten und *C. jejuni* 81-176 (CJ) inkubiert. Für die Adhäsions-Versuche wurden die Zellen für 1 h bei 37 °C inkubiert. Für die Invasions-Versuche wurden die Zellen für 3 h bei 37 °C inkubiert und die extrazellulären Bakterien während einer 2 h Inkubation mit 300 µg/ml Gentamicin abgetötet. Die Adhäsions- und Invasionsrate wurde prozentual zum Inokulum berechnet.

### Bestimmung der epithelialen Apoptose

Die Apoptose wurde 48 h nach der Infektion der HT-29/B6-Zellen mittels TUNEL-Färbung und Fluoreszenz-Mikroskopie bestimmt.

## Ergebnisse

### Putative Virulenzgene

In allen untersuchten *A. butzleri*-Stämmen wurden die putativen Virulenzgene *mviN*, *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *tlyA* und *pldA* nachgewiesen.

### Adhäsive und invasive Eigenschaften von *A. butzleri*

Die adhäsiven Eigenschaften der *A. butzleri*-Stämme wurden an 4 verschiedenen Zelllinien getestet (Abb. 1 A-D). Die *A. butzleri*-Stämme wurden anhand ihres Virulenz-Genprofils ausgewählt (Abb. 1 E). Die Stämme H2 und C3 zeigten keine oder nur eine minimale Fähigkeit zur Adhäsion an den Zelllinien. Alle weiteren Stämme zeigten adhäsive Eigenschaften an allen Zelllinien, außer der Stamm H1, der an IPEC-J2-Zellen nicht adhären war. Die höchste Adhäsionsrate wurde für die humane Zelllinie Caco-2 und die niedrigste für die porzine Zelllinie IPEC-J2 beobachtet.

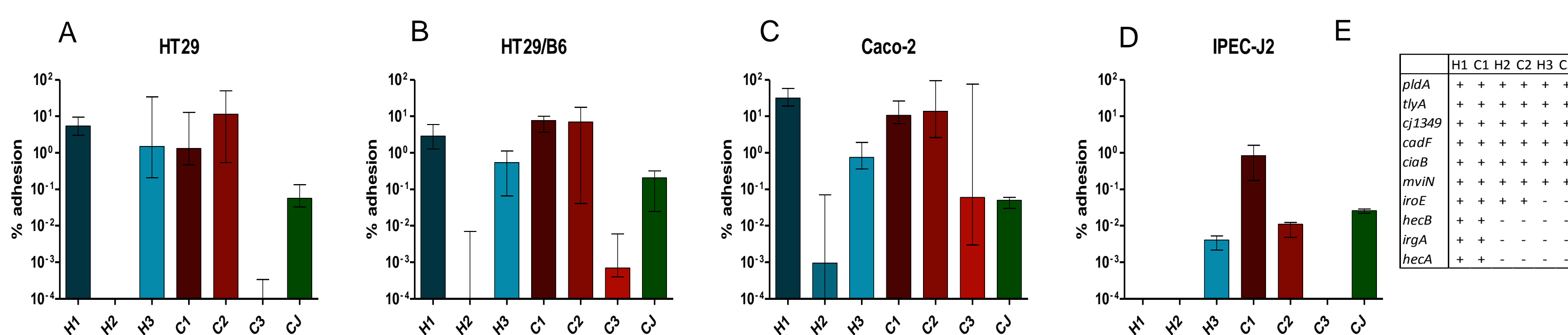


Abb.1: Adhäsive Fähigkeiten von *A. butzleri* und *C. jejuni* 81-176 an verschiedenen Zelllinien

Adhäsion von *A. butzleri*-Stämmen und *C. jejuni* 81-176 an den Zelllinien A) HT-29, B) HT-29/B6, C) Caco-2 und D) IPEC-J2 nach 1-stündiger Inkubationszeit. Die Adhäsionsrate entspricht dem Anteil adhäsiver Zellen an der Infektionsdosis. Dargestellt sind die Mediane ± IQR (n=3). E: Putatives Virulenz-Genprofil der *A. butzleri*-Isolate. H= Human-Stamm, C= Hähnchen-Stamm, CJ= *C. jejuni* 81-176

Analog dazu wurden die invasiven Eigenschaften der *A. butzleri*-Stämme (Abb. 2). Nur C1 und CJ zeigten invasive Eigenschaften an allen Zelllinien. Obwohl H3 an allen Zelllinien adhäsiv war, wurden nur an den HT-29/B6- und Caco-2-Zellen auch eine Invasion beobachtet. Die höchste Invasionsrate wurde für Caco-2 und HT-29/B6 gefolgt von HT-29 und die niedrigste für IPEC-J2 bestimmt.

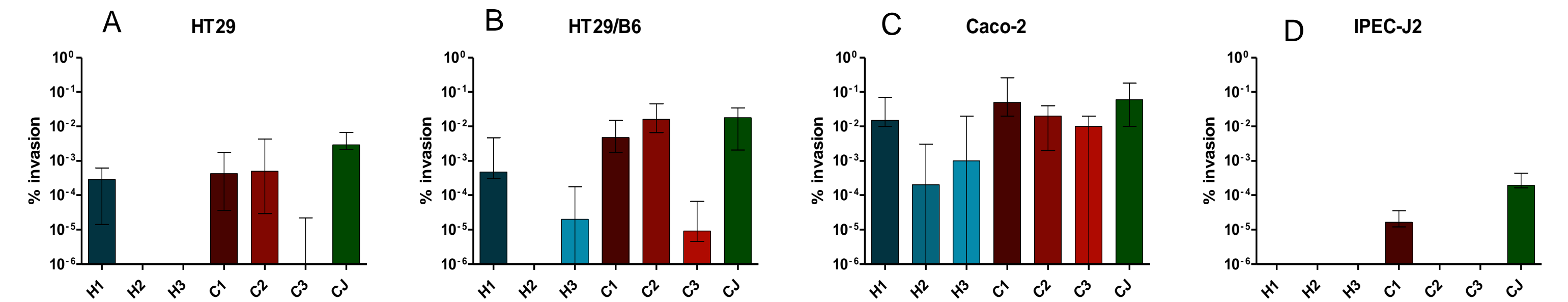


Abb.2: Invasive Eigenschaften von *A. butzleri* und *C. jejuni* 81-176 in unterschiedlichen Zelllinien

Invasion von *A. butzleri*-Stämmen und *C. jejuni* 81-176 in die Zelllinien A) HT-29, B) HT-29/B6, C) Caco-2 und D) IPEC-J2 nach 3-stündiger Inkubationszeit gefolgt von einer 2-stündigen Inkubation mit Gentamicin. Die Invasionsrate entspricht dem Anteil invasiver Zellen an der Infektionsdosis. Dargestellt sind die Mediane ± IQR (n=3). H= Human-Stamm, C= Hähnchen-Stamm, CJ= *C. jejuni* 81-176.

### Vergleich der Aminosäuresequenzen von CadF, CiaB und Cj1349

Obwohl die AS-Sequenzen von Cj1349 (Abb. 3A), CadF (Abb. 3B) und CiaB (Abb. 3C) Substitutionen von 3-5 % zeigten, sind die putativen funktionellen Domänen in allen drei Genen konserviert. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen den Aminosäuresequenzen und den adhäsiven bzw. invasiven Phänotypen.

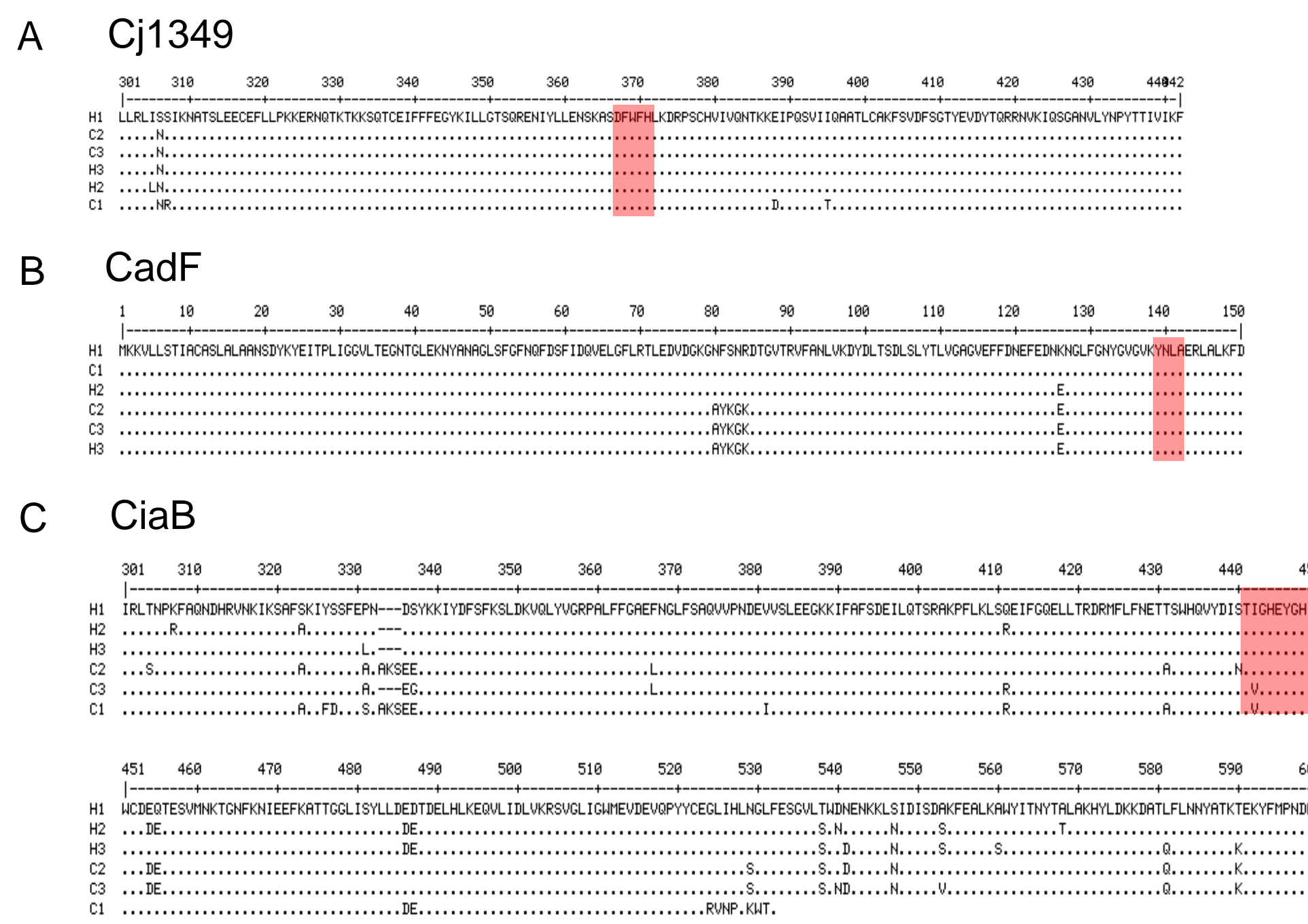


Abb. 3: Partieller AS Sequenzvergleich von Cj1349, CadF und CiaB

Konservierte AS sind als Punkte dargestellt und die putativen funktionellen Domänen von Cj1349 (A), CadF (B) und CiaB (C) mit Boxen markiert.

### Epitheliale Apoptose

Alle *A. butzleri*-Stämme induzierten in HT-29/B6-Zellmonolayern Apoptose, die im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht war ( $p < 0.05$ ). Die höchste Apoptoserate wurde durch den Stamm H2 induziert (Abb. 4A and 4B).

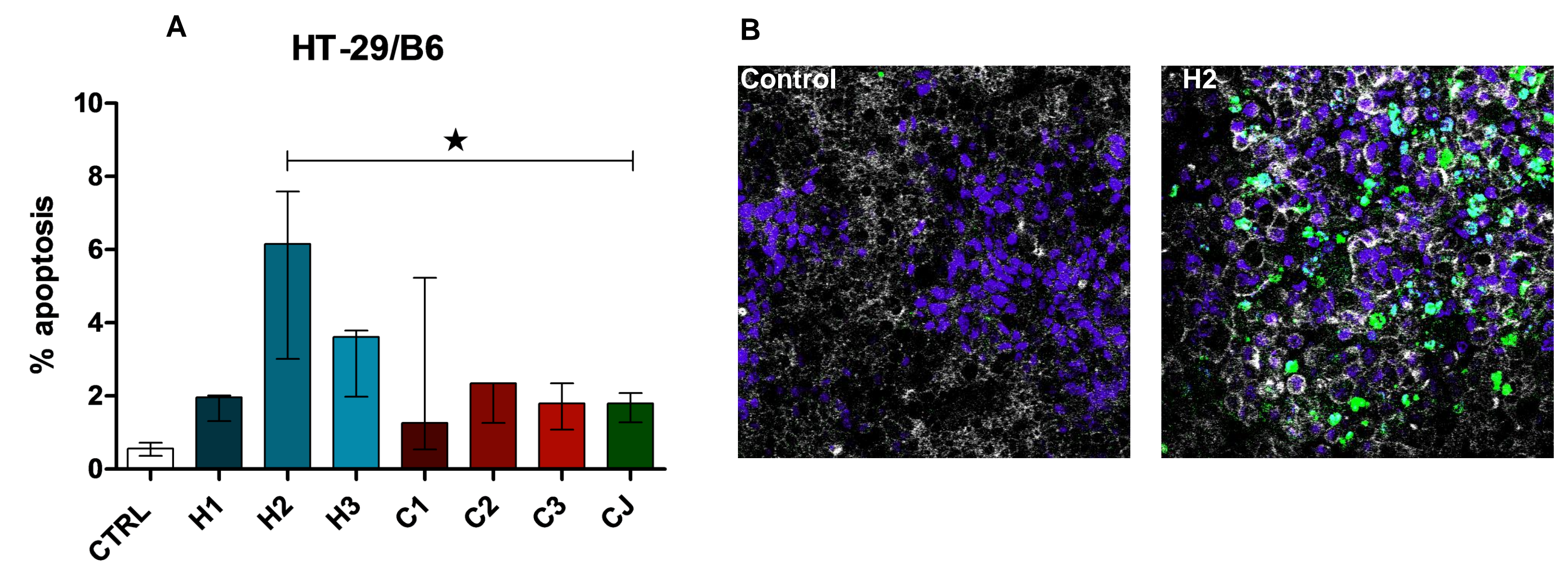


Abb. 4: Induktion von epithelialer Apoptose durch *A. butzleri*

Die Quantifizierung der Apoptoserate in *A. butzleri*-infizierten HT-29/B6-Monolayer (A) und Beispiel-Aufnahmen von HT-29/B6 Zellen, infiziert mit dem Stamm H2 (B). Die Apoptoserate entspricht dem Anteil toter Zellen an allen Zellen bestimmt. Dargestellt sind die die Mediane ± IQR (n = 3), ( $p < 0,05$ ), H = Human-Stamm, C = Hähnchen-Stamm, CJ = *C. jejuni* 81-176.

## Zusammenfassung

Die putativen Virulenzgene *mviN*, *cadF*, *cj1349*, *ciaB*, *tlyA* und *pldA* konnten in allen 52 untersuchten *A. butzleri*-Stämmen nachgewiesen werden. Wir konnten zeigen, dass *A. butzleri* Virulenzpotential besitzt, jedoch hängen die adhäsiven und invasiven Eigenschaften von *A. butzleri* von dem verwendeten Bakterienstamm und der Zelllinie ab. Für die humanen Kolon-Zelllinien konnten höhere Adhäsions- und Invasionsraten als für die porzine jejunale Zelllinie ermittelt werden. Weder das putative Virulenz-Genprofil noch die Aminosäure-Sequenzen von Cj1349, CadF und CiaB konnten die unterschiedlichen Phänotypen erklären. Die Beteiligung von anderen Genen und die Mechanismen, die dem hier beschriebenen pathogenen Potential zugrunde liegen, müssen in folgenden Untersuchungen ermittelt werden.

### Referenzen

Karadas, G., Sharbati, S., Hanel, I., Messelhauser, U., Glocker, E., Alter, T., Gölz, G., 2013. Presence of virulence genes, adhesion and invasion of *Arcobacter butzleri*. J Appl Microbiol 115, 583-590.  
 Corpet, F., 1988. Multiple sequence Alignment with hierarchical clustering. Nucleic acids research 16, 10881-10890.

