

Einfluss von Autoinducer-2 und dessen Erkennungsmechanismus in *Campylobacter jejuni*

Linda Adler, Thomas Alter, Greta Gölz
Freie Universität Berlin, Institut für Lebensmittelhygiene, Königsweg 69, 14163 Berlin

Hintergrund

Bakterien können z.B. über Signalmoleküle veränderte Umweltbedingungen wahrnehmen und sich hieran anpassen. Über das Signalmolekül Autoinducer-2 (AI-2) kann z.B. die Expression von Virulenzfaktoren, die Ausbildung von Biofilmen und die Motilität von Bakterien reguliert werden. AI-2 entsteht als Nebenprodukt während des Methionin-Zyklus (Abb. 1).

AI-2 kann sowohl über Zwei-Komponenten Signalsysteme (z. B. LuxPQ in *Vibrionaceae*) als auch über ABC-Transporter (z. B. LsrABC in *Escherichia (E.) coli*) wahrgenommen werden (Abb. 2).

Die Rolle von AI-2 in *Campylobacter (C.) jejuni* wird kontrovers diskutiert, da *C. jejuni* zwar AI-2 synthetisiert, aber noch kein AI-2-Rezeptor in *C. jejuni* identifiziert werden konnte.

Ziel der Studien war, für *C. jejuni* AI-2 abhängigen Phänotypen sowie die AI-2 Rezeptor-Kategorie zu identifizieren.

Material und Methoden

Stämme

Tab. 1: Untersuchte Stämme

Stamm	luxS	Herkunft
<i>E. coli</i> K12 DH5 α	-	ATCC 23716
<i>V. harveyi</i> BB152	+	ATCC BAA-1119
<i>V. harveyi</i> BB170	+	ATCC BAA-1117
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 Wt	+	NCTC 11168
<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 Δ luxS	-	Corcionivoschi et al. 2009

Der *E. coli* Stamm wurde bei 37°C und die *V. harveyi*-Stämme bei 30°C unter aeroben Bedingungen, die *C. jejuni*-Stämme bei 37°C unter mikroaeroben Bedingungen bebrütet.

Wachstumsversuche

Brucella Bouillon (BB; BD) wurde mit ca. 1x10⁵ CFU/ml des *C. jejuni* Wt und Δ luxS Stammes beimpft und das Wachstum bei 37°C und 42°C innerhalb 48 h mittels serieller Verdünnungen auf Mueller-Hinton (MH; Oxoid) Blut Agar-Platten bestimmt. Der *C. jejuni* Δ luxS-Stamm wurde zusätzlich mit AI-2 (OMM Scientific), Homocystein (HC; Sigma) und AI-2+HC (jeweils 10 μ M) inkubiert.

Motilitätsversuche

Aus einer Übernachtskultur wurde 1 μ l des *C. jejuni* Wt und Δ luxS Stammes (ca. 1x10⁹ CFU/ml) auf BB-Platten (0,4% Agar), BB-Platten mit AI-2, HC und AI-2+HC (jeweils 10 μ M) aufgetragen und der Durchmesser des Schwärm-Halos nach 48 h Inkubation gemessen. Die Halo-Durchmesser des Δ luxS-Stammes wurde auf die Halo-Durchmesser des Wt-Stammes normalisiert.

AI-2 Aufnahme Assay

Übernachtskulturen von *C. jejuni* Δ luxS, *E. coli* und *V. harveyi* wurden in BB bzw. Autoinducer Bioassay Medium (AB) verdünnt und 10 μ M bzw. 100 μ M AI-2 zugesetzt. Über einen Zeitraum von 6 h wurde die extrazelluläre AI-2 Konzentration mittels Lumineszenzassay bestimmt.

AI-2 Nachweis (Lumineszenz-Assay)

Zur Detektion von AI-2 wurde das Reporterassay nach Bassler et al. (1997) verwendet. BB bzw. AB dienen als Negativkontrolle. Die zellfreien Überstände (zfÜ) der Kulturen wurden durch Zentrifugation und anschließender Sterilfiltration gewonnen. Übernachtskulturen des Reporterstammes *V. harveyi* BB170 wurden 1:5000 in AB-Medium verdünnt und die zfÜ (10 %) zugegeben. Nach 4 h Inkubation bei 30°C wurde die Lumineszenz mittels Luminometer (CentroPro, Berthold) in relativen Licht-Einheiten (RLU) detektiert. Die Ergebnisse wurden als x-fache Lumineszenzinduktion der Negativkontrolle angegeben.

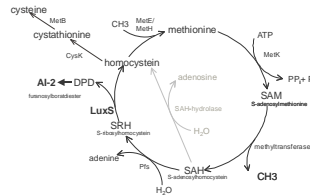


Abb. 1: Rolle von LuxS im Methionin-Zyklus. Während des Methionin-Zyklus wird S-Ribosylhomocystein durch LuxS in Homocystein und DPD ((S)-4,5-Dihydroxy-2,3-pentandione) gespalten. Durch die spontane Zyklierung von DPD entsteht AI-2.

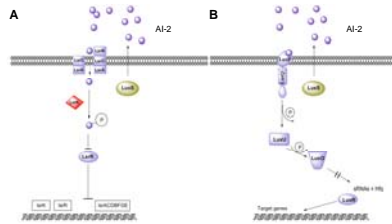


Abb. 2: AI-2 Signaltransduktion. In *E. coli* (A) wird AI-2 über den Lsr-Transporter in die Zelle internalisiert und durch LsrK phosphoryliert. P-AI-2 inaktiviert den Transkriptionsrepressor LsrR, wodurch die Transkription von Zielgenen reguliert werden kann. In *V. harveyi* (B) bindet AI-2 extrazellulär an den LuxP-Rezeptor, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert wird. Die Dephosphorylierung von LuxO führt zu verstärkter Proteinsynthese des Transkriptionsaktivators LuxR, wodurch die Transkription von Zielgenen reguliert werden kann.

Ergebnisse

Phänotypische Untersuchungen

Die *C. jejuni* Δ luxS Mutante zeigt sowohl bei 37°C als auch bei 42°C ein geringeres Wachstum als der Wt-Stamm (Abb. 3). Das Wachstum der Δ luxS Mutante kann durch die Zugabe von AI-2 und AI-2+HC erhöht werden. Die Motilität der *C. jejuni* Δ luxS Mutante (40% im Vergleich zum Wt-Stamm) konnte durch die Zugabe von AI-2 auf 60% erhöht werden (Abb. 4).

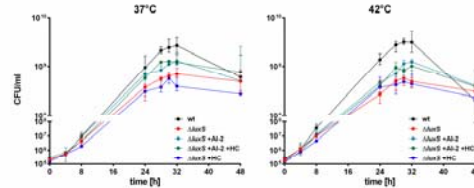


Abb. 3: Wachstumskurven von *C. jejuni* Δ luxS

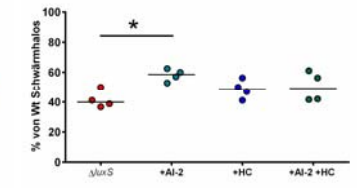


Abb. 4: Schwärmverhalten von *C. jejuni* Δ luxS

AI-2 Rezeptor Untersuchungen

Die AI-2 Konzentration im Überstand nimmt nur bei der *E. coli* Kultur ab, wohingegen die AI-2 Konzentration im Überstand der *V. harveyi* und *C. jejuni* Kulturen innerhalb von 6 h unverändert bleibt (Abb. 5).

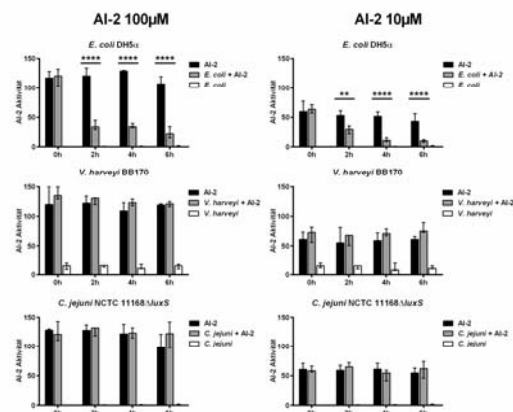


Abb. 5: AI-2 Aufnahme Assay

Zusammenfassung

Die *C. jejuni* Δ luxS Mutante zeigt Defizite in ihrem Wachstums- und Schwärmverhalten, welche sich durch die Zugabe von AI-2 teilweise komplementieren lassen. Dies deutet auf mögliche AI-abhängige Regulationen in *C. jejuni* hin.

Da AI-2 von *C. jejuni* nicht internalisiert wurde, sollten sich die weiteren AI-2 Rezeptor-Studien für *C. jejuni* eher auf Zwei-Komponenten Signalsysteme als auf ABC-Transportsysteme fokussieren.

