

Visualisierung und Quantifizierung von natürlicher Transformation in Campylobacteriales

Kerstin Stingl

Nationales Referenzlabor für *Campylobacter*

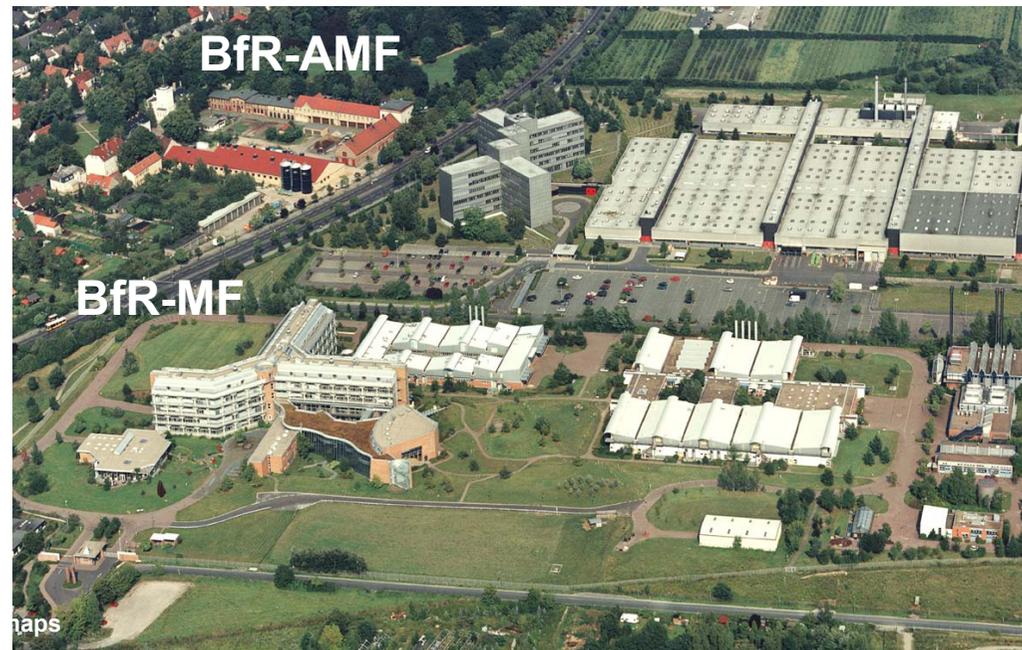
NRL *Campylobacter* am Standort BfR-Marienfelde

NRL für *Campylobacter*

Christiane Buhler
Marie-Theres Knüver
Dr. Britta Kraushaar
Dr. Ewa Pacholewicz
Maja Thieck
Petra Vogt
Imke Wulsten

Alumna:

Dr. Nora-Johanna Krüger



BfR Berlin-Marienfelde (MF)

Natürliche Transformation = Aufnahme freier DNA aus der Umgebung

Griffith F (1928) The Significance of Pneumococcal Types. J Hyg (Lond) 27 (2):113-159

VOLUME XXVII

JANUARY, 1928

No. 2

THE SIGNIFICANCE OF PNEUMOCOCCAL TYPES.

BY FRED. GRIFFITH, M.B.

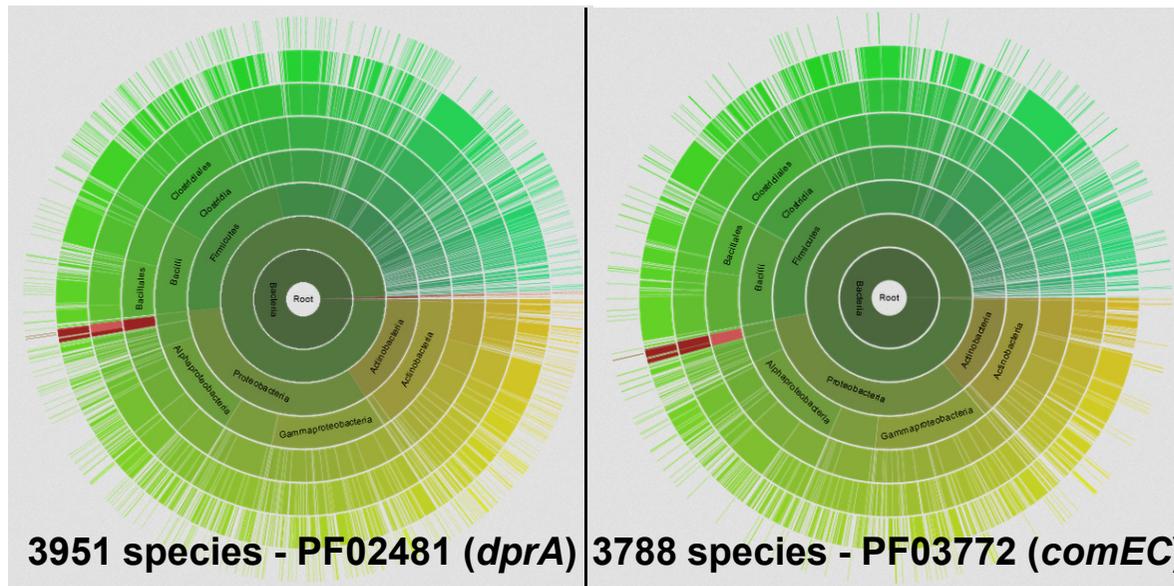
(A Medical Officer of the Ministry of Health.)

(From the Ministry's Pathological Laboratory.)

- Übertragung von Virulenzfaktoren zwischen *Streptococcus pneumoniae* Stämmen mit “rough” und “smooth” Koloniemorphologie (Mausversuch)

Natürliche Transformation

- über 80 % aller sequenzierter Bakterien besitzen das Potential zur natürlichen Transformation (besitzen Homologe von *dprA* und *comEC*; Johnston et al. 2014 Nat. Rev. Microbiol., Stingl & Koraimann, in press)



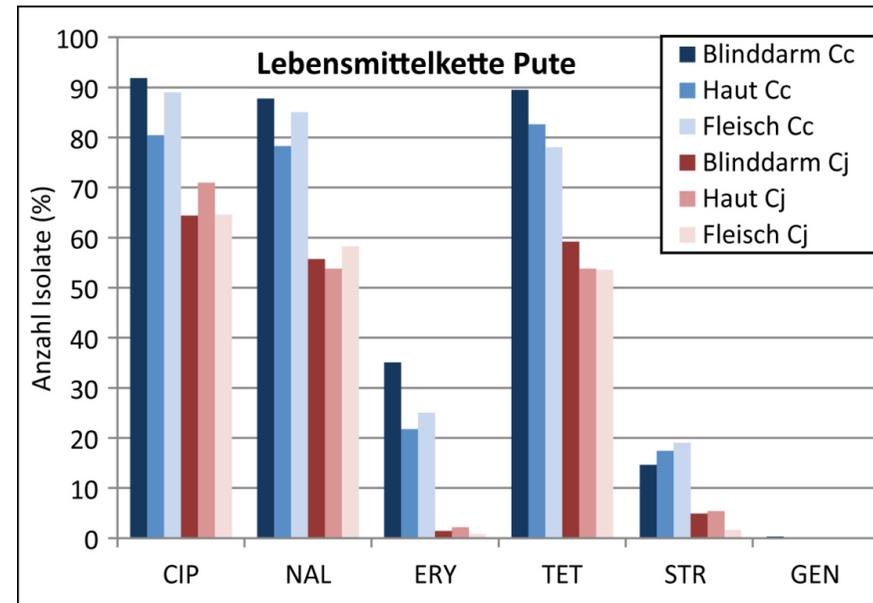
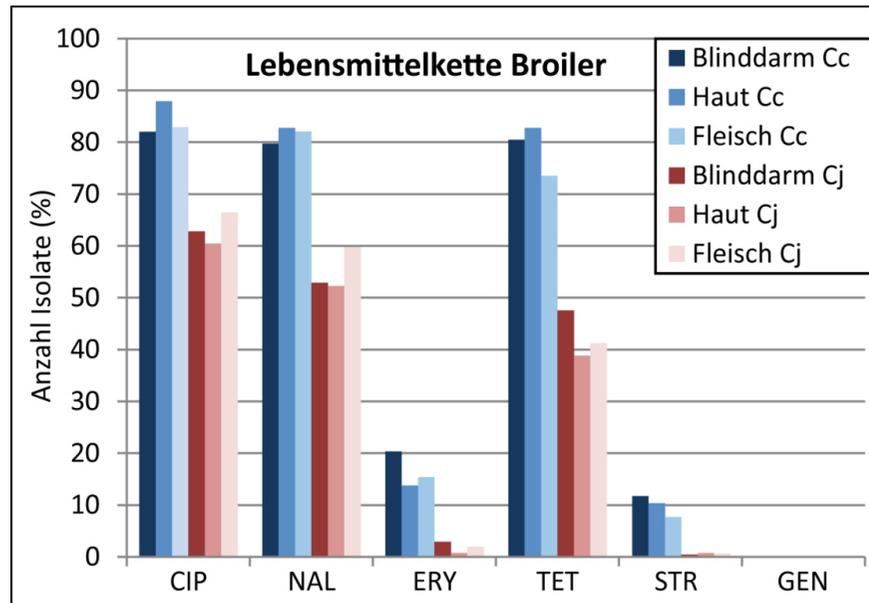
<http://pfam.xfam.org/>

- DNA-Aufnahme normalerweise über Typ II Sekretions-/Typ IV Pili Systeme
- Ausnahme *Helicobacter pylori* (Typ IV Sekretionssystem)

Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen

- Zoonosen-Monitoring auf Rechtsgrundlage...
 - Allgemeine Verwaltungsvorschrift (AVV) Zoonosen Lebensmittelkette
 - Kommissions-Beschluss (EG) Nr. 652/2013
- Länderlaboratorien aus Deutschland senden Isolate aus vereinbarten Matrix-Erreger-Kombinationen an die NRLs des BfR
- NRL für *Campylobacter* erhält pro Jahr ca. 1500-2000 Isolate aus verschiedenen Matrizes (Lebensmittelketten) wie z. B. Huhn, Pute, Schwein, Rind, vereinzelt andere Nutztiere und Zootiere
- Antibiotikaresistenzbestimmung mittels Mikrodilutionsmethode nach den Vorgaben des CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute)
- Nationale Trendberichte und Meldung der Daten an EFSA

Ausbreitung von Antibiotikaresistenzen



Vogt et al., GERMAP 2015

- *C. coli* resistenter als *C. jejuni*
- Hohe Resistenz gegenüber (Fluoro-)quinolonen
- Hohe Resistenz gegenüber Tetrazyklin
- Geringe bis moderate Resistenz gegenüber Erythromycin und Streptomycin
- Resistenzdeterminanten Punktmutationen (*gyrA*, 23SrRNA) bzw. Resistenzgene (*tetO*, *aadE*, etc.)

Prinzipien der DNA-Aufnahme in Bakterien

1. Limitation der DNA-Aufnahme

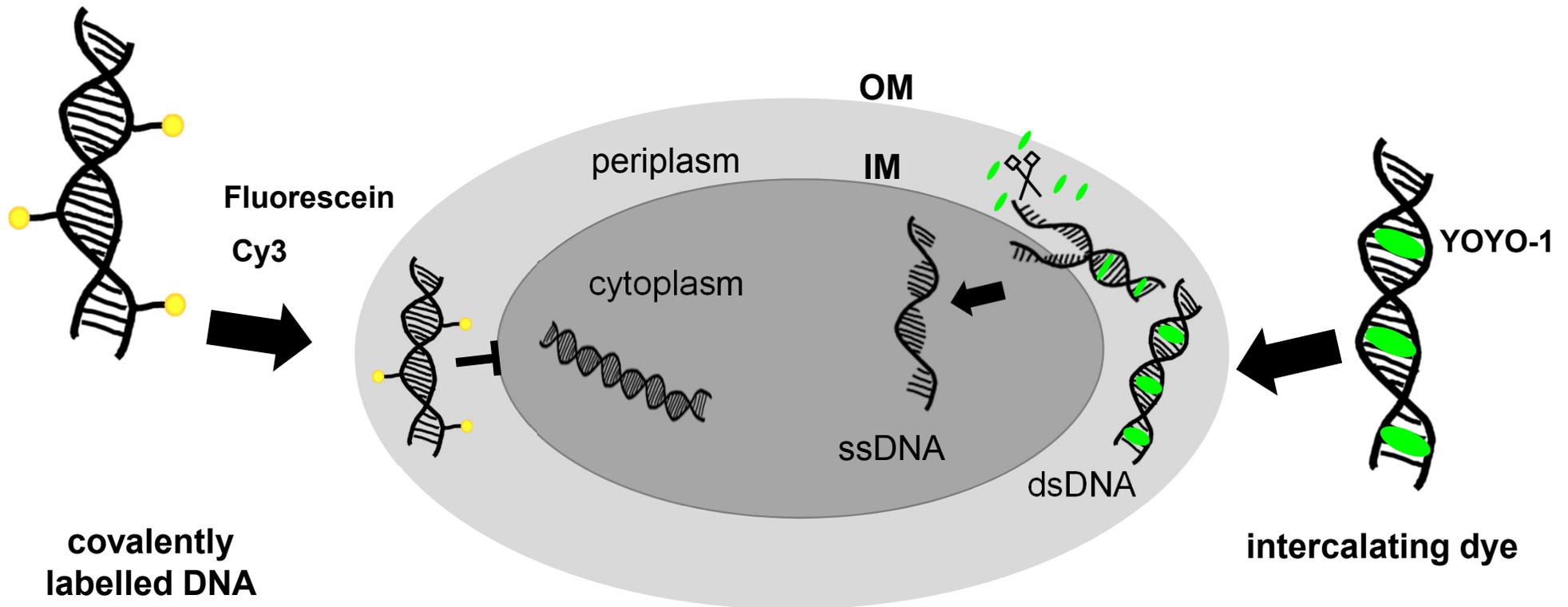
- Zeitlich begrenzte Kompetenzphase/Subpopulation
- DNA Aufnahmesequenz (*Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*) bzw. Methylierungsmotiv (*Campylobacter jejuni*)

2. Zwei-Stufen DNA-Aufnahmeprozess

- Transport der DNA in das Periplasma oder über die Zellwand in einen DNase resistenten Zustand
- Transport in das Cytoplasma

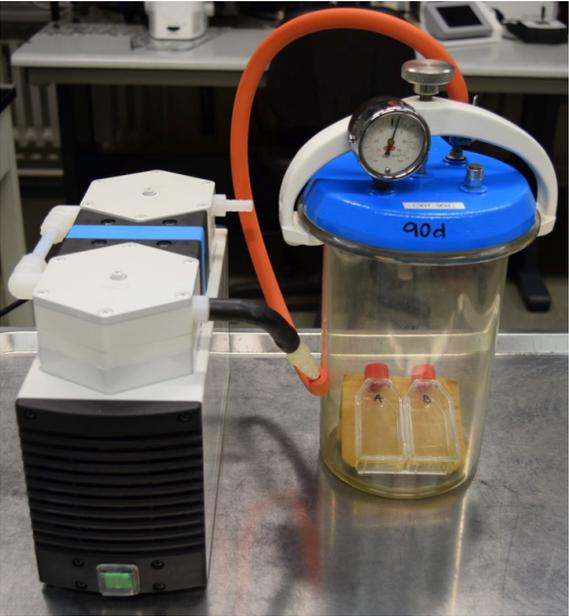
Fluoreszenz Assay zur Visualisierung von DNA Aufnahme in Gram-negativen Bakterien

- Normaler Transformations-Assay: Resistenzmarker und Selektion auf Resistenz

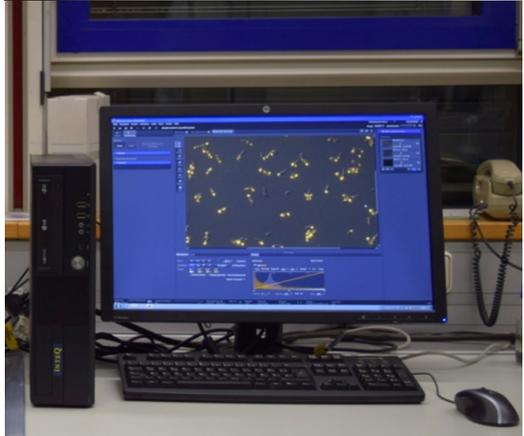
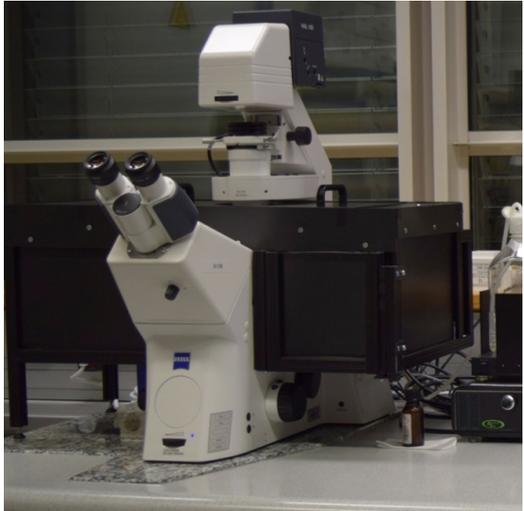


Stingl et al., 2010 PNAS

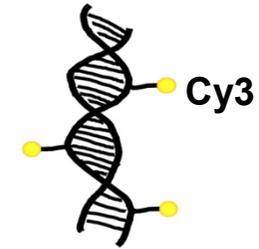
Anzucht und DNA Aufnahme-Assay



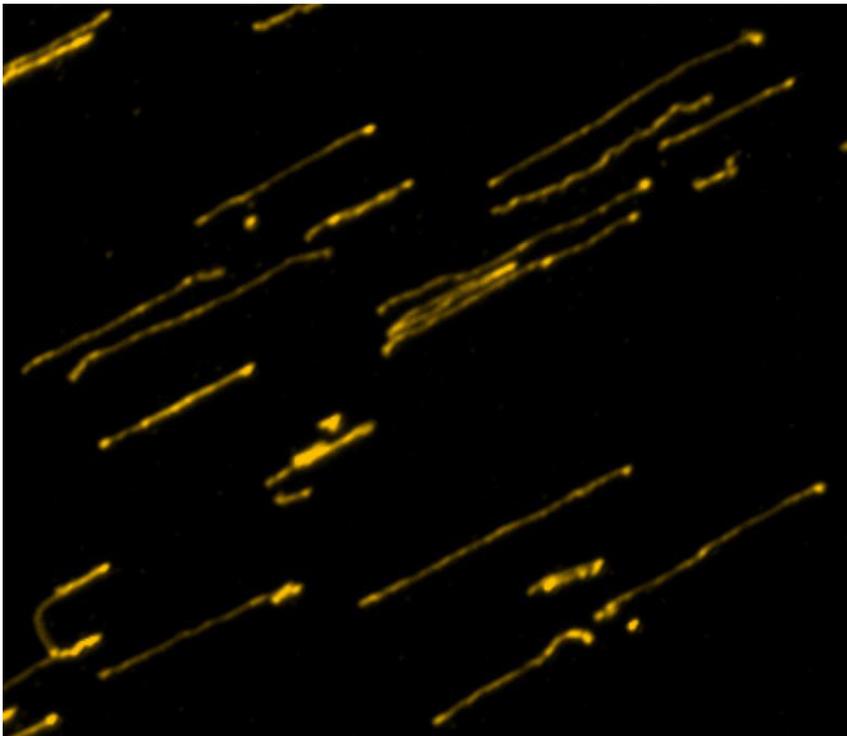
DNA Aufnahme unter mikro-aeroben Bedingungen, anschließend DNase

A close-up view of a metal microtiter plate with several wells. Four white caps are placed on top of the wells, and the plate is resting on a surface.

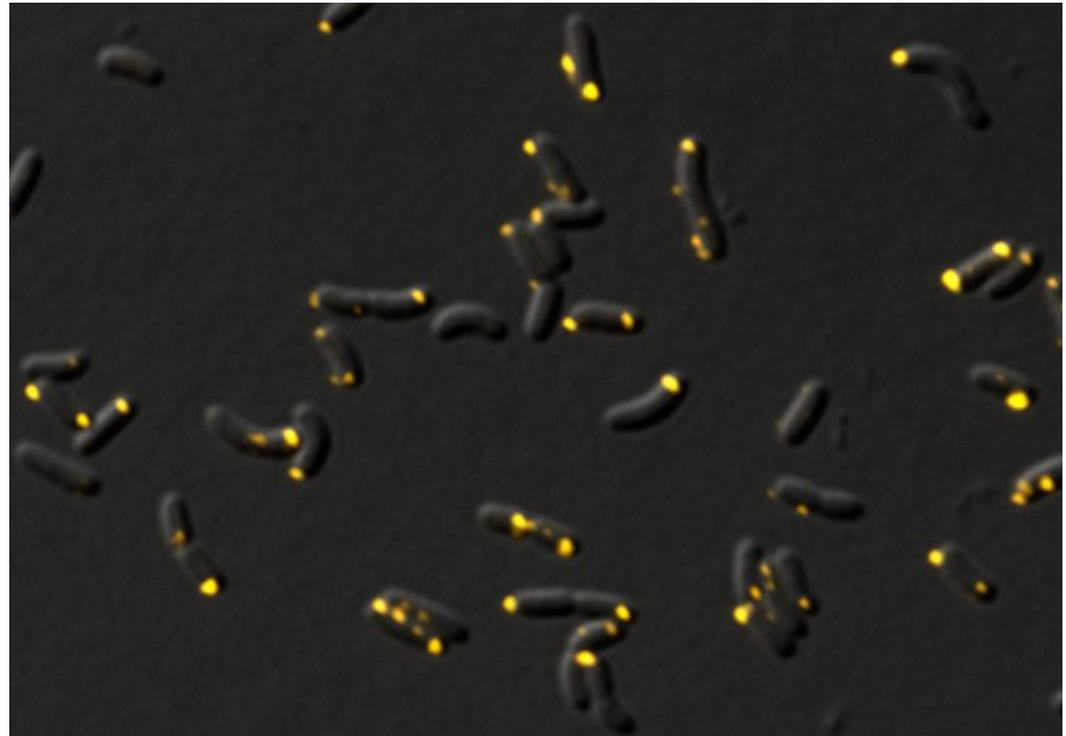
Visualisierung der DNA-Aufnahme in *H. pylori*



Einzelne Cy3-markierte λ DNA Moleküle

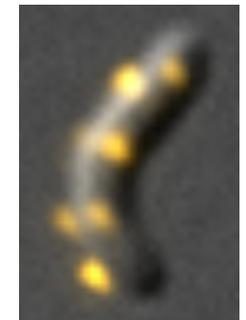
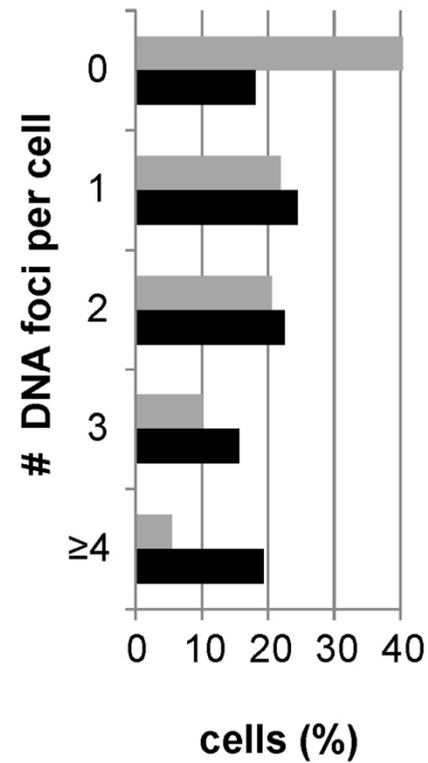
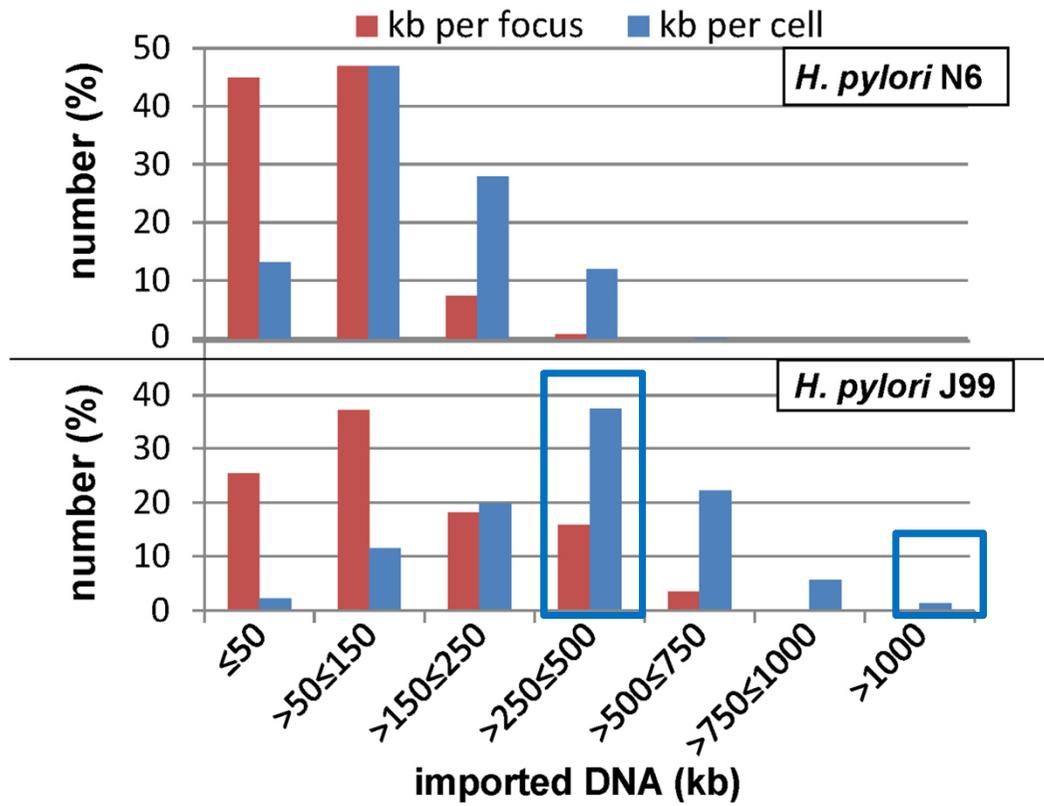


H. pylori nach 10 min DNA Aufnahme

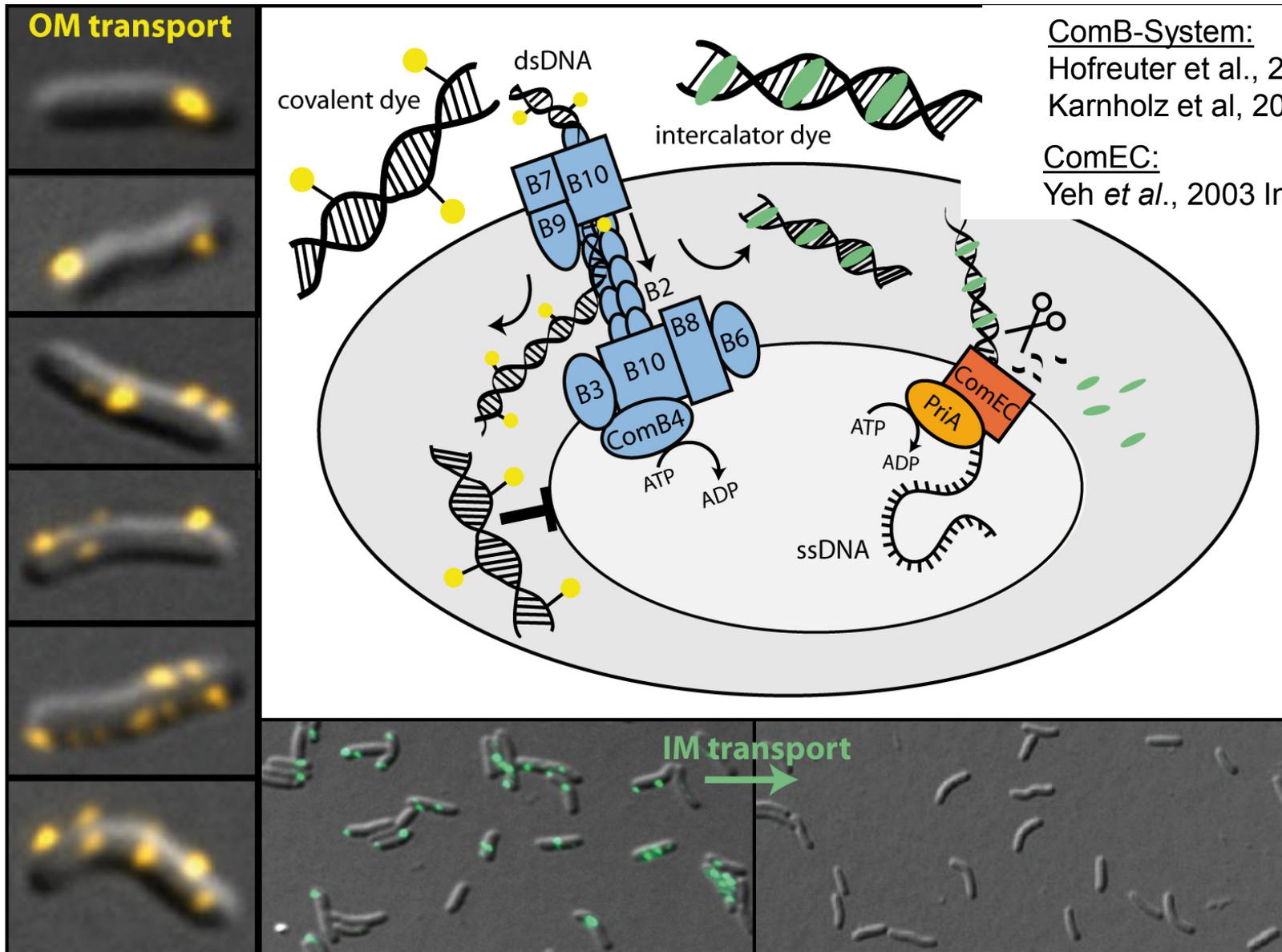


Krüger et al., 2016 PLOS Pathog.

Wieviel DNA importiert *H. pylori* ?

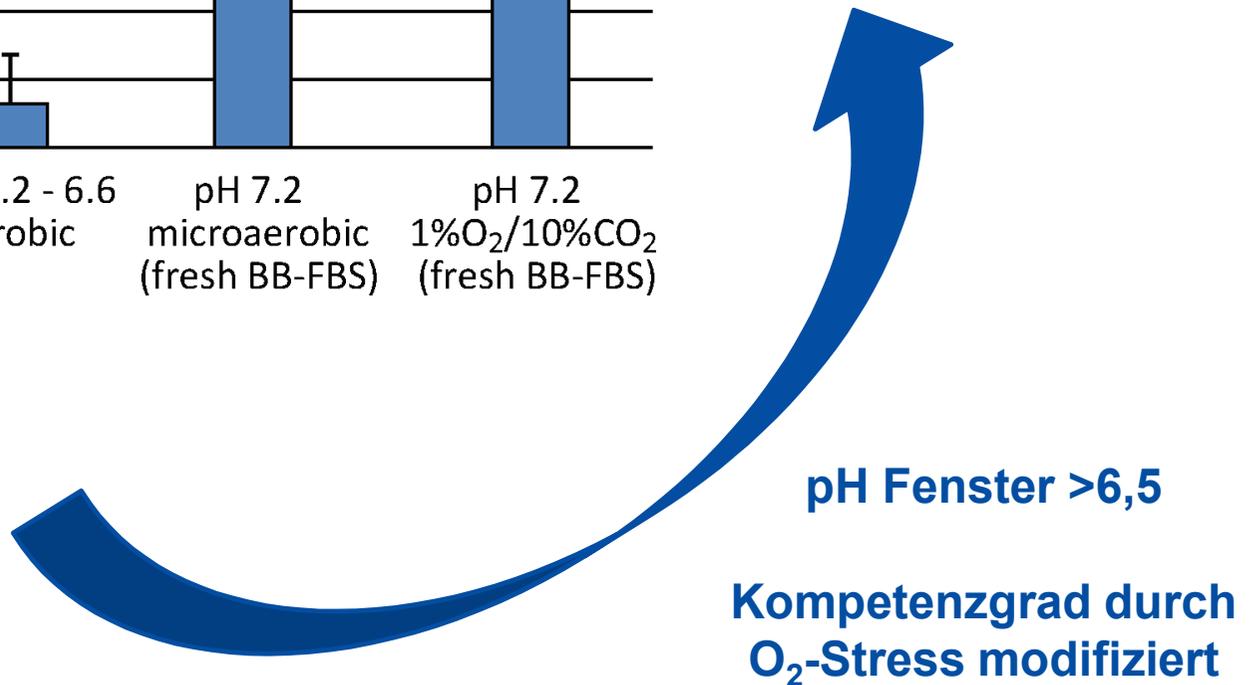
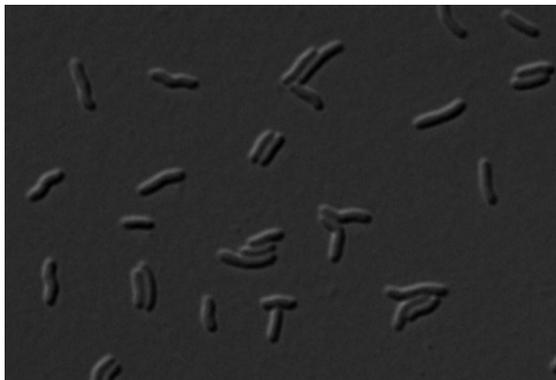
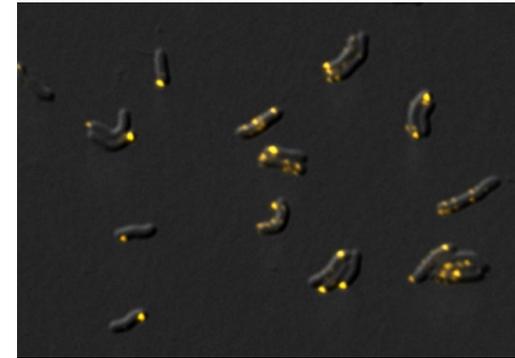
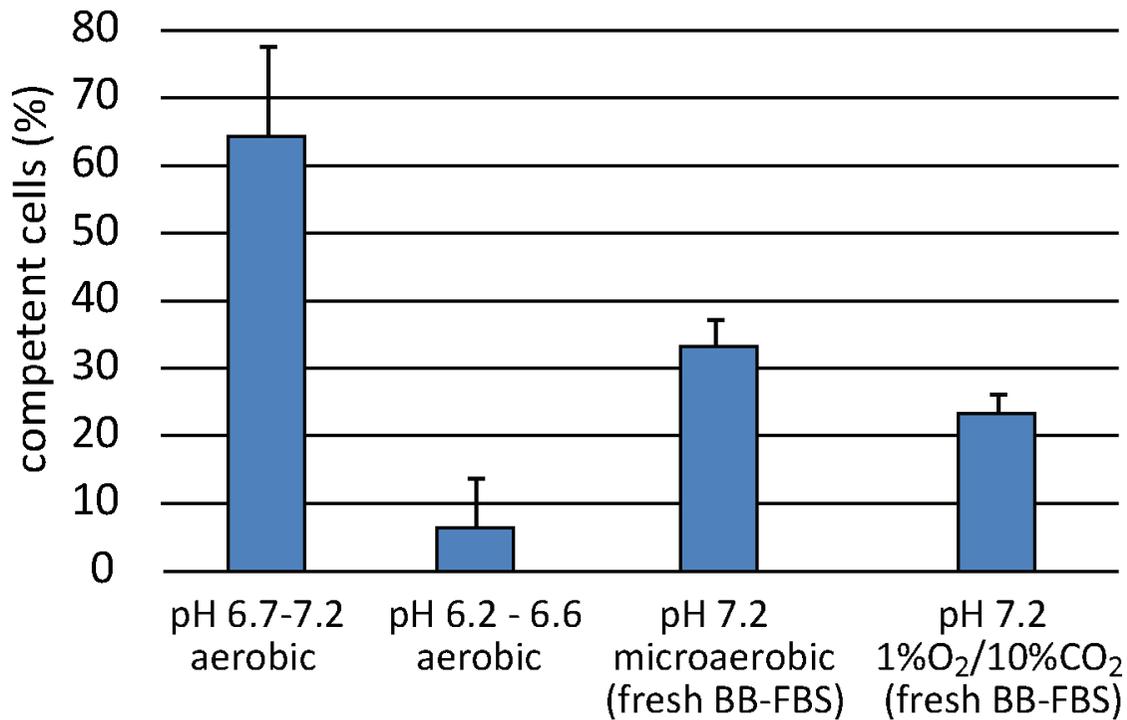


2-Stufen Mechanismus des DNA-Importes in *H. pylori*



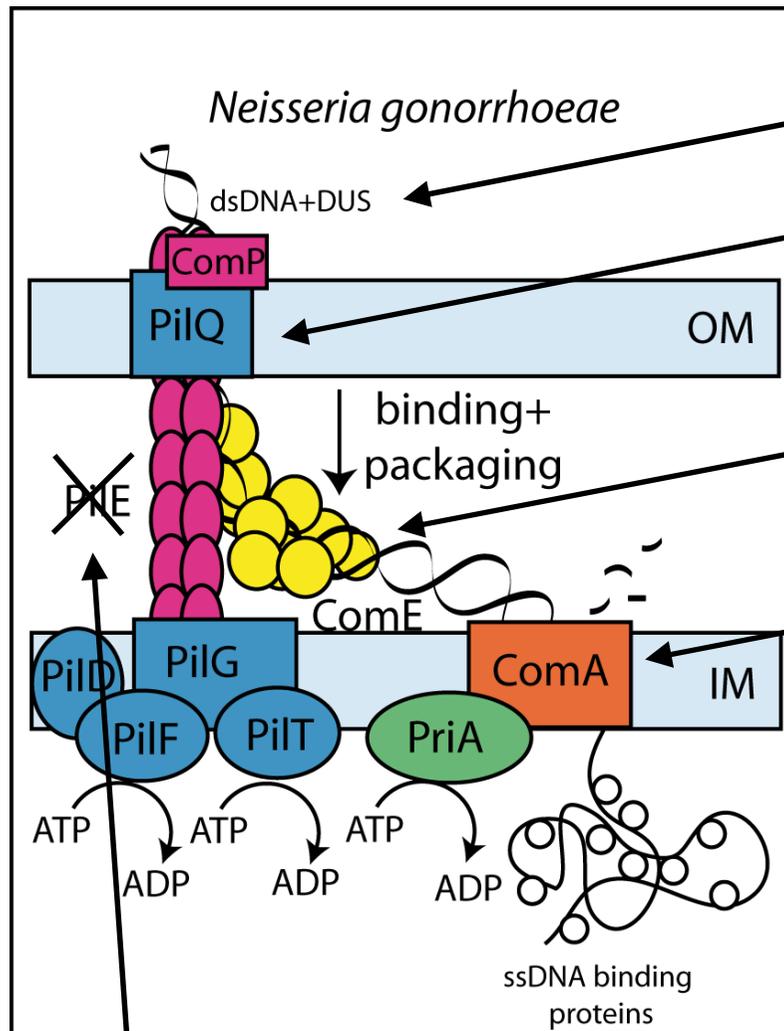
Stingl et al., PNAS 2010; Krüger & Stingl, Mol. Microbiol. 2011; Stingl & Koraimann, in press

Auslöser der Kompetenzentwicklung in *H. pylori*



Krüger et al., 2016 PLOS Pathog.

DNA-Aufnahme in *C. jejuni*



Erkennung eigener DNA (Wang et al. 1990 J. Bac.)

ctsD; weitere *cts* Gene homolog zu *comG* (Wiesner et al. 2003 J. Bac., Beauchamp et al. 2015 J. Bac.)

cj0011c (Jeon et al. 2007 J. Bac.)

cj1211 (Jeon et al. 2008 Antimicrob. Agents Chemother.)

pVir in 81-176 mit Homologen *virB4*, *virB7*, *virB8-10*, *virB11*, *virD4* (Bacon et al. 2000 und 2002)

Modifiziert nach Hamilton & Dillard, Mol. Microbiol. 2006

Pilusstrukturen nicht notwendig für Aufnahme; S-Pilin ist ausreichend für natürliche Transformation (Oberfell & Seifert 2016, PLOS Genet.)

RAATTY Methylierungsmotiv ist konserviert bei *C. jejuni* und *C. coli*

Zautner et al. *BMC Genomics* (2015) 16:1088
DOI 10.1186/s12864-015-2317-3

BMC Genomics

RESEARCH ARTICLE

Open Access

SMRT sequencing of the *Campylobacter coli* BfR-CA-9557 genome sequence reveals unique methylation motifs



Andreas E. Zautner^{1*} , Anne-Marie Goldschmidt¹, Andrea Thürmer², Jörg Schuldes², Oliver Bader¹, Raimond Lugert¹, Uwe Groß¹, Kerstin Stingl³, Gabriela Salinas⁴ and Thomas Lingner⁴

- RAATTY Methylierungsmotiv nicht in *H. pylori*
- BfR-CA-9557 DNA wird von *C. jejuni* über natürliche Transformation aufgenommen

RAATTY Methylierungsmotiv ist wichtig für die DNA-Aufnahme in *C. jejuni*

www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1703331114

PNAS | Published online August 30, 2017

PNAS Methylation-dependent DNA discrimination in natural transformation of *Campylobacter jejuni*

Jessica M. Beauchamp^{a,1}, Rhiannon M. Leveque^b, Suzanne Dawid^{a,c}, and Victor J. DiRita^{b,2}

^aDepartment of Microbiology and Immunology, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI; 48109; ^bDepartment of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University, East Lansing, MI; 48824; and ^cDepartment of Pediatrics, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, MI 48109

- Die Transformationseffizienz ist um log2 bei unmethylierter genomischer DNA (ctsM Mutante) reduziert
- *In vitro* Methylierung mit M.EcoRI verbessert die Transformation von Plasmid-DNA

Teilprojekt IP3:

Horizontaler Gentransfer als Faktor einer erhöhten Fitness bei *C. jejuni*

- Fluoreszenzassay für *C. jejuni* etablieren
- Parameter der Kompetenzentwicklung identifizieren
- Mutanten mit Defekten bei der natürlichen Transformation herstellen und hinsichtlich Fitness/Überleben/Biofilmbildung charakterisieren
- Kompetenzentwicklung verhindern und natürliche Transformation hemmen, um Anpassungsfähigkeit von *C. jejuni* zu reduzieren

Dem Keim auf der Spur –
Campylobacter-Infektionen in der Küche vermeiden



Video zur Veranschaulichung von Kreuzkontamination in der Küche (unveröffentlicht)

Danke an...

Länderlaboratorien (Campy-Isolate)
Dr. A. Pawlik, Wrowlaw

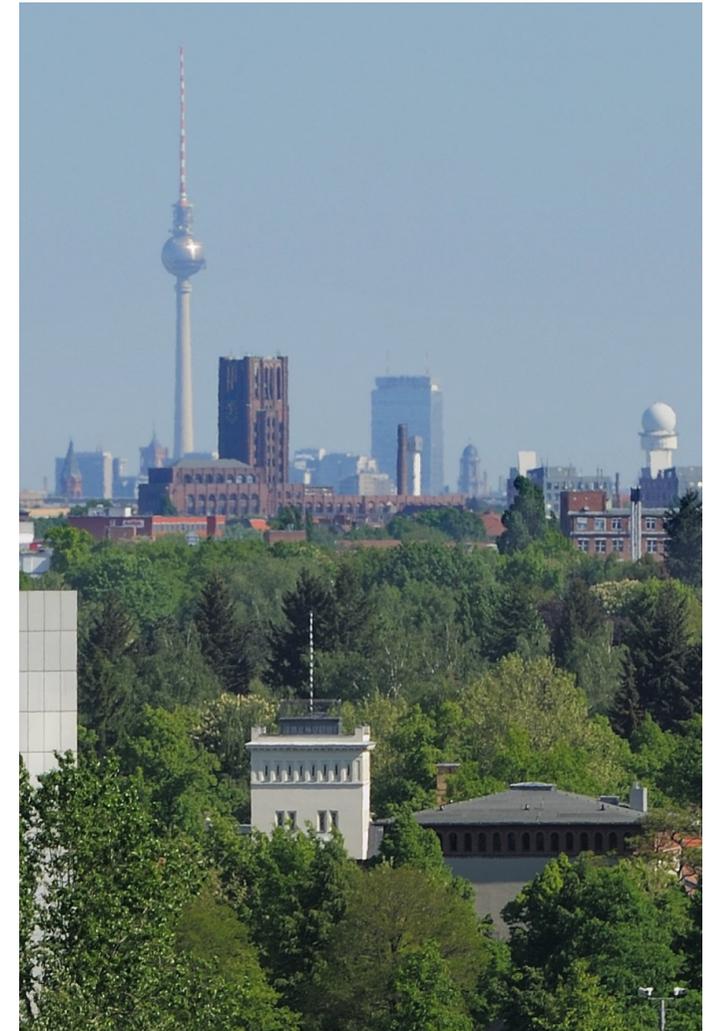
BfR:
Prof. A. Käsbohrer (ZoMo-Nat)
NRL *Campylobacter* Team

**Danke für Ihre
Aufmerksamkeit!**

DFG Deutsche
Forschungsgemeinschaft



Bundesministerium
für Bildung
und Forschung



Blick von Berlin-Marienfelde
(Foto: Günter Friedmann-Marohn)