

Transkriptionelle Unterschiede in der Hitzeschockantwort von *Campylobacter (C.) jejuni*, *C. coli* und *C. lari*

Carolin Riedel¹, Greta Gözl¹, Konrad U. Förstner², Cynthia M. Sharma², Thomas Alter¹

¹Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin ²Zentrum für Infektionsforschung, Universität Würzburg

Einleitung

Obwohl *Campylobacter* spp. typische Stressantwortmechanismen wie der Sigma-Faktor RpoS fehlen, sind sie in der Lage, die Hindernisse entlang der Lebensmittelkette zu überwinden. Hierbei sind Stressoren wie Austrocknung, Kältestress, oxidativer und osmotischer Stress, Änderungen des pH-Wertes sowie besonders der Hitzestress von Bedeutung.

Eine Beteiligung klassischer Hitzeschockgene an der Hitzeschockantwort von *C. jejuni* konnte bereits belegt werden. Einzelheiten über die Mechanismen und deren regulatorische Faktoren sowie die Überlebensstrategien von *C. coli* und *C. lari* bei hohen Temperaturen sind aber unbekannt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Stressantwort von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari* bei 46 °C zu charakterisieren. Frühere Untersuchungen zeigten eine geringere Überlebensrate von *C. coli* und *C. lari* gegenüber *C. jejuni* unter Hitzestress. Um diese phänotypischen Unterschiede zu erklären, wurden die sequenzierten Transkriptome nach einem Hitzestress untersucht.

Material und Methoden

Bakterienstämme, Medien und Wachstumsbedingungen

C. jejuni NCTC11168, *C. coli* RM2228 und *C. lari* RM2100 wurden in Brucella-Bouillon bei 37 °C mikroaerob inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,1 bis 0,2 erreicht war (ca. 10⁸-10⁹ KBE/ml). Vor der RNA-Extraktion wurden die Kulturen geteilt und jeweils für 30 min bei 37 °C bzw. 46 °C inkubiert.

Ergebnisse

Transkriptom-Sequenzierung

Nach einem 30-minütigen Hitzeschock von 46 °C ist die Expression von 3 % der *C. jejuni*-Gene und 9 % der *C. coli*- und *C. lari*-Gene reguliert (Tab. 1).

Tab. 1: Absolute und relative Anzahl signifikant regulierter Gene (log₂ fold change >1 und <-1, p-value <0,05) aus den mit DESeq ausgewerteten Transkriptomdaten

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>
Analysierte Gene	1721	2038	1610
Regulierte Gene	3 % (n=45)	9 % (n=178)	9 % (n=141)
Plasmid-codiert	-	20 % (n=37)	2 % (n=4)
hochreguliert	89 % (n=40)	69 % (n=123)	45 % (n=63)
herunterreguliert	11 % (n=5)	31 % (n=55)	55 % (n=78)

Orthologenmapping der differentiell exprimierten Gene

Lediglich sechs Gene (*clpB*, *hrcA*, *grpE*, *dnaK*, *groES* und *groEL*) zeigen in allen drei Spezies eine gesteigerte Expression (Abb. 1, Box I). *C. coli* zeigt bei einigen Genen eine ähnliche Regulation der Genexpression wie *C. jejuni* bzw. *C. lari* (Abb. 1, Box II). Für den überwiegenden Teil der Gene existiert in keiner der anderen Spezies ein entsprechendes Ortholog oder Gen mit regulierter Expression (Abb. 1, Box III). Wenige Gene zeigen eine gegensätzliche Regulation der Expression (Abb. 1, Box IV).

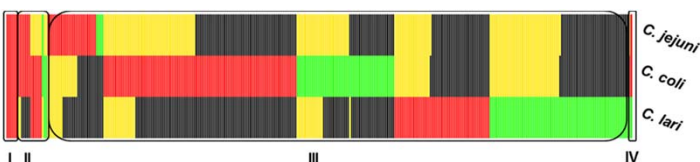


Abb. 1: Orthologenmapping der nach einem Hitzeschock differentiell exprimierten Gene
 Rot: gesteigerte Expression, grün: verringerte Expression, gelb: keine regulierte Expression, grau: kein Ortholog vorhanden

Diskussion

Die Transkriptomanalysen zeigen deutliche Unterschiede bezüglich der Hitzestressantwort der einzelnen *Campylobacter*-Spezies. Die einzigen Genen, deren Expression in allen drei Spezies gleichermaßen reguliert wird, kodieren für Chaperonen bzw. ihre Regulatoren und gehören zu den klassischen Stressantwortgenen. Mit der bisherigen Auswertung lassen sich die hitzebedingten phänotypischen Differenzen noch nicht erklären. Dies könnte daran liegen, dass jeweils ein hoher Anteil an reguliert exprimierten Genen bislang keiner funktionellen Gruppe zugeordnet sind. Vor allem die spezies-spezifisch bei *C. jejuni* induzierten Gene könnten die erhöhte Hitzetoleranz gegenüber *C. coli* und *C. lari* begründen und werden weiter untersucht.

Zunkünftig können RNA-Seq-Experimente in der Lebensmittelmikrobiologie eine wichtige Rolle spielen, um Informationen über das Überleben von Mikroorganismen in der Lebensmittelkette und deren Anpassung an subletale Faktoren (z. B. technologische Stressoren) zu generieren.

RNA-Extraktion

Die RNA wurde unter Verwendung einer Hot-Phenol-Methode extrahiert^[1]. RNA-Integrität und Menge wurden mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) bestimmt.

Transkriptom Sequenzierung (RNAseq)

Die Erstellung der Libraries und die Sequenzierung (Illumina HiSeq, 100 Zyklen im Single-End-Modus) erfolgten durch die Vertis Biotechnologie AG.

Bioinformatische Auswertungen

Die Sequenzierungsdaten wurden mit der RNA-analysis pipeline RAPL version 0.1 prozessiert^[2]. Dabei wurden Standardparameter gemäß Segemehl Version 0.1.3 für das Alignment und DESeq 1.12.0 für die Genexpressionsanalysen verwendet^[3,4].

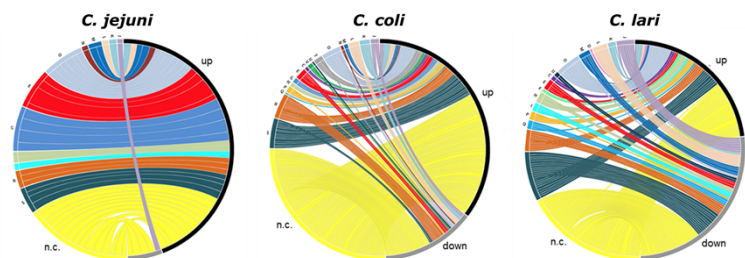
Das Orthologenmapping erfolgte nach den besten bidirektionalen BLAST Treffern (max. e-value 0,1; min. Länge 20 nt; min. 60 % der beiden Sequenzen).

Die funktionelle Gruppierung wurde aus der eggNOG4.0 Datenbank (www.eggnoG.embl.de) übernommen.

Funktionelle Gruppierung der differentiell exprimierten Gene

Die differentiell exprimierten Gene verteilen sich auf viele funktionelle Gruppen (Abb. 2). Bei *C. jejuni*, *C. coli* bzw. *C. lari* sind 49 %, 70 % bzw. 45 % der differentiell exprimierten Gene keiner oder einer funktionell nicht näher charakterisierten Gruppe zugeordnet (Abb. 2 Gruppe R, S, n.c.).

Die Gene aus der Gruppe O (Chaperone) zeigen in allen drei Stämmen nur eine Hochregulation der Expression. Sowohl bei *C. coli* als auch bei *C. lari* können sich innerhalb einer funktionellen Gruppe sowohl gesteigerte als auch verminderte Expressionsraten zeigen.



- [C] Energy production and conversion
- [D] Cell cycle, cell division, chromosome partitioning
- [E] Amino acid transport and metabolism
- [F] Nucleotide transport and metabolism
- [G] Carbohydrate transport and metabolism
- [H] Coenzyme transport and metabolism
- [I] Lipid transport and metabolism
- [J] Translation, ribosomal structure and biogenesis
- [K] Transcription
- [L] Replication, recombination and repair
- [M] Cellwall/membrane/envelope biogenesis
- [N] Cell motility
- [O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones
- [P] Inorganic ion transport and metabolism
- [Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism
- [R] General function prediction only
- [S] Function unknown
- [T] Signal transduction mechanisms
- [U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport
- [V] Defense mechanisms
- [n.c.] Not categorized

Abb. 3: Funktionelle Gruppierung der nach Hitzeschock differentiell exprimierten Gene von *C. jejuni*, *C. coli* und *C. lari*
 up: gesteigerte Expression, down: verringerte Expression

Danksagung

Diese Studie wurde im Rahmen des Projektes "Food-Borne Zoonotic Infections of Humans (FBI Zoo)" durchgeführt, welches vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert wurde. Teile dieser Arbeit wurden im Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg durchgeführt.

Literatur

- [1] Blomberg, P. et al. (1990): Control of Replication of Plasmid R1 - the Duplex between the Antisense Rna, Cops, and Its Target, Copt, Is Processed Specifically Invivo and Invitro by Rnase-III. Embo Journal. 9(7), 2331-2340
- [2] Förstner et al., unpublished
- [3] Hoffmann S, et al. (2009) Fast mapping of short sequences with mismatches, insertions and deletions using index structures. PLoS Comput Biol. 9 Sep; 5(9)
- [4] Anders, S. and Huber, W. (2010): Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol. 11(10), R106

