

Carolyn Riedel<sup>1</sup>, Christian Thomas<sup>2</sup>, Greta Götz<sup>1</sup>, Daniel Pleva<sup>1</sup>, Thomas Alter<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>Institut für Lebensmittelhygiene, Freie Universität Berlin <sup>2</sup>Beuth Hochschule für Technik Berlin

## Einleitung

*Yersinia (Y.) enterocolitica* ist ein wichtiger bakterieller Erreger von lebensmittelbedingten Durchfallerkrankungen beim Menschen. Im Gegensatz zu einigen anderen *Enterobacteriaceae* ist *Y. enterocolitica* zu einer Vermehrung bei Kühl- und Gefriertemperaturen (bis zu -2 °C) fähig. Bisher stehen nur wenige Informationen über stammspezifische Unterschiede und die molekularen Mechanismen der Anpassung an einen Kälteschock bei *Y. enterocolitica* zur Verfügung. In der vorliegenden Studie wurden *Y. enterocolitica*-Isolate der Serotypen O:3, O:5, O:8, O:9 und O:5,27 wurden hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens und Änderungen in der Genexpression bei 4 °C untersucht.

## Material und Methoden

### Phänotypische Untersuchungen

Das Wachstum bei 4 °C von 55 *Y. enterocolitica*-Isolaten (aus Lebensmitteln, tierischen und humanen Proben) unterschiedlicher Bio- und Serotypen wurde untersucht. Aus Vorkulturen in Brucella Bouillon (BB, BD) wurden Kulturen mit ca.  $5 \times 10^1$  KbE/ml beimpft und bei 4 °C 168 h inkubiert. Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden 1:10 Verdünnungen auf PC-Agar ausplattiert und nach 24 h des Bebrütens bei 28 °C die KbE/ml ermittelt.

### Induktion von Kältestress, Isolierung und Behandlung der RNA

Vorkulturen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt (ca.  $10^7$  KbE/ml) und 2 h bei 28 °C bebrütet (OD<sub>600</sub> von 0,1 bis 0,2). Aus dieser Kultur wurden 12 ml für 2 min bei 7200 g zentrifugiert, resuspendiert und die Kultur 2 h bei 4 °C inkubiert. Als Kontrolle wurde eine für 2 h bei 28 °C inkubierte Probe mitgeführt. Die RNA wurde unter Verwendung einer Hot-Phenol-Methode extrahiert. Die cDNA-Synthese wurde mit dem First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### RT-qPCR

Für die RT-qPCR wurde der Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, Deutschland, München) verwendet. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer3 Software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) auf der Genomsequenz von *Y. enterocolitica* 8081 (NCBI accession no. NC\_008800.1 und NC\_008791.1) designt. Die quantitative Expressionsanalyse wurde mit der CFX Manager Software (BioRad) durchgeführt. Die Genexpression wurde auf die Haushaltsgene *polA* und *gapA* normalisiert.

## Ergebnisse

Die meisten *Y. enterocolitica*-Isolate (47/55) erreichten nach 168 h eine Zellzahl von  $10^7$ - $10^8$  KbE/ml (Abb. 1), während nur wenige Stämme (8/55) eine Vermehrung bis zu  $10^2$ - $10^6$  KbE/ml aufwiesen. Zu den acht Isolaten, die eine geringe Vermehrung zeigten, gehören sieben Isolate der Serogruppe O:8 und ein Isolat der Serogruppe O:5,27 an. Die Stämme der Serogruppen O:3, O:5, und O:9 vermehrten sich alle bis zu einer Zellzahl von  $10^7$  bis  $10^8$  KbE/ml.

Die aus Tieren isolierten *Y. enterocolitica*-Stämme wiesen eine hohe Vermehrungsrate ( $10^7$ - $10^8$  KbE/ml) auf (Abb. 2). Bis auf ein Isolat (*Y. e.* 44B) gilt dies auch für alle aus dem Lebensmittel isolierten Stämme. Die vom Menschen isolierten Stämme zeigten hingegen deutliche Unterschiede in der Vermehrungsfähigkeit bei 4 °C.

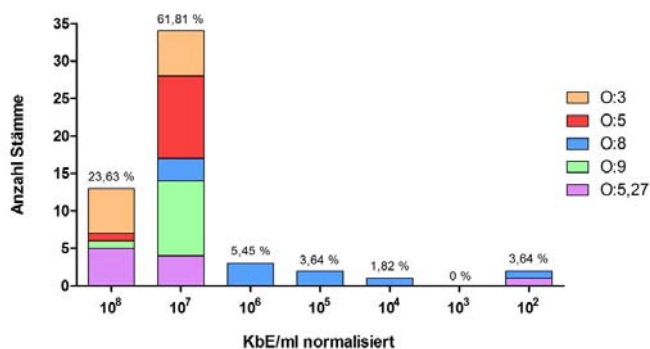


Abb. 1: Anstieg der Zellzahl verschiedener *Y. enterocolitica*-Isolate nach 168 h bei 4 °C und Einfluss der Serogruppe auf das Wachstumsverhalten. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3

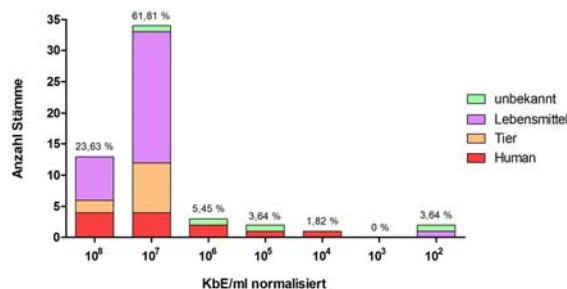


Abb. 2: Anstieg der Zellzahl verschiedener *Y. enterocolitica*-Isolate nach 168 h bei 4 °C und Einfluss der Herkunft auf das Wachstumsverhalten. Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3

Die fünf *Y. enterocolitica*-Isolate mit der geringsten Vermehrung bei 4 °C zeigen einen unterschiedlich langsamen Anstieg der Zellzahlen. Anders als bei den stark vermehrenden Stämmen (z. B. I17D, siehe Abb. 3) erreichen sie kein Plateau. Nach 48 h zeigten alle Stämme signifikante Unterschiede zu *Y. e.* I17D. Sie zeigen untereinander größere Unterschiede im Wachstum als die Stämme mit einer starken Vermehrungsrate bei 4 °C (Daten nicht gezeigt).

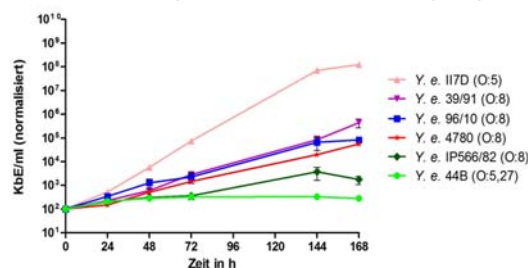


Abb. 3: Wachstum von fünf *Y. enterocolitica*-Isolaten mit niedrigen Wachstumsraten sowie des Isolats mit der höchsten Zellzahl nach 168 h bei 4 °C (*Y. e.* I17D). Dargestellt sind die normalisierten Mittelwerte  $\pm$  SEM, n=3

Für die Genexpressionsstudien wurden Stämme mit einer starker Vermehrung (*Y. e.* I17D und *Y. e.* I1115D) sowie Stämme mit einer niedrigen Vermehrungsrate bei 4 °C (*Y. e.* 4780, *Y. e.* 8081 und *Y. e.* 44B) untersucht. Alle Stämme zeigen nach 2 h eine deutliche Expression von *cspA* und *cspB* (Abb. 4). Bei *Y. e.* I17D und *Y. e.* I1115C (beide O:5) war diese Induktion deutlich höher als bei *Y. e.* 8081 und *Y. e.* 4780 (beide O:8). Die Höhe der Induktion von *cspA* und *cspB* bei *Y. e.* 44B (O:5,27) lag zwischen den O:5- und O:8-Stämmen. Auch *uphC* und *prp* zeigten eine deutliche Kälteinduktion, wobei zwischen den Stämmen kaum Unterschiede in der Höhe der Expressionsänderung auftraten, welche das unterschiedliche Wachstumsverhalten der *Y. enterocolitica*-Isolate allerdings nicht erklären (Daten nicht gezeigt).

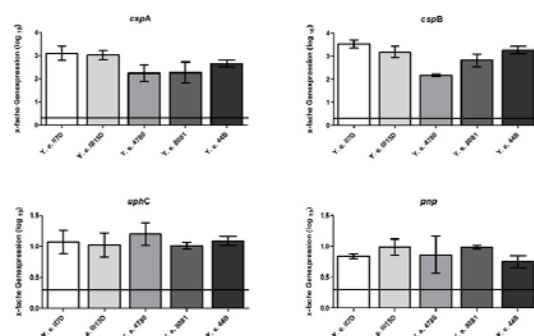


Abb. 4: Relative Quantifizierung von vier ausgewählten Kälteschockgenen nach 2 h bei 4 °C von *Y. enterocolitica*-Stämmen mit unterschiedlichem Wachstumsverhalten.

## Zusammenfassung

- Y. enterocolitica*-Isolate zeigen Unterschiede in ihrer Fähigkeit, sich bei 4 °C zu vermehren, wobei die Serogruppe O:8 die geringsten Vermehrungsraten zeigt. In weiteren Untersuchungen soll der Einfluss der Serogruppe auf das Wachstumsverhalten weiterführend untersucht werden.
- Isolate aus Lebensmitteln und Tieren zeigen ausschließlich hohe Wachstumsraten, anders als einige Humanisolate. Die Frage, ob eine verbesserte Anpassungsfähigkeit der Humanstämme an die Körpertemperatur des Menschen zu einem Rückgang der Fähigkeit, sich bei Kühltemperaturen zu vermehren, führt, bleibt ohne weitere Untersuchungen vorerst offen.
- Die Unterschiede in der Expression klassischer Kälteschockgene können die unterschiedlichen Wachstumsraten bisher nicht erklären. Um die Mechanismen der Kälteschockantwort zu charakterisieren, können Transkriptomstudien eine vielversprechende Methode darstellen.

