

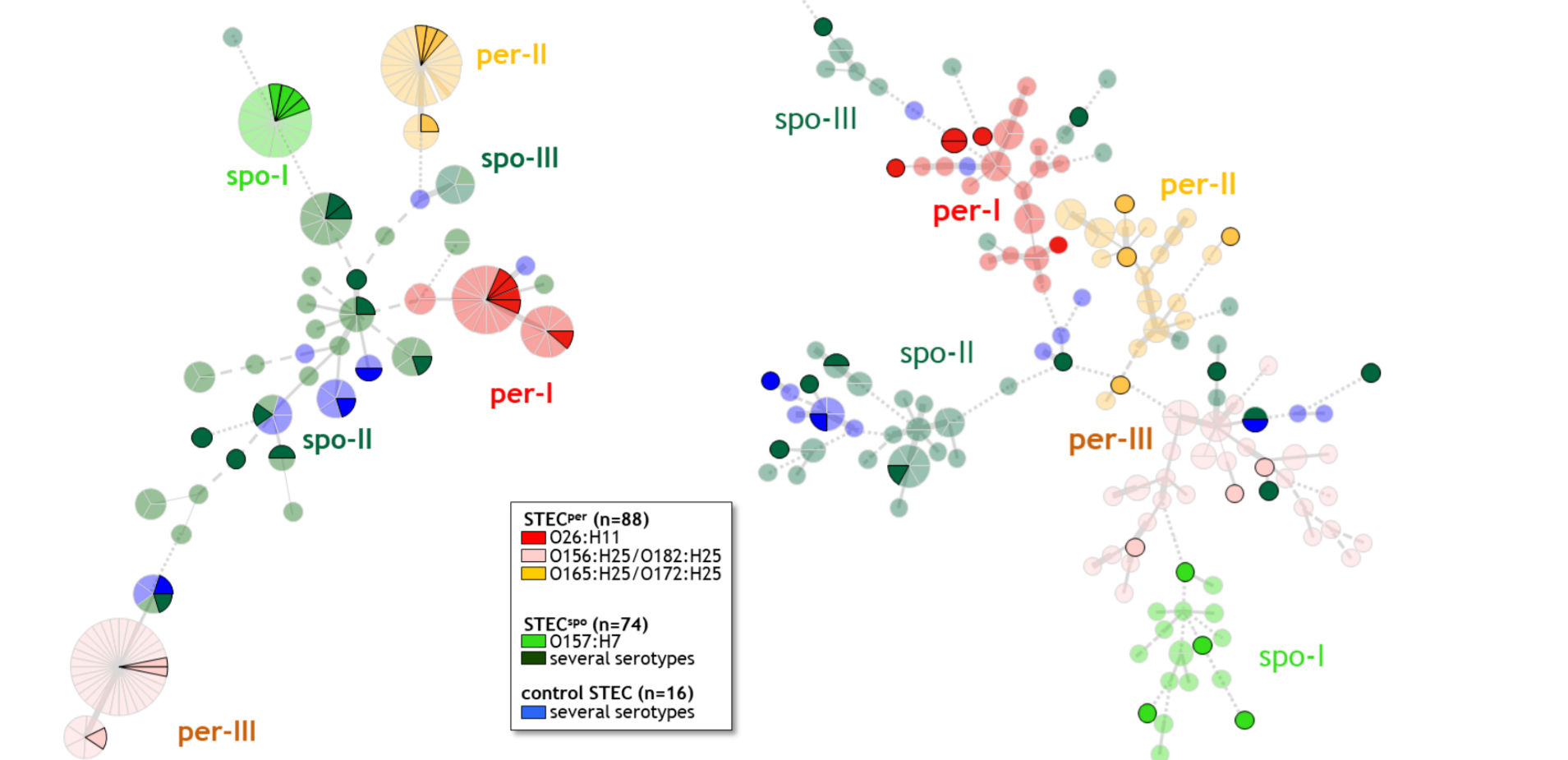
Metabolische Eigenschaften von STEC-Stämmen mit unterschiedlichem Kolonisationsverhalten im Gastrointestinaltrakt des Rindes

Stefanie A. Barth¹, Michael Weber¹, Katharina Schaufler^{2,3}, Christian Berens¹, Lutz Geue^{1†}, Christian Menge¹

Hintergrund

core-Genom (MLST)
 Die STEC^{per}-Cluster liegen peripher am Ende der Äste.

akzessorisches Genom (VAG)
 Die STEC^{per} clustern im Zentrum des Baumes.



Repräsentative Auswahl der STEC-Stämme für die aktuellen Untersuchungen.
 Die STEC-Stämme wurden aus der in den Abbildungen dargestellten und publizierten Stammsammlung boviner STEC ausgewählt. Die jetzt weiter analysierten STEC-Stämme sind durch einen schwarzen Rahmen und intensivere Farbe hervorgehoben. Die Abbildung zeigt MSTs der Stämme basierend auf ihrem MLST (links) bzw. dem Vorkommen oder Fehlen von 71 Virulenz-assoziierten Genen [VAGs] (rechts). Abbildung modifiziert nach Barth et al. (2016).

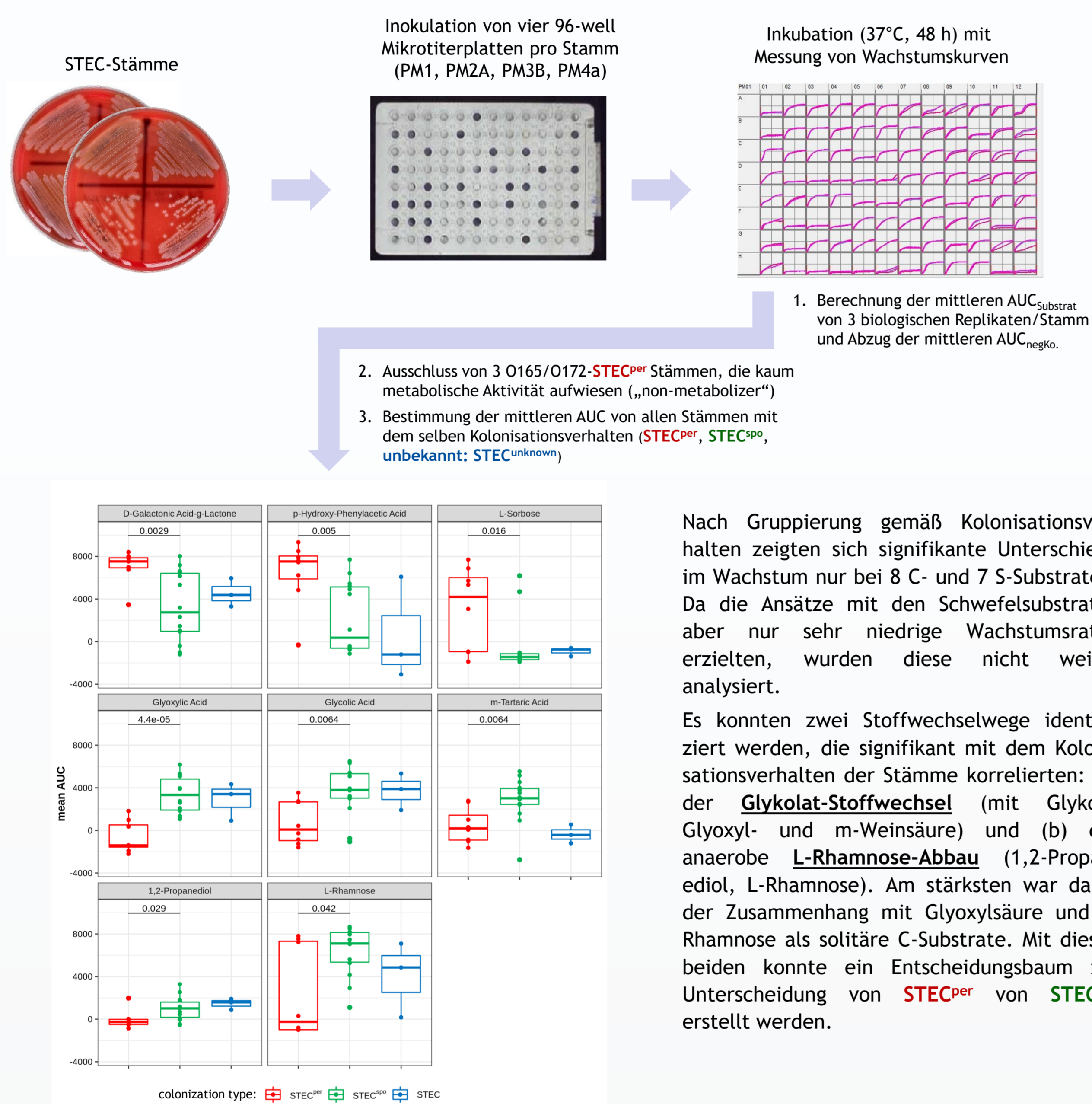
Die Fähigkeit bestimmter STEC-Stämme den Intestinaltrakt von Rindern persistent (STEC^{per}) oder sporadisch (STEC^{spo}) zu besiedeln hängt vom akzessorischen Genom des Stammes ab (Barth et al., 2016). Zusätzlich könnten aber auch Merkmale, die nicht zu den klassischen Virulenzfaktoren gerechnet werden, für das spezifische Kolonisationsverhalten der Stämme entscheidend sein. Um dies zu klären, haben wir 28 STEC-Stämme entsprechend ihres Kolonisationsverhaltens (11 STEC^{per}, 14 STEC^{spo} und 3 STEC mit unbekanntem Kolonisationstyp), sowie ihres VAG- und MLST-Profiles ausgewählt und ihre Gesamtgenome sequenziert (Illumina). Außerdem wurde bei diesen Stämmen die metabolische Aktivität (Nutzung verschiedener Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor- und Schwefelquellen) und die Biofilmproduktion quantitativ erfasst.

Zusammenfassung

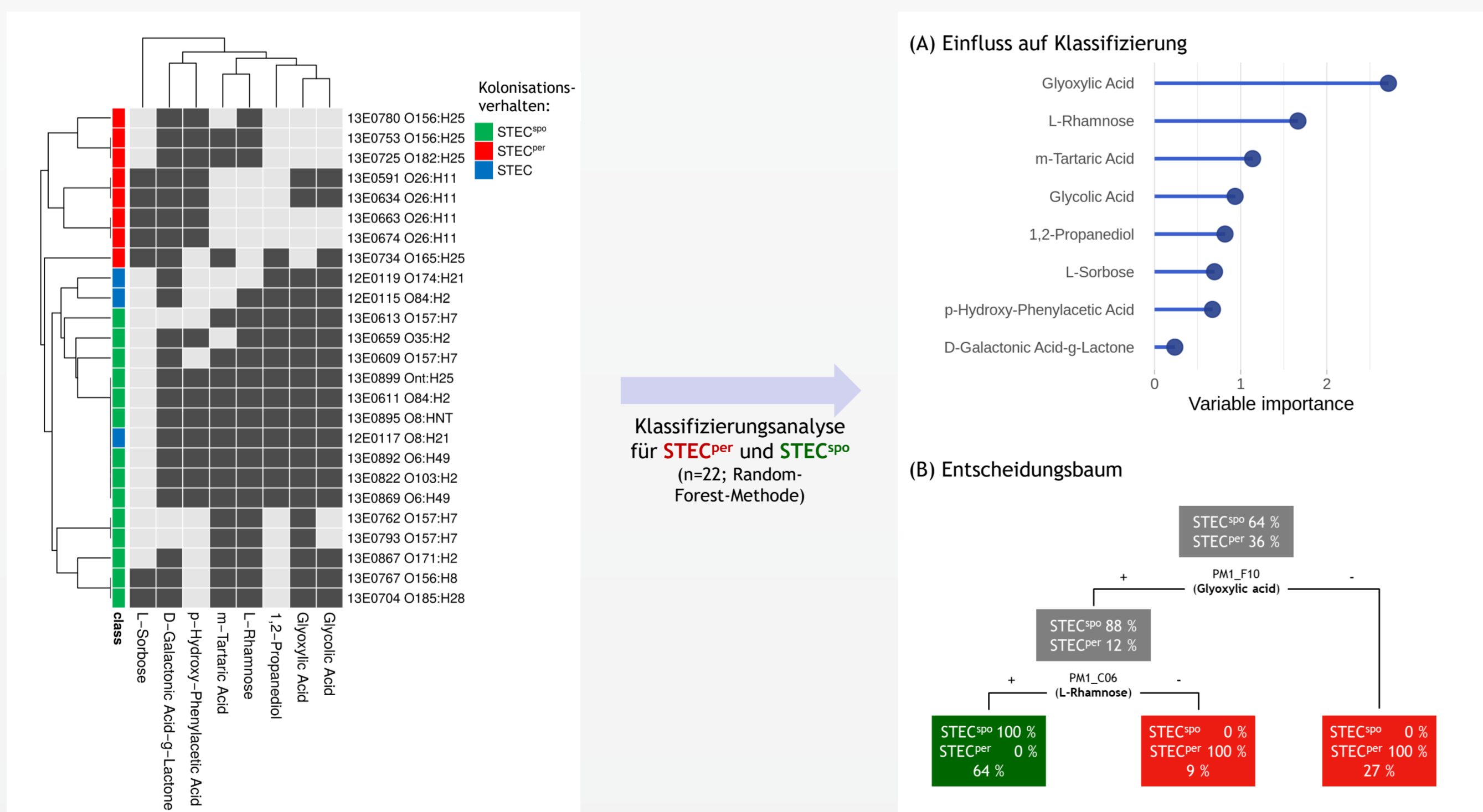
- ⇒ Ein STEC^{per}-spezifisches metabolisches Profil wurde nicht identifiziert.
- ⇒ STEC^{spo} scheinen besser an das Überleben in der Umwelt angepasst zu sein (mehr Biofilm bei niedrigeren Temperaturen, Stoffwechselung von Glykol- und Glyoxylsäure, die beide als Zwischenprodukte bei der Photorespiration von Pflanzen entstehen) als STEC^{per}.
- ⇒ In der Nutzung von Glyoxylsäure und L-Rhamnose unterschieden sich STEC^{per} und STEC^{spo} am stärksten.
- ⇒ Die Unfähigkeit diese Schlüsselsubstrate zu nutzen konnte größtenteils auf Mutationen in den verantwortlichen Operons zurückgeführt werden.
- ⇒ Zukünftige Transkriptomanalysen sollten die Diskrepanzen zwischen der genetischen Ausstattung und dem Phänotyp bei einigen Stämmen klären.
- ⇒ Die Überprüfung der gefundenen Unterschiede an einer größeren STEC-Kollektion mit umfangreichen Metadaten ist geplant.
- ⇒ Langfristig könnten bei Ausbruchsanalysen über die Klassifizierung als STEC^{per} und STEC^{spo} bessere Rückschlüsse auf Infektionsquellen möglich sein.

Ergebnisse

Metabolische Aktivität (Phenotype MicroArray, Biolog®) von STEC-Stämmen in Abhängigkeit von ihrem Kolonisationsverhalten.



Clusteranalyse und Klassifizierung von metabolischen Schlüsselreaktionen

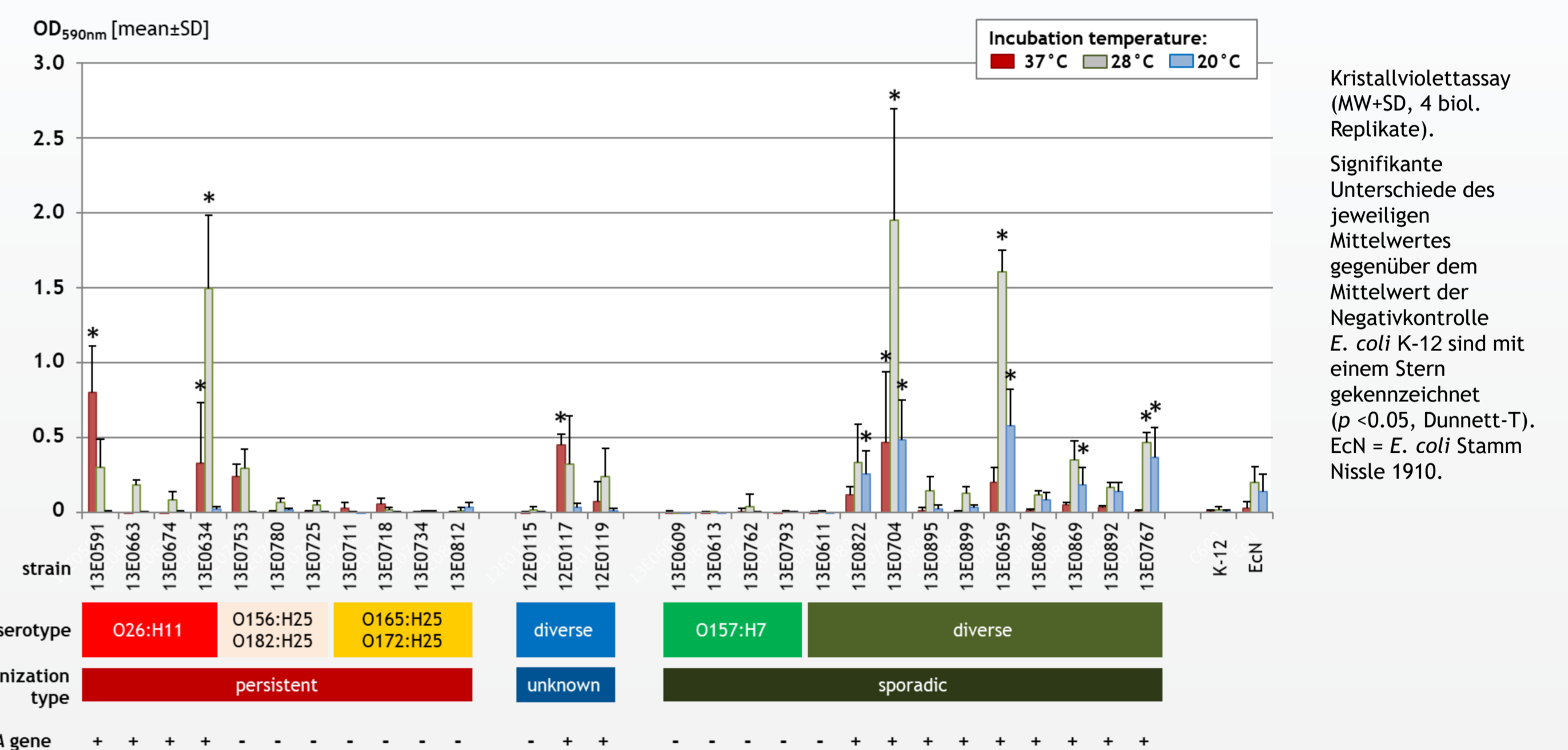


Produktion von Biofilm

bei STEC-Stämmen nach Inkubation in LB-Medium ohne NaCl in PS-Mikrotiterplatten bei verschiedenen Inkubationstemperaturen über 48 h.

STEC^{spo}-Stämme produzieren im Mittel bei niedrigerer Anzuchttemperatur (20°C) signifikant mehr Biofilm als STEC^{per}, was auf eine Temperaturabhängigkeit hindeutet. Diese Beobachtung passt zu den Daten von Méric et al. (2013), dass von Pflanzen isolierte *E. coli* bei Anzuchttemperaturen unterhalb der Körpertemperatur von Säugetieren mehr Biofilm produzieren, als die von Säugetieren selbst isolierte *E. coli*.

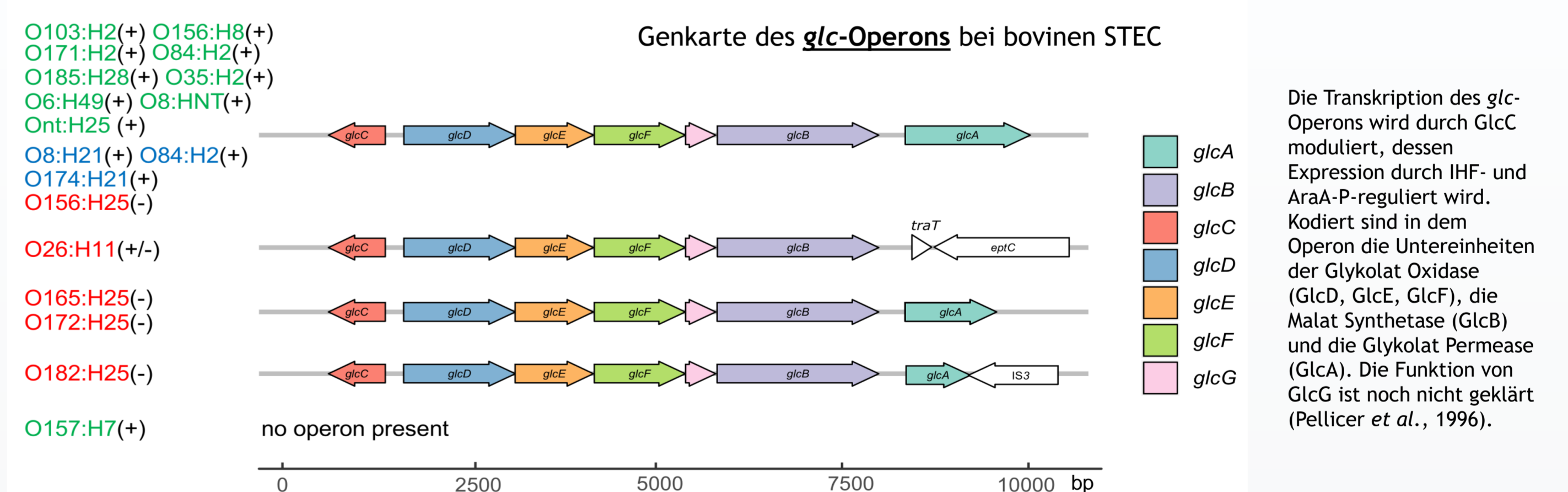
Bei Abgleich der genomischen Daten zum Vorkommen von Genen (*adrA*, *mlrA*, *rpoS*, *crl*, *flu*) und Operons (*bcs*, *csg*), die mit der Biofilm-Bildung in Verbindung gebracht werden, konnte nur für *mlrA* ein direkter Zusammenhang mit der phänotypisch nachweisbaren Biofilm-Bildung gezeigt werden.



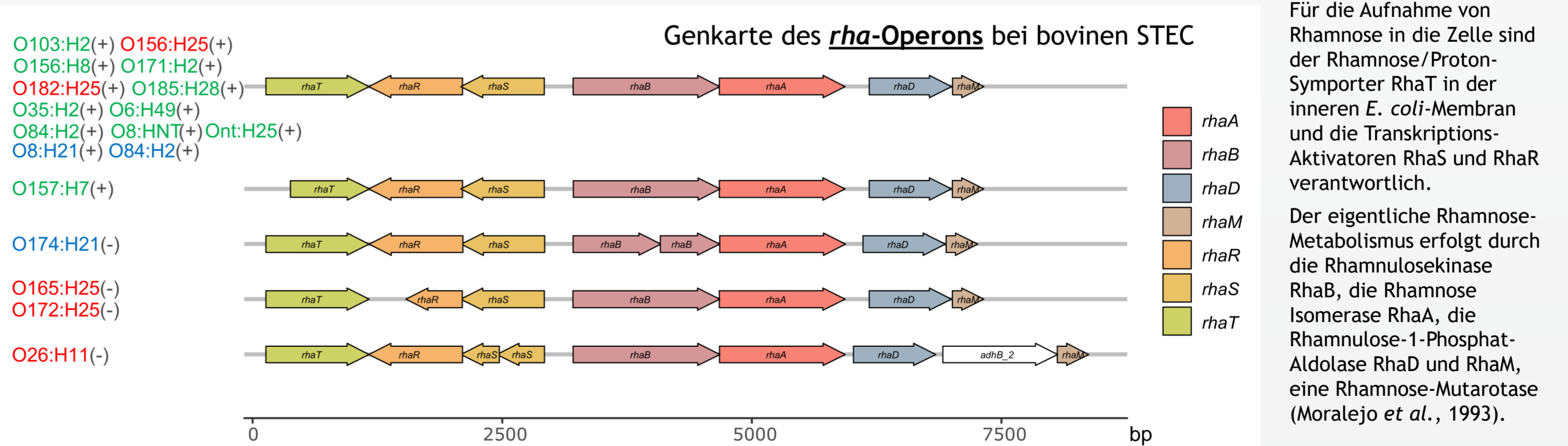
Genomanalyse

zur Identifikation des genetischen Hintergrundes für die unterschiedlichen Phänotypen bei der Verstoffwechslung der beiden wichtigsten Substrate Glyoxylsäure und L-Rhamnose

Aufnahme und Verstoffwechslung von Glyoxyl- und Glykolsäure wird durch Proteine vermittelt, die im *glc*-Operon kodiert werden. Die Analyse der *glc*-Gene zeigt, dass insbesondere die Integrität und das Vorhandensein der Permease GlcA (verantwortlich für die Aufnahme in die Bakterienzelle) eng mit dem Phänotyp verknüpft ist. Aber drei Ausnahmen wurden ersichtlich: (1) beide O156:H25-STECP^{per} besitzen ein vollständiges *glc*-Operon, sind aber nicht in der Lage Glyoxyl- und Glykolsäure zu verstoffwechseln, (2) allen vier O26:H11-STECP^{per} fehlt das *glcA*-Gen, zwei Stämme sind aber Stoffwechsellkompetent und (3) den vier O157:H7-STECP^{per} fehlt das komplette Operon, aber phänotypisch sind sie positiv.



Aufnahme und Verstoffwechslung von L-Rhamnose wird durch ein Genprodukt aus dem *rha*-Operon ermöglicht. Bei L-Rhamnose-negativen Stämmen sind verschiedene Gene (*rhaB*, *rhaS*, *rhaR*) defekt, was die Unfähigkeit L-Rhamnose zu verstoffwechseln erklären könnte. Auffällig war, dass eine 55 Aminosäuren-lange N-terminale Verkürzung des eigentlich 344 Aminosäuren langen Rhamnose/Proton-Symporters RhaT, die Aktivität in den vier O157:H7-STECP^{per} nicht beeinträchtigte.



Die genetischen Analysen erfolgten unter Zuhilfenahme der R Pakete rtracklayer, Biostings und gggenes. Für die Sequenzabgleiche wurden die jeweiligen Proteinsequenzen mit blast in allen annotierten und translatierten Genen der STEC-Genome gesucht. Als Grenzwert zur Wiederfindung wurden mind. 40% Sequenzidentität und mind. 50% Sequenzabdeckung vorgegeben. Serotypen in rot stehen für STEC^{per}, in grün für STEC^{spo}; der jeweilige Phänotyp für (A) Glyoxylsäure- und (B) L-Rhamnose-Verstoffwechslung ist in Klammern dargestellt (-, negativ; +, positiv).

Literatur

Barth et al. 2016. Appl. Environ. Microbiol., 82:5455-5464.
 Bertin et al. 2013. Environ. Microbiol., 15:610-622.
 Kerangart et al. 2018. Int. J. Food Microbiol., 266:324-336.
 Méric et al. 2013. Environ. Microbiol., 15:487-501.
 Miller. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Moralejo et al. 1993. J. Bacteriol. 175: 5585-5594.
 Pellicer et al. 1996. J. Bacteriol. 178: 2051-2059.

Die hier vorgestellten Daten wurden in dem Manuskript Barth et al. 2020. Toxins. 2020. 12(6):414 publiziert.

Institutionen

¹ Institut für molekulare Pathogenese, Friedrich-Loeffler-Institut (FLI), Jena
² Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, Freie Universität Berlin
³ aktuell: Universität Greifswald, Institut für Pharmazie, Greifswald
[†] In memoriam

Korrespondenz

Dr. Stefanie Barth
 Friedrich-Loeffler-Institut/Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit
 Institut für molekulare Pathogenese
 Naumburger Str. 96a • 07743 Jena
stefanie.barth@fli.de

Dankagung

Deutsche Forschungsgemeinschaft
 DFG
 Diese Studie wurde finanziell von der DFG (n° GE2509/1-1) unterstützt.