

Expression analysis of cold stress responses in listeria monocytogenes by microarray analysis and phenotypic characterization associated with cold stress

Doctoral Thesis

Author(s):

Arguedas Villa, Carolina

Publication date:

2013

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-009787064>

Rights / license:

In Copyright - Non-Commercial Use Permitted

DISS. ETH NO. 21232

**EXPRESSION ANALYSIS OF COLD STRESS RESPONSES IN LISTERIA MONOCYTOGENES
BY MICROARRAY ANALYSIS AND PHENOTYPIC CHARACTERIZATION ASSOCIATED
WITH COLD STRESS**

A dissertation submitted to
ETH ZURICH

for the degree of
Doctor of Sciences

presented by
CAROLINA ARGUEDAS VILLA

Master of Science UZH
born March 23, 1980
citizen of
COSTA RICA

accepted on the recommendation of

PROF. DR. MARTIN LOESSNER, examiner
and
PROF. DR. ROGER STEPHAN, co-examiner

2013

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen with a high mortality rate in humans ranging between 20 and 30%, where the illness, listeriosis, can manifest an invasive disease in the elderly, the young, and immunocompromised individuals, as well as in pregnant women and their unborn fetuses. The disease is mainly (>99%) linked to food vehicles. The fact that this bacterium is able to survive and grow at refrigeration temperatures therefore appears to be critical for transmission of this pathogen. The growth of this bacterium on a wide range of foods, especially ready-to-eat (RTE) products has been well documented worldwide. In addition, the fact that the infectious dose is unknown has defined different control parameters in products, ranging from zero tolerance to low numbers in foods that do not support the growth of this pathogen. Nevertheless, the incidence of listeriosis is on the rise, with reports of outbreaks and recalls almost every year from different parts of the world.

Considered a psychotropic organism, *L. monocytogenes* grows between -0.4 to almost 50°C. Normally, the growth at temperatures below 4°C is very slow, with long lag phases, but it has already been reported that some of the organisms from this species are still able to grow more efficiently at refrigeration temperatures, with lag phases that are as low as 7 h in BHI broth. In this context the strain variability of this pathogen comes to play a major role in view of preservation measures during shelf life of certain food products. Additionally, a variety of other factors influence growth rate and lag-phase duration in this bacterium when present in foods, including water activity, pH, and presence of inhibitors such as organic acids. Therefore, the knowledge of the specific mechanisms that are used by this bacterium under cold exposure and other stress conditions is fundamental to the development of adequate preservation strategies.

Bacteria exposed to low temperatures must overcome well-recognized problems, including changes in membrane fluidity that affects transport and uptake of nutrients, negative supercoiling of DNA, which could lead to problems for replication and transcription, secondary structures in RNA that could affect translation, reduced enzymatic activity and slow protein folding. The adaptation towards full cold acclimation in bacteria consists of different stages, where it might be expected that the gene expression also vary according to the specific phase. According to available data, the genetic diversity existing in different *L. monocytogenes* strains could be a factor associated with the specific responses to cold and other stresses present in the food production environment.

In this work, different phenotypic and genetic based approaches were used to gain more insights into molecular and physiological responses attributed to cold adaptation in *L. monocytogenes*. In the first study presented in Chapter 1, a collection of twenty Swiss *L. monocytogenes* strains isolated from food and listeriosis cases were investigated based on analysis of cold growth phenotypes and selected cold adaptation gene expression responses. Relative to the rest of the strains tested, there were two groups of five strains each that displayed enhanced (cold growth lag phase in BHI at 4°C <60h) and poor (lag phase in BHI at 4°C >200h) cold adaptability. Upon exposure to cold, gene expression analysis showed that the more cold tolerant strain group responded more efficiently through higher transcription-

al activation of *cspA* and *pgpH* genes compared to the poor cold adapting strain group.

To expand the initial findings described above, an extended study presented in Chapter 2 was undertaken. Two larger and geographically diverse strain collections based on strains isolated from Switzerland and Canada were further compared based on cold phenotypic analysis as well as molecular and genetic characterization approaches. Interestingly in both strain collections, the strains could be similarly divided into three different cold growth categories, which comprise of fast (lag phase at 4°C <70h), intermediate (lag phase at 4°C 70-200h) and slow (lag phase >200h) cold adaptors. The two strain collections were, however, shown to be genetically diverse using different genotyping methods including pulse field gel electrophoresis (PFGE) and sequencing of the *sigL* gene. No associations could be established between the cold growth phenotypic categories and gene expression response of various putative and confirmed cold-adaptation genes.

In chapter 3, a transcriptomic-based study of the early cold acclimation responses in *L. monocytogenes* EGD-e is presented. A cold-regulon during early lag-phase during cold acclimation was described, where EGD-e was found to alter the gene expression in 382 genes (243 up-regulated and 139 down-regulated) over two hours of lag-phase associated cold acclimation. Up-regulated gene functions included transport and metabolism of nutrients, synthesis of proteins, amino acids and DNA, transcription, energy generation, cell envelope modification and cell division. Furthermore, some of these cold-acclimation responses included genes that were previously described associated with later stages of the cold adaptation process as well as in other stress responses of this pathogen.

Chapter 4 compiles a study that, using transcriptomics and physiological experiments, compares the cold induced responses found among two *L. monocytogenes* strains that differ in cold adaptation proficiency: EGD-e and Lm60, where the first strain was categorized in chapter 1 as a slow cold-adaptor with a lag phase > 200 h whereas Lm60 was found to be a fast cold-adaptor with a lag-phase <10 h during the same cold-growth conditions. The goal was to examine the molecular and physiological bases for the better cold adaptation capacity in Lm60. Specific cold-adaptation gene groups were defined for Lm60 and EGD-e. Furthermore, the physiological implications of this cold-related gene activation were evaluated and additional differences were found in their physiological responses to specific conditions.

Overall, the results obtained from this work contribute to expand the current knowledge in view of *L. monocytogenes* cold-stress responses and their mechanism associated. It also demonstrates the wide genetic diversity present in *L. monocytogenes*, although this diversity seems not to play a role in view of adaptability that favors some strains under specific conditions. These findings contribute for a better understanding of the cold adaptation abilities in *L. monocytogenes*, where processes as iron acquisition, specific sugar transport and usage as well biofilms formation dynamics in this pathogen might be further explored. There are also open possibilities for new and improved strategies to control this pathogen in different foods, where this awareness should be take into consideration when establishing food regulations for this pathogen. All potential conditions should be included to determine novel and improved mechanism (s) to avoid growth of this bacterium at low temperatures.

ZUSAMMENFASSUNG

Listeria monocytogenes ist ein Lebensmittel assoziierter Infektionserreger, der mit einer hohen Sterblichkeitsrate von 20 bis 30% verbunden ist. Listeriose kann eine invasive Erkrankung bei älteren, jungen, immungeschwächten sowie bei schwangeren Personen und ihren ungeborenen Föten verursachen. In 99% der Fälle wird die Krankheit durch kontaminierte Lebensmittel übertragen. Die Tatsache, dass dieser Erreger bei Kühltemperaturen wachsen kann, scheint für die Krankheitsentstehung sehr bedeutend zu sein. Das Wachstum dieses Bakteriums ist in einer Vielzahl von Lebensmitteln, vor allem in ready-to-eat (RTE) Produkten, weltweit beschrieben. Zudem hat die Tatsache, dass die infektiöse Dosis unbekannt ist, verschiedene Kontrollparameter definiert. Diese reichen von einer Null Toleranz bis zu niedrigen Werten in Lebensmitteln, die das Wachstum von *L. monocytogenes* nicht unterstützen. Trotzdem nimmt die Häufigkeit der Fälle in weltweit zu.

Als ein psychrotropher Organismus wächst *L. monocytogenes* bei Temperaturen zwischen -0,4 bis zu fast 50 ° C. Normalerweise ist das Wachstum bei Temperaturen unter 4 ° C sehr langsam und mit einer langen lag-Phase verbunden. Jedoch wurde bereits berichtet, dass einige der Organismen dieser Spezies in der Lage sind, bei Kühltemperaturen gut zu wachsen. Lag-Phase von weniger als 7 Stunden in BHI wurden dokumentiert. In diesem Zusammenhang spielt die Stammvariabilität dieser Erreger eine wichtige Rolle. Zusätzlich beeinflusst eine Vielzahl von anderen Faktoren die Wachstumsrate und Dauer der lag-Phase dieses Bakteriums im Lebensmittel inklusive Wasseraktivität, pH und Gegenwart von Inhibitoren, wie z. B. organische Säuren. Daher ist das Wissen über die spezifischen Mechanismen, die *L. monocytogenes* unter Kälte und anderen Stress-Bedingungen nutzt grundlegend für die Entwicklung von adäquaten Konservierungsverfahren.

Bakterien, die tiefen Temperaturen ausgesetzt sind, müssen bekannte Hürden überwinden: z.B. Änderungen der Membranfluidität, welche den Transport und die Aufnahme von Nährstoffen beeinflussen, negative Supercoiling der DNA, was zu Problemen in der Replikation und Transkription führen kann, sekundäre Strukturen der RNA, die die Translation beeinflussen können, reduzierte enzymatische Aktivität sowie langsame Proteinfaltung. Die Anpassung bis hin zur vollständigen Kälteakklimatisierung in Bakterien besteht aus verschiedenen Phasen, in denen eine variierende Genexpression zu erwarten ist. Basierend auf verfügbaren Daten könnte die genetische Diversifizierung innerhalb der verschiedenen *L. monocytogenes*-Stämme ein Faktor für die spezifischen Reaktionen auf Kälte und andere Stressfaktoren im Umfeld der Nahrungsmittelproduktion sein.

In dieser Arbeit wurden verschiedene phänotypisch und genetisch basierte Ansätze verwendet, um einen vertieften Einblick in die molekularen und physiologischen Reaktionen der Kälteanpassung in *L. monocytogenes* zu gewinnen. In der ersten Studie in Kapitel 1, wurden 20 Isolate von Patienten und Lebensmitteln im Hinblick auf Kälte- Wachstumsphänotypen und die Kälteanpassung der Genexpression untersucht. Im Vergleich zu den übrigen getesteten Stämme gab es zwei Gruppen von jeweils fünf Stämmen, die eine gute (Lag-Phase in BHI bei 4 ° C <60h) und schlechte (Lag-Phase in BHI bei 4 ° C >200h) Kälteanpassungsfähigkeit aufwiesen. Die Genexpressionsanalyse nach Kälteeinwirkung

zeigte, dass das kältetolerantere Stammkollektiv effizienter mit einer höheren transkriptionellen Aktivierung von *cspA* und der *pgpH* Gene reagierte, als das weniger kältetolerante Stammkollektiv.

Um die oben beschriebenen ersten Ergebnisse zu erweitern, wurde eine weitere Studie durchgeführt. Diese wird in Kapitel 2 beschrieben. Zwei umfangreiche und geografisch diversifizierte Stammsammlungen basierend auf Schweizer und Kanadischen Isolaten wurden mit der kältephänotypischen Analyse sowie mit molekularen und genetischen Methoden verglichen. Interessanterweise konnten bei beiden Stammsammlungen die Stämme in drei verschiedene Kältewachstums-Kategorien eingeteilt werden. Diese drei Kategorien bestehen aus den schnellen (Lag-Phase bei 4 ° C <70h), mittleren (Lag-Phase bei 4 ° C 70-200h) und langsamen (Lag-Phase > 200h) Kälteadaptoren. Es wurde anhand verschiedener Verfahren einschliesslich Puls-Feld-Gelelektrophorese (PFGE) und Sequenzierung des Gens *sigL* gezeigt, dass die beiden Stammsammlungen genetisch vielfältig sind. Es konnten keine Zusammenhänge zwischen den Kältewachstum phänotypischen Kategorien und Genexpression von verschiedenen vermeintlichen und bestätigten Kälteadaptierungsgene festgestellt werden.

In Kapitel 3 ist eine Transkriptom-basierte Studie der frühen Kälteakklimatisierungsreaktionen in *L. monocytogenes* EGD-e dargestellt. Ein Kälte-Regulon wurde während der frühen Lag-Phase unter Kälteakklimatisierung gefunden wobei EGD-e die Genexpression in 382 Genen (243 hochreguliert und 139 runterreguliert) während einer zweistündigen lag-Phase assoziierte Kälteakklimatisierung verändert. Hochregulierte Genfunktionen beinhalten den Transport und Stoffwechsel von Nährstoffen, die Synthese von Proteinen, Aminosäuren und DNA, die Transkription, Energieerzeugung, Modifikation der Zellhülle und Zellteilung. Ausserdem enthalten einige dieser Kälte-Akklimatisierung Reaktionen Gene, die zuvor in späteren Phasen des Kälteanpassungsprozesses sowie in anderen Stress-Reaktionen beschrieben wurden.

Kapitel 4 beschreibt eine Studie, in der Transcriptomics und physiologische Experimente verwendet wurden, um die Kälte-induzierten Reaktionen zwischen zwei *L. monocytogenes*-Stämmen, welche sich in ihrer Fähigkeit der Kälteanpassung unterscheiden, zu vergleichen: EGD-e wurde in Kapitel 1 als langsamer Kälte-Adaptor mit einem Lag-Phase > 200 h beschrieben, während Lm60 als schneller Kälte-Adaptor mit einem Lag-Phase < 10 h während der gleichen Wachstumsbedingungen beschrieben wurde. Das Ziel war es, die molekularen und physiologischen Grundlagen für die bessere Kälteanpassung in LM60 zu untersuchen. Spezifische Gen Gruppen der Kälteanpassung wurden für LM60 und EGD-e definiert. Darüber hinaus wurden die physiologischen Auswirkungen dieser kältebedingten Genaktivierung ausgewertet und zusätzliche Unterschiede in physiologischen Antworten auf bestimmte Bedingungen gefunden.

Insgesamt tragen die Ergebnisse dieser Arbeit zur Erweiterung des aktuellen Wissenstands im Hinblick auf *L. monocytogenes* Kälte-Stress-Reaktionen und dem damit verbundenen Mechanismus bei. Die grosse genetische Vielfalt in *L. monocytogenes*, die eine Rolle im Hinblick auf die Anpassungsfähigkeit einiger Stämme unter bestimmten Bedingungen spielt, wird demonstriert. Diese Ergebnisse ver-

gössern das aktuelle Verständnis im Hinblick auf die Kälte Anpassungsfähigkeiten in *L. monocytogenes*. Interessante Aspekte wie Eisenerwerb, spezifischer Zucker-transport und Nutzung sowie weitere Details der Biofilmbildung in diesem Erreger sollten weiterhin im Rahmen der Lebensmittelsicherheit untersucht werden. Darüber hinaus ist die Möglichkeit für neue und verbesserte Strategien der Kontrolle in Lebensmitteln gegeben. Dieses Wissen sollte bei der Etablierung von Vorschriften im Zusammenhang mit *L. monocytogenes* beachtet werden, um optimale Werkzeuge zur Vermeidung von Wachstum bei niedrigen Temperaturen zu entwickeln.