

Construction of deletion mutants in the phosphotransferase transport system and adenosine triphosphate-binding cassette transporters in *Listeria monocytogenes* and analysis of their growth under different stress conditions

Marina Ceruso,¹ Pina Fratamico,²
Claudia Chirollo,¹ Rosanna Tagliatalata,¹
Maria Luisa Cortesi,¹ Tiziana Pepe¹

¹Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi Federico II, Napoli, Italy; ²United States Department of Agriculture (USDA), Eastern Regional Research Center (ERRC), Wyndmoor, PA, USA

Abstract

Functional genomics approaches enable us to investigate the biochemical, cellular, and physiological properties of each gene product and are nowadays applied to enhance food safety by understanding microbial stress responses in food and host-pathogen interactions. *Listeria monocytogenes* is a food-borne pathogen that causes listeriosis and is difficult to eliminate this pathogen since it can survive under multiple stress conditions such as low pH and low temperature. Detailed studies are needed to determine its mode of action and to understand the mechanisms that protect the pathogen when it is subjected to stress. In this study, deletion mutants of phosphotransferase transport system genes (PTS) and adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette transporters (ABC) of *Listeria monocytogenes* F2365 were created using molecular techniques. These mutants and the wild-type were tested under different stress conditions, such as in solutions with different NaCl concentration, pH value and for nisin resistance. Results demonstrate that the behaviour of these deletion mutants is different from the wild type. In particular, deleted genes may be involved in *L. monocytogenes* resistance to nisin and to acid and salt concentrations. Functional genomics research on *L. monocytogenes* allows a better understanding of the genes related to stress responses and this knowledge may help in intervention strategies to control this food-borne pathogen. Furthermore, specific gene markers can be used to identify and subtype *L. monocytogenes*. Thus, future development of this study will focus on additional functional analyses of important stress response-related genes, as well as on methods for rapid and sen-

sitive detection of *L. monocytogenes* such as using DNA microarrays.

Introduzione

L'incidenza della listeriosi riportata dal Ministero della Salute Italiano è, negli ultimi anni, pari a circa 0,8 casi per milione di abitanti/anno (Gianfranceschi *et al.*, 2007). A differenza di molti microrganismi di origine alimentare, *L. monocytogenes* sopravvive e si moltiplica anche in alimenti sottoposti a differenti trattamenti tecnologici volti a prolungare la shelf-life degli alimenti. Al fine di contenere entro limiti accettabili il rischio di malattia alimentare connesso alla presenza di *L. monocytogenes*, si rende opportuno sviluppare strategie di intervento per il controllo di questo patogeno in alimenti sottoposti a differenti trattamenti tecnologici. La genomica funzionale studia le interazioni tra genoma e ambiente e questi studi forniscono informazioni importanti sui meccanismi che controllano i processi biologici e fisiologici di un organismo. La genomica funzionale, applicata allo studio dei patogeni responsabili di malattie alimentari, studia le loro attività metaboliche e funzionali, quali la resistenza agli antibiotici e l'espressione della virulenza, e le basi molecolari responsabili del loro adattamento a condizioni di stress. Tramite la manipolazione di alcuni tratti del genoma è possibile, pertanto, controllare l'espressione di un microrganismo (Abee *et al.*, 2004).

Scopo di questo studio è stato comprendere le basi genetiche che condizionano il comportamento di *L. monocytogenes* quando presente in alimenti con elevata salinità, pH acidi o in presenza di conservanti. Sono stati ottenuti mutanti di *L. monocytogenes* F2365 a seguito di delezione dei geni *phosphotransferase transport system* (PTS) ed *adenosine triphosphate* (ATP)-*binding cassette* (ABC) *transporters*.

Il *wild-type* *L. monocytogenes* F2365 è stato scelto come ceppo di riferimento in quanto il genoma è interamente sequenziato (Nelson *et al.*, 2004) e risulta maggiormente coinvolto in focolai di listeriosi di origine alimentare (Linnan *et al.*, 1988; Donaldson *et al.*, 2009). In letteratura è stata inoltre osservata una differenza di comportamento del ceppo F2365 per crescita, resistenza e virulenza in diverse tipologie di alimento (Nightingale *et al.*, 2007).

La delezione del gene ABC è stata prescelta poiché precedenti ricerche hanno dimostrato che la produzione delle proteine di trasporto codificate da questo gene è fortemente indotta a livello trascrizionale quando il batterio è presente nel latte (Liu e Ream, 2008). Il gene PTS è stato scelto per la delezione in quanto precedenti studi hanno dimostrato che le proteine

Correspondence: Tiziana Pepe, Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi Federico II, via Delpino 1, 80137 Napoli, Italy.
Tel. +39.081.2533905 - Fax: +39.081.292981.
E-mail: tiziana.pepe@unina.it

Key words: Food microbiology, Functional genomics, *L. monocytogenes*.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Received for publication: 15 January 2013.

Revision received: 2 July 2013.

Accepted for publication: 2 July 2013.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright M. Ceruso *et al.*, 2013
Licensee PAGEPress, Italy
Italian Journal of Food Safety 2013; 2:e38
doi:10.4081/ijfs.2013.e38

codificate da questo gene sono fortemente espresse da *L. monocytogenes* quando sottoposto a condizioni di stress, in particolare negli alimenti trattati con alte pressioni (Liu *et al.*, 2011).

Materiali e Metodi

I mutanti genici ottenuti ed il *wild-type* sono stati testati e comparati per la resistenza alla nisin, ed è stata valutata la crescita in soluzioni contenenti concentrazioni decrescenti di NaCl ed in terreni liquidi a diversi valori di acidità.

Delezione genica

La delezione dei geni di *L. monocytogenes* F2365 è stata effettuata mediante la tecnica molecolare *Splicing by overlap extension* (SOE) *polymerase chain reaction* (PCR) (Horton *et al.*, 1990). Il vettore utilizzato per la trasformazione è il pKSV7 (Smith and Youngman, 1992), resistente all'ampicillina. Per la digestione doppia del prodotto della SOE PCR e del vettore sono stati utilizzati gli enzimi KpnI (enzima di restrizione da *Klebsiella pneumoniae*) e XbaI (enzima di restrizione da *Xanthomonas badrii*) della *New England Biolabs* (Ipswich, MA, USA). Il prodotto della SOE PCR è stato legato con il vettore pKSV7 mediante incubazione in tampone di ligazione 5X, ligasi e H₂O bidistillata sterile, a temperatura ambiente per 1 h.

Trasformazione batterica

La trasformazione è stata effettuata, così come previsto in letteratura, mediante integrazione del vettore in *E. coli* usando il kit

commerciale *One shot top 10 chemically component E. coli* (C4040-03; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e seguendo le istruzioni della casa produttrice (Monk *et al.*, 2008). I trasformanti di *E. coli* sono stati selezionati su terreno Luria-Bertani (LB) agar contenente ampicillina ad una concentrazione di 100 µg/mL e X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-Dgalactopyranoside) (Calbiochem-Merck, Darmstadt, Germania). Una aliquota di 100 µL di prodotto di trasformazione batterica è stata trasferita su agar LB contenente X-Gal e le piastre sono state incubate overnight a 37°C. Le colonie bianche sono state selezionate per le fasi successive. Il plasmide di *E. coli* con il vettore pKSV7 all'interno del citoplasma è stato purificato utilizzando il kit commerciale *Qiaprep handbook for purification of molecular biology grade DNA: plasmid, large plasmids (>10 kb), low copy plasmids and cosmids, plasmid DNA prepared by other methods, QIAprep Miniprep Handbook 12/2006*, secondo le istruzioni del produttore, utilizzando un plasmide resistente al cloramfenicolo. La trasformazione di *L. monocytogenes* è avvenuta mediante elettroporazione in cuvette pre-raffreddata (1-gap mm; Biorad, Hercules, CA, USA) pulsata a 10 kV/cm, 400 Ω, e 25 µF.

Le cellule rigenerate sono state risospese in terreno liquido BHI [*brain and heart infusion* (BD)] e trasferite su agar BHI contenente l'antibiotico selettivo (cloramfenicolo, 10 µg/mL). Le piastre BHI/cloramfenicolo sono state incubate a 30°C per 3-4 giorni.

Integrazione del plasmide

Per avere l'integrazione del plasmide nel cromosoma *L. monocytogenes*, contenente il plasmide libero all'interno del citoplasma, è stata raccolta dalle piastre BHI/cloramfenicolo, inoculata in BHI/cloramfenicolo liquido (diluizione 1:1000), e coltivata a 40°C, con agitazione a 250 rpm. Un'aliquota di 2 µL di coltura è stata inoculata in 2 mL di BHI/cloramfenicolo liquido ed 100 µL di questa diluizione 1:1000 sono stati trasferiti su piastre BHI/cloramfenicolo preriscaldate a 40°C, incubate poi alla stessa temperatura per una notte. Lo shock termico ha consentito l'integrazione del plasmide all'interno del cromosoma del batterio (Monk *et al.*, 2008).

Selezione delle colonie trasformate

Il batterio così modificato è stato trasferito su piastre BHI e BHI/Cloramfenicolo. Le colonie cresciute solo su piastre BHI ed incapaci di moltiplicarsi sulle piastre BHI/cloramfenicolo rappresentano i ceppi che hanno perso il plasmide antibiotico-resistente. Queste colonie sono state sottoposte a screening per la presenza della mutazione cromosomica di interesse, mediante PCR. Il primo screening è stato effettuato mediante la visualizzazione delle dimensioni del frammento amplificato.

La dimensione attesa del frammento nel mutante è di circa 800 pb, mentre nel *wild-type* ha la dimensione di 800 pb più la dimensione del gene soppresso (~1,3 kb). La conferma della delezione del gene di interesse è stata ottenuta mediante sequenziamento del tratto interessato.

Condizioni di stress

L'analisi di verifica della crescita batterica è stata effettuata utilizzando lo spettrofotometro Safire II (Tecan, Männedorf, Switzerland) a 37°C, lettura *optical density* (OD) 600 nm, ogni ora, per 18 ore. La nisina di *Lactococcus lactis* è stata acquistata dalla Sigma. Sono state preparate soluzioni con una concentrazione decrescente di nisina (10, 5, e 2,5 µg/mL) in 0,02 N HCl. Per la crescita in soluzione acida è stato utilizzato il terreno liquido BHI portato a diversi valori di pH (3, 4 e 5) mediante aggiunta di HCl. La crescita in soluzione di NaCl è stata effettuata utilizzando tre soluzioni composte da minimal medium (MM) (Premaratne *et al.*, 1991) e NaCl (Sigma, St. Louis, MO, USA) in concentrazione decrescenti (5, 2,5 e 1,2 %).

Risultati

La metodica utilizzata ha consentito una corretta delezione dal genoma di *L. monocytogenes* F2365 dei geni PTS ed ABC *transporters*.

In soluzione contenente nisina alla concentrazione di 10 µg/mL è stato possibile osservare una inibizione completa della crescita di tutti e tre i ceppi oggetto di studio (*wild type*, *L. monocytogenes* F2365 mutato per il gene ABC e *L. monocytogenes* F2365 mutato per il gene PTS). In soluzione contenente nisina alla concentrazione di 5 µg/mL il *wild type* ha evidenziato una crescita regolare. Nei batteri privati del gene ABC si è osservata una crescita sensibilmente ridotta. Tali risultati evidenziano una maggiore sensibilità all'azione dell'antibiotico dei batteri mutati rispetto al *wild-type*. I batteri mutati per il gene PTS hanno evidenziato inibizione completa al test di crescita in soluzione contenente nisina (Figura 1). In soluzione contenente nisina alla concentrazione di 2,5 µg/mL sia il *wild type* che i batteri mutati hanno evidenziato una crescita regolare. La crescita in soluzione acida a valore di pH 3 è stata inibita per tutti e tre i ceppi studiati. A pH 4 la crescita è risultata completamente inibita per il *wild-type*. I ceppi di batteri mutati per il gene ABC e per il gene PTS hanno presentato una maggiore resistenza in soluzione acida a pH 4, evidenziando una normale capacità di moltiplicazione, anche in questa condizione di stress. In soluzione a pH 5, sia il *wild type* che i batteri mutati hanno evidenziato

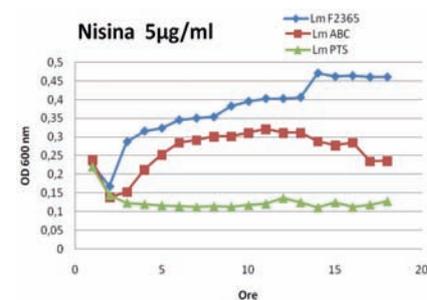


Figura 1. Crescita batterica in soluzione contenente nisina alla concentrazione di 5 µg/mL. Lm F2365=*Lysteria monocytogenes* F2365; Lm ABC=*Lysteria monocytogenes* F2365 delezione/gene ABC; Lm PTS=*Lysteria monocytogenes* F2365 delezione/gene PTS.

crescita regolare.

In soluzione salina al 5% la crescita è stata inibita per tutti i ceppi oggetto di studio. In soluzione di NaCl al 2,5% si sono evidenziate una crescita regolare per il *wild-type*, ed una significativa inibizione per i ceppi mutati. In soluzione contenente NaCl al 1,2% si è evidenziata una crescita regolare in tutti i ceppi studiati.

Discussione

I risultati ottenuti nel presente studio hanno evidenziato che i geni PTS ed ATP-ABC contribuiscono a modulare la risposta a condizioni stressanti di *L. monocytogenes* e ad aumentare la resistenza in presenza di nisina.

Le proteine di trasporto PTS ed ABC, non sintetizzate nei microrganismi mutati, sono proteine di membrana (Liu e Ream, 2008; Liu *et al.*, 2011) e la loro soppressione rende i microrganismi più sensibili alla nisina. Si può presumere, pertanto, che le proteine codificate dai geni deleti siano coinvolte nel trasporto di membrana della batteriocina.

I differenti comportamenti di crescita in soluzioni acide e saline dei ceppi di *L. monocytogenes* mutati, rispetto al ceppo di origine, hanno dimostrato la correlazione tra questi geni ed i meccanismi di resistenza. L'assenza di questi geni ha infatti conferito a *L. monocytogenes* una maggiore resistenza in soluzioni a pH 4, mentre ne hanno aumentato la sensibilità in soluzioni saline al 2,5%.

Il Reg. CE 2073/2005 (Commissione Europea, 2005) sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari prevede modalità di monitoraggio dei processi produttivi, da parte del produttore e degli organi di controllo, che hanno lo scopo di verificare il raggiungimento di determinati parametri.

Conclusioni

In accordo con le indicazioni Comunitarie, che sottolineano la necessità di una maggiore trasparenza a tutti i livelli della politica alimentare, le indagini effettuate hanno consentito di approfondire le conoscenze relative ad alcune basi molecolari correlate alla virulenza di *L. monocytogenes*, contribuendo così a sviluppare strategie di intervento per il controllo di *L. monocytogenes* negli alimenti.

La conoscenza delle risposte dei patogeni a determinate condizioni cui è sottoposto un alimento permette quindi di attuare un controllo mirato in relazione ai differenti trattamenti tecnologici. La ricerca può rappresentare una premessa per l'applicazione di tecniche di DNA *microarrays* al fine di evidenziare i geni correlati alla virulenza in modo rapido ed attendibile (Liu *et al.*, 2013), tale da contribuire ad accreditare garanzia ai prodotti posti in commercio e ad infondere maggiore sicurezza nel consumatore.

Bibliografia

- Abee T, van Schaik W, Siezen RJ, 2004. Impact of genomics on microbial food safety. *Trends Biotechnol* 22:653-60.
- Commissione Europea, 2005. Regolamento della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, 2073/2005/CE. In: Gazzetta Ufficiale, L 338, 22/12/2005.
- Donaldson JR, Nanduri B, Burgess SC, Lawrence ML, 2009. Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* strains F2365 and EGD. *Appl Environ Microb* 75:366-73.
- Gianfranceschi M, Gattuso A, D'Ottavio M, Fokas S, Aureli P, 2007. Results of a 12-month long enhanced surveillance of listeriosis in Italy. *Euro Surveill* 12:E7-E8.
- Horton RM, Cai ZL, Ho SN, Pease LR, 1990. Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *BioTechniques* 8:528-35.
- Linnan MJ, Mascola L, Lou XD, Goulet V, May S, Salminen C, Hird DW, Yonekura ML, Hayes P, Weaver R, 1988. Epidemic listeriosis associated with Mexican-style cheese. *New Engl J Med* 319:823-8.
- Liu Y, Morgan S, Ream A, Huang L, 2013. Gene expression profiling of a nisin-sensitive *Listeria monocytogenes* Scott A *ctsR* deletion mutant. *J Ind Microbiol Biot* 40:495-505.
- Liu Y, Ream A, 2008. Gene expression profiling of *Listeria monocytogenes* strain F2365 during growth in ultrahigh-temperature-processed skim milk. *Appl Environ Microb* 74:6859-66.
- Liu Y, Ream A, Joerger RD, Liu J, Wang Y, 2011. Gene expression profiling of a pressure-tolerant *Listeria monocytogenes* Scott A *ctsR* deletion mutant. *J Ind Microbiol Biot* 38:1523-33.
- Monk IR, Gahan CG, Hill C, 2008. Tools for functional postgenomic analysis of *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microb* 74:3921-34.
- Nelson KE, Fouts DE, Mongodin EF, Ravel J, DeBoy RT, Kolonay JF, Rasko DA, Angiuoli SV, Gill SR, Paulsen IT, Peterson J, White O, Nelson WC, Nierman W, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Madupu R, Haft DH, Selengut J, Van Aken S, Khouri H, Fedorova N, Forberger H, Tran B, Kathariou S, Wonderling LD, Uhlich GA, Bayles DO, Luchansky JB, Fraser CM, 2004. Whole genome comparisons of serotype 4b and 1/2a strains of the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes* reveal new insights into the core genome components of this species. *Nucleic Acids Res* 32:2386-95.
- Nightingale KK, Milillo SR, Ivy RA, Ho AJ, Oliver HF, Wiedmann M, 2007. *Listeria monocytogenes* F2365 carries several authentic mutations potentially leading to truncated gene products, including *inlB*, and demonstrates atypical phenotypic characteristics. *J Food Protect* 70:482-8.
- Premaratne RJ, Lin WJ, Johnson EA, 1991. Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microb* 57:3046-8.
- Smith K, Youngman P, 1992. Use of a new integrational vector to investigate compartment-specific expression of the *Bacillus subtilis* *spoIIM* gene. *Biochimie* 74:705-11.