



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie

Stickstoffmetabolismus von *Listeria monocytogenes*:
Identifizierung von Substraten und
ihre Verwendung für die Proteinsynthese

TANJA PETRA KERN

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Thilo M. Fuchs
2. apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich
3. Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Die Dissertation wurde am 02.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 22.06.2016 angenommen.

„...don't stop believin'...“

Journey

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Abstract	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Liste der Veröffentlichungen und persönlichen Beiträge.....	X
1. Einleitung.....	14
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	14
1.1.1 Entdeckung und Charakterisierung	14
1.1.2 Listeriose – Ausbrüche und Krankheitsverlauf	16
1.1.3 Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	18
1.2 Metabolismus von <i>L. monocytogenes</i>	20
1.2.1 Pathometabolismus - Metabolismus trifft Virulenz	20
1.2.2 Kohlenstoff-Metabolismus	21
1.2.3 Stickstoff-Metabolismus.....	22
1.2.4 Metabolismus während der Replikation im Wirt	24
1.2.5 Intrazelluläre Nutzung von Kohlenstoff und anderen Nährstoffen.....	26
1.2.6 Intrazellulärer Stickstoff-Metabolismus.....	27
1.3 <i>Isotopologue Profiling</i>	31
1.4 <i>Caenorhabditis elegans</i> als Modellorganismus	33
1.5 Ziel der Arbeit und angewandte Methodik	35
2. Ergebnisse und Diskussion.....	39
2.1 Identifizierung von N-Quellen von <i>L. monocytogenes</i> (Teil 1).....	39
2.1.1 Entwicklung von ¹⁵ N- <i>Isotopologue Profiling</i>	39
2.1.2 <i>L. monocytogenes</i> nimmt AS auf und bevorzugt den Direkteinbau in Proteine	40
2.1.3 Ammonium und Glutamin sind Haupt-N-Quellen für die AS-Synthese	41
2.1.4 Arginin wird direkt eingebaut und nicht für den AS-Aufbau verwendet	44
2.1.5 BCAAs werden sowohl direkt eingebaut als auch katabolisiert	47
2.1.6 Methionin wird als N-Quelle verwendet	48
2.1.7 Cystein wird hauptsächlich direkt in Proteine eingebaut	49
2.1.8 Ethanolamin ist eine alternative N-Quelle	49
2.1.9 Glucosamin kann als hauptsächliche C- und N-Quelle verwendet werden	51
2.1.10 Mutationen in GlnR, GDH und GlnK verändern die N-Flüsse	52
2.1.11 Zusammenfassung	54
2.1.12 Publikation 1: <i>Isotopologue profiling</i> of the listerial N-metabolism	55

2.2	Untersuchung von N-Flüssen zwischen <i>L. monocytogenes</i> und <i>C. elegans</i> (Teil 2).....	75
2.2.1	Etablierung von <i>C. elegans</i> als Modellorganismus	75
2.2.2	<i>L. monocytogenes</i> ist nicht pathogen für <i>C. elegans</i> aber vermehrt sich in dessen Intestinaltrakt.....	76
2.2.3	Markierung von <i>C. elegans</i> mit ¹⁵ N.....	79
2.2.5	N-Flüsse zwischen <i>C. elegans</i> und <i>L. monocytogenes</i>	83
2.2.6	Zusammenfassung	87
2.2.7	Publikation 2: Pathogen-nematode interaction: Nitrogen supply of <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> during growth in <i>Caenorhabditis elegans</i>	87
2.3	Publikation 3: Toward a systemic understanding of <i>Listeria monocytogenes</i> metabolism during infection	101
2.4	Ausblick.....	114
	Literaturverzeichnis	116
	Konferenzbeiträge	129
	Danksagung	130

Zusammenfassung

Das grampositive, humanpathogene Bakterium *Listeria monocytogenes* ist bekannt als Verursacher der sogenannten Listeriose, einer Erkrankung, welche sich bei anfälligen Individuen nach Aufnahme der Bakterien über kontaminierte Nahrungsmittel entwickeln kann. Aufgrund seiner Fähigkeit, extreme Bedingungen zu überstehen, stellt *L. monocytogenes* ein großes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar. Die Listeriose kommt im Vergleich zu anderen Zoonosen zwar selten vor, steht jedoch aufgrund ihrer hohen Letalitätstanzrate trotzdem im Fokus der Gesundheitsüberwachung. Listerien sind in der Lage, sich innerhalb von Wirtszellen zu vermehren und sich auch zwischen den Zellen fortzubewegen. Des Weiteren können sie die Blut-Hirn- sowie die Blut-Plazenta-Schranke überwinden, wodurch die Listeriose besonders gefährlich ist für Schwangere, Föten und immunkomprimierte Personen. Die Pathogenitätsfaktoren waren und sind zentraler Bestandteil vieler Forschungsarbeiten. Wenige Daten gibt es jedoch bisher über den listeriellen Metabolismus, der an die während einer Infektion vorherrschenden Bedingungen angepasst werden muss, und als sogenannter „Pathometabolismus“ eine enge Wechselwirkung mit dem Wirt darstellt. In dieser Arbeit wurde der Stickstoff-(N)-Metabolismus von *L. monocytogenes* *in vitro* (Teil 1) und *in vivo* mit *Caenorhabditis elegans* als Kolonisierungsmodell (Teil 2) untersucht. Als zentrale Analytikmethode diente dabei das sogenannte *Isotopologue Profiling*, das bereits erfolgreich in Studien zum Kohlenstoff-Metabolismus mit ^{13}C Anwendung fand.

Im ersten Teil der Arbeit wurde *Isotopologue Profiling* erstmalig für die Untersuchung des N-Stoffwechsels eines pathogenen Bakteriums etabliert. Beim Wachstum in einem definierten Minimalmedium mit ^{15}N -markierten Substanzen konnten so diejenigen Substrate ermittelt werden, die *L. monocytogenes* für den Anabolismus von Aminosäuren (AS) und Proteinen verwendet und damit der tatsächliche Beitrag dieser Verbindungen zum N-Metabolismus quantifiziert werden. Hierbei zeigte sich, dass Glutamin und Ammonium, die als wichtige N-Quellen bei Bakterien bekannt sind, zwar einen Großteil des zentralen Stickstoffs liefern, jedoch auch weitere Verbindungen genutzt werden. So wurde belegt, dass auch die verzweigt-kettigen AS Valin, Leucin und Isoleucin und außerdem Methionin N-Donoren darstellen. Überraschenderweise wurden Arginin, das als N-Quelle für *Bacillus* sp. bekannt ist, sowie Cystein unter *in vitro* Bedingungen von Listerien nicht für den AS-Aufbau eingesetzt, sondern direkt in Proteine eingebaut. In dieser Studie konnte außerdem zum ersten Mal experimentell die Nutzung von Ethanolamin und Glucosamin als N-Quellen ermittelt werden, die bisher nicht als solche bekannt waren und aufgrund ihres reichhaltigen Vorkommens im Darm für die listerielle Replikation *in vivo* vermutlich eine Bedeutung haben. Glucosamin wurde von *L. monocytogenes* auch gleichzeitig als Kohlenstoff-Quelle verwendet. Durch den Einsatz von Mutanten wurde die Rolle der drei Gene des N-Metabolismus *glnR*, *lmo0560* und *nrgB* näher beleuchtet. Gleichzeitig wurden so die Möglichkeiten demonstriert, mit Hilfe des *Isotopologue Profiling* potentielle Angriffspunkte für neue Antibiotika zu ermitteln.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Nematode *C. elegans*, der als Modellorganismus in vielen Forschungsgebieten dient, als Kolonisierungsmodell für *L. monocytogenes* etabliert. Im

Gegensatz zu früheren Studien anderer Arbeitsgruppen stellte sich heraus, dass *L. monocytogenes* für den Wurm nicht pathogen ist, sich jedoch in dessen Darm vermehrt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein Versuchsaufbau entwickelt, um mit Hilfe von *Isotopologue Profiling* Stoffflüsse zwischen *L. monocytogenes* und *C. elegans* zu untersuchen. Diese Methode wurde dabei zum ersten Mal zur Untersuchung von N-Flüssen zwischen einem mehrzelligen Organismus und einem kolonisierenden, humanpathogenen Bakterium eingesetzt. Bei der Markierung des Wurmes mit ^{15}N konnten außerdem die hohen, metabolischen Umsatzraten von *C. elegans* demonstriert werden. Zur Isolation von *L. monocytogenes* nach der Proliferation im Darm der Nematoden wurde ein Protokoll entwickelt, das unter anderem die immunomagnetische Separation (IMS) beinhaltet. Bei der anschließenden Untersuchung der bakteriellen Proteine wurde der Einbau von Stickstoff aus den Nematoden in listerielle AS nachgewiesen. Ein Großteil des N-Bedarfs von *L. monocytogenes* wurde jedoch durch den Darminhalt abgedeckt, wobei N-haltige AS und Oligopeptide bevorzugt direkt in listerielle AS einbaut wurden, was die Bedeutung von Transportern dieser Substrate für die bakterielle Replikation während einer Infektion unterstreicht. Mit Hilfe von *Isotopologue Profiling* konnte diese Arbeit zur weiteren Aufklärung des N-Metabolismus von *L. monocytogenes* beitragen und bietet somit eine fundierte Grundlage für weiterführende Stoffwechselstudien von pathogenen, wie auch nicht-pathogenen Bakterien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*.

Abstract

The gram-positive human pathogen *Listeria monocytogenes* is the causative agent of the disease listeriosis, an infection usually caused by the uptake of the bacteria via contaminated food. As a result of its ability to survive extreme conditions, *L. monocytogenes* poses a serious threat to the food industry. Compared with other zoonoses, cases of listeriosis are rare, but due to its high lethality rate it is still of central interest for health surveillance. Listeriae are able to replicate intracellularly and move between cells. Moreover, they are capable to cross the blood-brain and the blood-placenta barrier, which is why listeriosis is especially dangerous for pregnant women, fetuses and immunocompromised individuals. The virulence factors, that allow *L. monocytogenes* to express pathogenicity, are addressed by many research projects. By contrast, little data is available about the listerial metabolism, especially the nitrogen-(N)-metabolism, which needs to be adjusted to the changing conditions of the host environment. This close interaction between a pathogen and a host during infection is now described as “pathometabolism”.

In this study, the N-metabolism of *L. monocytogenes* was investigated *in vitro* (part 1) and *in vivo* in *Caenorhabditis elegans* as a colonisation model (part 2), using isotopologue profiling. In the first part of this thesis, ¹⁵N-isotopologue profiling was established. After growth in a defined medium supplemented with ¹⁵N-labeled substrates, those N-sources were determined, that are used by *L. monocytogenes* for the anabolism of amino acids and proteins. Moreover, the individual contributions of these substrates to the core N-metabolism were quantified. It could be shown that glutamine and ammonium, which are known as important N-sources for bacteria, provide the majority of the central nitrogen, but other sources are used simultaneously. The branched-chain amino acids valine, leucine and isoleucine, and also methionine could be verified as N-donors as well. Surprisingly arginine, that is a source of nitrogen for *Bacillus* sp., and cysteine were not used for the *de novo* synthesis of amino acids under *in vitro* conditions, but were directly incorporated into proteins. Ethanolamine and glucosamine were identified as further N-sources, which are abundant in the intestine and could therefore be of major importance for the listerial replication *in vivo*. Within the scope of this study, the use of these two substances as N-sources of *L. monocytogenes* was experimentally demonstrated for the first time. Additionally, glucosamine can be used to replace the carbon source. Perturbations of N-fluxes, caused by gene deletions, provide data that contribute to a better understanding of the role of the three genes of the N-metabolism *glnR*, *Imo0560*, and *nrgB*. These experiments also highlight the potential of isotopologue profiling in order to find targets for novel therapeutic substances. In the second part of this study the nematode *C. elegans*, which has been used as a model organism in many research areas, was established as a colonisation model of *L. monocytogenes*. In contrast to earlier findings it was shown, that *L. monocytogenes* replicates in the nematode's intestine and is not pathogenic to the worm. Based on this finding, an experimental setup was developed to investigate metabolic fluxes between *L. monocytogenes* and *C. elegans*. Here, for the first time isotopologue profiling was used to study N-fluxes between a multicellular organism and a colonising, human-pathogenic bacterium. By labelling the worm with ¹⁵N, the high metabolic

turnover rates of the nematode were demonstrated. For isolation of *L. monocytogenes* after proliferation in the worm's gut a method was established, which includes immunomagnetic separation (IMS). Results obtained from isotopologue profiling analysis of bacterial proteins revealed the incorporation of nematode-derived nitrogen into listerial amino acids, and hence for the first time, provides evidence for a nutrient flux from a host to a colonising bacterium. However, the majority of nitrogen that is required by *L. monocytogenes* was taken from the gut contents, and N-containing amino acids and oligopeptides were preferentially directly incorporated into amino acids. This points to an important role of transporters for these substrates for the listerial replication during infection. Using isotopologue profiling, this study enhances our understanding of the N-metabolism of *L. monocytogenes*, and is an important basis for future research for both *in vitro* and *in vivo* approaches.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
¹³ C	Schwerer Kohlenstoff
¹⁵ N	Schwerer Stickstoff
Abb.	Abbildung aus einer Publikation
ADI	Arginin-Deiminase
Ala	Alanin
Arg	Arginin
AS	Aminosäure(n)
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
ATP	Adenosintriphosphat
BCAA	Verzweigt-kettige Aminosäure (branched chain amino acid)
BHI	Hirn-Herz-Bouillon (brain heart infusion)
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	ungefähr
CCR	Kohlenstoff-Katabolitrepression (carbon catabolite repression)
CFU	Kolonieformende Einheiten (colony forming units)
CK	Carbamat-Kinase
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
cOTCase	katabolische Ornithin-Carbamoyltransferase
Cys	Cystein
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EFSA	Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (European food safety authority)
EU	Europäische Union
FUDR	5'-Fluoro-2'-Deoxyuridin
GA-3P	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GABA	α-Aminobutyrat
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GC/MS	mit Gaschromatografie gekoppelte Massenspektrometrie
GC-Gehalt	Guanin- und Cytosin-Gehalt
GDH	Glutamatdehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GlcN	Glucosamin
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GOGAT	Glutamatsynthase
GS	Glutamat-Ammonium-Ligase

His	Histidin
Ile	Isoleucin
IMS	Immunomagnetische Separation
L4	Larvenstadium 4
Leu	Leucin
Met	Methionin
mM	Millimolar
MM	Minimalmedium
MWB	modifizierte Welshimer's Bouillon
N	Stickstoff
NGM	Wachstumsmedium für Nematoden (nematode growth medium)
nm	Nanometer
NMR	Magnetresonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)
OAA	Oxalacetat
P	Phosphat
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PEP	Phosphoenolpyruvat
Phe	Phenylalanin
PPP	Pentosephosphatweg (pentose phosphate pathway)
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
PTS	Phosphotransferase-System
RNS	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
s.	siehe
Ser	Serin
sp. nov.	neue Spezies
sp./spp.	eine/mehrere Spezies
Tab.	Tabelle aus einer Publikation
TBDMS	Tert-Butyldimethylsilyl-Derivate
TCA	Citratzyklus (tricarboxylic acid cycle)
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
v.a.	vor allem
Val	Valin
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
α -KG	α -Ketoglutarat
Δ	Mutation

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bakterien der Gattung <i>Listeria monocytogenes</i> im Hellfeld-Mikroskop.....	14
Abbildung 2: Gemeldete und bestätigte Fälle von Zoonosen beim Menschen in der EU im Jahr 2013.	17
Abbildung 3: Infektionszyklus von <i>L. monocytogenes</i>	19
Abbildung 4: Der Pathometabolismus.	21
Abbildung 5: Der Auf- und Abbau von Glutamat bei <i>L. monocytogenes</i>	23
Abbildung 6: Übersicht über den Metabolismus von <i>L. monocytogenes</i>	29
Abbildung 7: Übersicht über die <i>Isotopologue Profiling</i> Analyse.	32
Abbildung 8: Adulte Nematoden vom wildtypischen Stamm <i>C. elegans</i> N2.	34
Abbildung 9: ¹⁵ N- <i>Isotopologue Profiling</i>	40
Abbildung 10: ¹⁵ N-Einbauraten in listeriellen AS beim Wachstum in MM mit [U- ¹⁵ N ₂]Gln oder ¹⁵ NH ₄ Cl in Gegenwart von Arg.	42
Abbildung 11: ¹⁵ N-Einbauraten in listeriellen AS beim Wachstum in MM mit ¹⁵ N-Arg.....	45
Abbildung 12: Schematische Ansicht des Arginin-Deiminase-Systems (ADI).	47
Abbildung 13: Wachstum von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e Δ <i>glnR</i> mit [U- ¹⁵ N ₂]Gln oder ¹⁵ NH ₄ Cl.52	
Abbildung 14: N-Quellen von <i>L. monocytogenes</i> und deren Beitrag zum gesamten N-Stoffwechsel.....	54
Abbildung 15: Proliferation von <i>L. monocytogenes</i> EGD-e in <i>C. elegans</i> N2.	77
Abbildung 16: Isolation von <i>L. monocytogenes</i> aus <i>C. elegans</i>	81
Abbildung 17: Prozentualer Anteil von <i>E. coli</i> OP50-Bakterien in einem über IMS isolierten Listerien-Pellet.	82
Abbildung 18: ¹⁵ N-Anreicherung in AS von <i>L. monocytogenes</i> nach Isolation aus <i>C. elegans</i> . 83	
Abbildung 19: Versuchsaufbau für die Untersuchung von Stoffflüssen zwischen <i>C. elegans</i> und <i>L. monocytogenes</i>	84
Abbildung 20: Isotopologenmuster von Lys, His und Arg aus <i>L. monocytogenes</i> bei der Untersuchung von Stoffflüssen zwischen <i>L. monocytogenes</i> und <i>C. elegans</i>	85

Liste der Veröffentlichungen und persönlichen Beiträge

In dieser Arbeit enthaltene Publikationen (peer-reviewed)

1. Kutzner Erika[§], **Kern Tanja**[§], Felsl Angela, Eisenreich Wolfgang, Fuchs Thilo M. (2016). *Isotopologue profiling of the listerial N-metabolism. Molecular microbiology.* 100(2): 315–327.
[§]geteilte Erstautorenschaft

Zusammenfassung

Die Stickstoff-(N-)Quellen des grampositiven Pathogens *Listeria monocytogenes* und die individuellen Beiträge dieser Substrate zur Gesamtversorgung des Bakteriums mit Stickstoff sind noch weitgehend unbekannt. Zur Untersuchung des N-Metabolismus von *L. monocytogenes* wurde daher die Methode ¹⁵N-Isotopologue Profiling etabliert. Die Bakterien wurden in einem mit potentiellen, ¹⁵N-markierten N-Quellen angereicherten, definierten Minimalmedium angezogen, und anschließend geerntet. Die Aminosäuren wurden durch saure Hydrolyse gewonnen und mit GC-MS analysiert, wobei die ¹⁵N-Anreicherung und die Isotopenzusammensetzung bestimmt wurden. Die unterschiedlichen ¹⁵N-Profile spiegelten die gleichzeitige Nutzung von Ammonium, Glutamin, Methionin und, zu einem geringeren Anteil, der verzweigtkettigen Aminosäuren Valin, Leucin und Isoleucin zu anabolen Zwecken wider. Im Gegensatz dazu wurden Arginin, Histidin und Cystein direkt in bakterielle Proteine eingebaut. *L. monocytogenes* kann die Aminosäure Glutamin als Aminodonor für den zentralen N-Metabolismus außerdem auch mit den zahlreich im Darm vorhandenen Verbindungen Ethanolamin und Glucosamin ersetzen. Unterbrechungen der N-Flüsse durch Gendelektionen zeigen die Beteiligung der Ethanolamin-Ammonium-Lyase und suggerieren für den listeriellen Regulator GlnK eine im Vergleich zu GlnK von *Escherichia coli* unterschiedliche Rolle. Der Metabolismus von N-haltigen Nährstoffen zeigt die hohe Flexibilität des pathogenen Bakteriums *L. monocytogenes* bei der Ausbeute von N-Quellen, die auch bei der Proliferation während einer Infektion von Bedeutung sein könnten.

Beiträge

Die Entwicklung der biologischen Versuchsaufbauten sowie deren Durchführung erfolgten durch Tanja Kern. Die Entwicklung der Messmethodik, die biochemische Probenaufbereitung und die GC-MS-Messungen für das *Isotopologue Profiling* übernahm Erika Kutzner. Die Abbildungen und Tabellen wurden von Erika Kutzner erstellt, bis auf Abbildung 5A und Tabelle S1, welche von Tanja Kern erstellt wurden.

2. **Kern Tanja**, Kutzner Erika, Eisenreich Wolfgang, Fuchs Thilo M. (2015). Pathogen-nematode interaction: Nitrogen supply of *Listeria monocytogenes* during growth in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Microbiology Reports*. 8(1): 209–29.

Zusammenfassung

Listeria monocytogenes ist ein grampositives, fakultativ intrazelluläres Bakterium. Aufgrund des saprophytischen Lebensstils wird angenommen, dass *L. monocytogenes* Bodenorganismen wie *Caenorhabditis elegans* infiziert und sich in diesen vermehrt. Über die Substratnutzung und Metabolit-Flüsse während dieser Interaktion zwischen Bakterium und Nematode ist hingegen wenig bekannt. Daher wurden hier ein Kolonisierungsmodell für *L. monocytogenes* und eine Methode für die effiziente Isolierung und Aufreinigung des Pathogens aus dem Darm der Nematoden entwickelt. Nach vollständiger Markierung von *C. elegans* mit ¹⁵N konnten bei der Analyse der Isotopologen nach Messung mit GC-MS hohe metabolische Umsatzraten der Nematoden detektiert werden. Des Weiteren konnte ein signifikanter N-Fluss aus den Nematoden in listerielle Proteine während der bakteriellen Proliferation beobachtet werden. Zum Vergleich wurde außerdem der N-Fluss zwischen dem Darminhalt der Nematoden und *L. monocytogenes* gemessen, indem *C. elegans* mit ¹⁵N-markierten *Escherichia coli* OP50 gefüttert wurden. In beiden Versuchsaufbauten zog *L. monocytogenes* den direkten Einbau von Histidin, Arginin und Lysin der *de novo*-Biosynthese vor. Unsere Daten suggerieren, dass die Kolonisierung von *C. elegans* für *L. monocytogenes* eine Strategie darstellt, um sich den Zugang zu Nährstoffen wie Stickstoff zu erleichtern.

Beiträge

Die Entwicklung der Experimente mit *C. elegans* und deren Durchführung erfolgte durch Tanja Kern. Erika Kutzner führte die biochemische Probenaufbereitung sowie die GC-MS Messungen für das *Isotopologue Profiling* durch.

3. Fuchs Thilo M., Eisenreich Wolfgang, **Kern Tanja**, Dandekar Thomas (2012). Toward a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection. *Frontiers in Microbiology*. 3: 23. doi: 10.3389/fmicb.2012.00023

Zusammenfassung

Listeria monocytogenes ist ein durch Lebensmittel übertragbares, humanpathogenes Bakterium, das bei anfälligen Menschen und Tieren eine invasive Infektion hervorrufen kann. Für die Proliferation in einem Wirt bedient sich dieses fakultativ intrazelluläre Bakterium an spezifischen metabolischen Stoffwechselwegen, Transportern und enzymatischen Funktionen, deren Expression die koordinierte Aktivität eines komplexen, regulatorischen Netzwerks benötigt. Der hoch adaptierte Metabolismus von *L. monocytogenes* hängt stark von der Nährstoffzusammensetzung der verschiedenen Umgebungen ab, auf die es während

einer Infektion trifft. Durch Transkriptom- und Proteom-Analysen kann die räumlich und zeitlich dynamische Genexpression während der Replikation dieses Pathogens in kultivierten Zellen oder *in vivo* aufgedeckt werden. Metabolische Anhaltspunkte sind die Nutzung von ungewöhnlichen C₂- und C₃-Körpern, der Metabolismus von Pyruvat, der Zugang zu Thiamin, die Aufnahme von Peptiden, die Beschaffung oder *de novo*-Biosynthese bestimmter Aminosäuren und der Abbau von Glucosephosphat über den Pentosephosphatweg. Diese Beispiele illustrieren die Beeinflussung des Energie-, Kohlenstoff- und Stickstoffmetabolismus durch *in vivo* Bedingungen, was wiederum das listerielle Wachstum beeinträchtigt. Die Nutzung, Analyse und Modellierung vorhandener Datensätze diente als erster Versuch, den listeriellen Metabolismus während einer Infektion auf systemischer Ebene verstehen zu können. *L. monocytogenes* könnte somit als Modellorganismus für die Systembiologie von grampositiven, fakultativ intrazellulären Bakterien dienen. Die Publikation beschäftigt sich mit den bisher bekannten, metabolischen Pathogenitätsfaktoren von *L. monocytogenes*, die während einer Infektion von Bedeutung sind, und stellt die Methode des *Isotopologue Profiling* und die damit einhergehenden Möglichkeiten für zukünftige Forschungsarbeiten vor.

Beiträge

Die Literaturrecherchen und das Verfassen des Manuskripts erfolgten durch Thilo M. Fuchs, Wolfgang Eisenreich, Tanja Kern und Thomas Dandekar. Die Abbildung wurde von Tanja Kern und Thilo M. Fuchs erstellt.

Sonstige Publikationen

4. Eisenreich Wolfgang, Kutzner Erika, **Kern Tanja**, Fuchs Thilo M. (2016). Bakterieller Stoffwechsel als Pathogenitätsfaktor. Ein neuer Ansatz in der Infektionsbiologie. *Naturwissenschaftliche Rundschau*. 69(4): 174–180.

Zusammenfassung

Die bakterielle Pathogenitätsforschung beschäftigte sich lange Zeit überwiegend mit klassischen Virulenzfaktoren wie Adhäsinen oder Toxinen. In den letzten Jahren rückte jedoch ein neues Thema in den Vordergrund, nämlich die besondere Rolle des bakteriellen Stoffwechsels, dessen Anpassung an die sich ändernden Umgebungsbedingungen für eine erfolgreiche Infektion essentiell ist. Die physiologische Grundlagenforschung, die ihre größten Erfolge bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts feierte, erlebt neuerdings in der Synthese mit der modernen Virulenzforschung eine aufsehenerregende Renaissance. Durch die Anwendung der heutzutage verfügbaren hochsensitiven Methoden der Bioanalytik und Molekularbiologie wurde deutlich, dass sich der zentrale Stoffwechsel von Pathogenen nicht selten von den klassischen Wegen unterscheidet und darüber hinaus eine große Dynamik hinsichtlich der Anpassung an die jeweiligen Wirtsorganismen aufweist. Im Bereich der modernen Infektionsbiologie stehen daher

mehr und mehr die folgenden Fragestellungen im Mittelpunkt: Wie ernähren und vermehren sich bakterielle Krankheitserreger im befallenen Wirtsorganismus und welche Stoffwechselschritte sind dabei aktiv? Wie reagiert der Stoffwechsel betroffener Wirtszellen auf eine Infektion? Wird er dabei sogar für die Zwecke der Pathogene manipuliert? Gibt es unter Infektionsbedingungen für das Wachstum der Eindringlinge essentielle und spezifische Stoffwechselreaktionen, die durch neuartige, maßgeschneiderte Antibiotika unterbrochen werden können? Der Übersichtsartikel nennt einige Beispiele für Stoffwechsel-Anpassungen pathogener Bakterien, stellt die Methode des *Isotopologue Profiling* vor, die bereits erfolgreich in Metabolismus-Studien eingesetzt wurde, und hebt die Bedeutung dieser Untersuchungen für aktuelle Pathogenitätsstudien hervor.

Beiträge

Das Verfassen des Manuskripts erfolgte durch Wolfgang Eisenreich, Erika Kutzner, Tanja Kern und Thilo M. Fuchs. Die Abbildungen wurden von Erika Kutzner und Thilo M. Fuchs erstellt.

1. Einleitung

1.1 *Listeria monocytogenes*

1.1.1 Entdeckung und Charakterisierung

Das grampositive Bakterium *Listeria monocytogenes* ist bekannt als Verursacher der sogenannten Listeriose. Listerien sind 1–3 µm große, peritrich begeißelte, stäbchenförmige Bakterien, die keine Sporen bilden (Abbildung 1). Sie werden zum Phylum der Firmicutes gezählt, sind fakultativ anaerob und ihre DNS weist einen geringen GC-Gehalt von durchschnittlich 39 % auf (Glaser *et al.*, 2001). Als ubiquitäre Bakterien kommen Listerien sowohl im Wasser als auch in der Erde vor (Weis und Seeliger, 1975; Farber und Peterkin, 1991; Moshtaghi *et al.*, 2003; Schuchat *et al.*, 1991) und werden folglich auch oft auf Produkten aus der Landwirtschaft gefunden (Soni *et al.*, 2014). Auch aus dem Gastrointestinaltrakt verschiedener Tiere und dem Menschen konnten Listerien bereits isoliert werden (Weis und Seeliger, 1975; Farber und Peterkin, 1991).

Listeria wurde erstmals 1926 von Murray, Webb und Swann beschrieben, die dieses Bakterium nach einem epizoonotischen Ausbruch aus Tieren isolierten. Sie nannten es *Bacterium monocytogenes* (Murray *et al.*, 1926), da eine Infektion bei diesen Tieren durch eine sogenannte Monozytose charakterisiert war, einen Anstieg der im Blut zirkulierenden Monozyten. Eben jenes Bakterium wurde 1927, nur ein Jahr später, in Südafrika von einem Wissenschaftler namens Pirie entdeckt. Er schlug für diese neue Gattung den Namen *Listerella* vor, im Gedenken an Lord Lister, einem zur Zeit der Jahrhundertwende berühmtem Chirurg und Pionier auf dem Gebiet der Bakteriologie. Der endgültige und offizielle Name *Listeria monocytogenes* wurde im Jahre 1940 vergeben, ebenfalls von Pirie, und anschließend in die sechste Version des "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" übernommen (Pirie, 1927; Gray und Killinger, 1966; Mateus *et al.*, 2013).

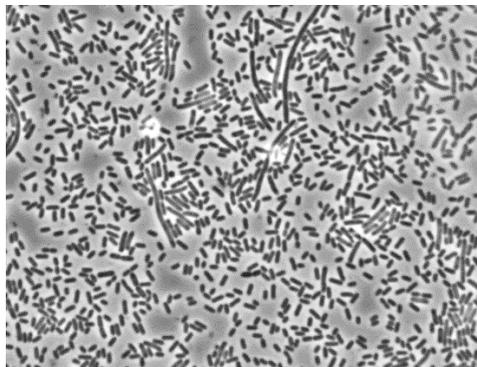


Abbildung 1: Bakterien der Gattung *Listeria monocytogenes* im Hellfeld-Mikroskop.
Die stäbchenförmigen Bakterien besitzen peritriche Geißeln und bilden keine Sporen.

Die Gattung *Listeria* umfasst derzeit die folgenden Spezies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. grayi* (Rocourt und Buchrieser, 2007), *L. marthii* (Graves *et al.*, 2010), *L. rocourtiae* (Leclercq *et al.*, 2010) und die neu entdeckte Spezies *L. weihenstephanensis* (Lang Halter *et al.*, 2013). In den letzten Jahren wurden außerdem acht weitere Spezies identifiziert, nämlich *L. fleischmannii* sp. nov. (Bertsch *et al.*, 2013), *L. floridensis* sp. nov., *L. aquatica* sp. nov., *L. cornellensis* sp. nov., *L. riparia* sp. nov., *L. grandensis* sp. nov. (den Bakker *et al.*, 2014) und außerdem *L. booriae* sp. nov. und *L. newyorkensis* sp. nov. (Weller *et al.*, 2015), sodass derzeit insgesamt 15 verschiedene Spezies bekannt sind. Zu den bisher bekannten Pathogenen zählen lediglich *L. monocytogenes*, welches Menschen und Tiere infizieren kann, sowie *L. ivanovii*, das Wiederkäuer befällt. Einzelne Fälle von durch *L. ivanovii* verursachter, humaner Gastroenteritis und Bakteriämie sind bekannt, jedoch wird *L. ivanovii* im Vergleich zu *L. monocytogenes* als weniger virulent angesehen (Snapir *et al.*, 2006; Guillet *et al.*, 2010).

Die Suche nach Verwandtschaften zwischen genetischen Linien, Ribo- und Serotypen ist ein wichtiges Untersuchungsinstrument bei Ausbrüchen mit *L. monocytogenes* (Nadon *et al.*, 2001). Durch Stammtypisierungen lassen sich oft Zusammenhänge zwischen verschiedenen Fällen finden, was wiederum ermöglicht, potentielle Ursachenherde zu finden und Risiken für bestimmte *Listeria*-Isolate einzuschätzen. Listerien können, basierend auf den Unterschieden der somatischen (O) Antigene und den Antigenen auf ihren Flagellen (H), in verschiedene Serotypen unterteilt werden (Seeliger und Hohne, 1979). Obwohl 12 Serotypen unterschieden werden, konnten in den meisten Fällen nur drei davon, nämlich 1/2a, 1/2b und 4b mit Krankheiten beim Menschen assoziiert werden (Liu, 2006; Barbudde *et al.*, 2008). Die vollständige Sequenzierung des Genoms von *L. monocytogenes* ermöglichte weitere Einblicke in die Pathogenität dieses Bakteriums. Durch den Vergleich mit der nicht-pathogenen Spezies *L. innocua* konnten 270 (*L. monocytogenes*) sowie 149 (*L. innocua*) stammspezifische Gene gefunden werden. Im Fall von *L. monocytogenes* handelt es sich hierbei um viele Faktoren, von denen bereits bekannt ist, dass sie eine Rolle bei der Virulenz spielen, nämlich die für den Eintritt in die Wirtszellen notwendigen Internaline, LLO und PlcA, welche für die Flucht aus der Vakuole wichtig sind, oder ActA und PlcB, die *L. monocytogenes* eine auf Aktin-Polymerisierung basierende, intrazelluläre Fortbewegung ermöglichen (Glaser *et al.*, 2001).

Listerien besitzen peritriche Flagellen, die hauptsächlich zwischen 20 °C und 25 °C exprimiert werden. Bei höheren Temperaturen (37 °C) konnten nur mehr wenige flagelläre Proteine auf der Oberfläche der Bakterien gefunden werden (Peel *et al.*, 1988). Zwischen 30 °C und 37 °C zeigt *L. monocytogenes* bei neutralem pH-Wert ein normales Wachstum (Petran und Zottola, 1989). Das Bakterium überlebt eine breite Temperaturspanne von 0 °C bis 45 °C, pH-Werte zwischen 4.0 und 9.6 und Salzkonzentrationen (Natriumchlorid) von über 10 % (Glaser *et al.*, 2001; Hudson, 1992; Yousef und Lado, 2007; Petran und Zottola, 1989; Shabala *et al.*, 2008). Die Tatsache, dass Listerien extreme Bedingungen überstehen und demzufolge auch konventionelle Methoden der Lebensmittelkonservierung überleben, stellt ein großes Problem für die Nahrungsmittelindustrie dar. Obwohl diese Bakterien durch Pasteurisierung und verschiedene

Methoden des Kochens abgetötet werden können, ist eine Kontamination nach der Produktion aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens nicht ungewöhnlich. Man findet sie deshalb auch oft auf Rohkost und Fertigmahlzeiten wie Obst und Gemüse, Milchprodukten, Fleisch, Meeresfrüchten oder Geflügel (Meloni *et al.*, 2009; Jamali *et al.*, 2013), da all diese Nahrungsmittel das Wachstum der Bakterien unterstützen. Dies unterstreicht zum einen die Notwendigkeit von umfassenden Aufklärungs- und Hygienemaßnahmen in der Nahrungsmittelindustrie, um das Bewusstsein für dieses Gesundheitsrisiko zu stärken, und zum anderen den Bedarf an neuen und schnelleren Diagnostikmethoden, um potentielle Kontaminationen rechtzeitig erkennen und darauf reagieren zu können.

1.1.2 Listeriose – Ausbrüche und Krankheitsverlauf

Humane Listeriose wird normalerweise durch die Aufnahme kontaminierter Nahrung wie rohen Fleisch- und Wurstwaren, Milchprodukten wie Käse, Eiern, Meeresfrüchten und auch Gemüse verursacht. Die Infektionsdosis ist unbekannt, da sie sowohl vom Stamm abhängig ist, als auch vom Immunstatus der betroffenen Person. Die meisten Fälle tauchen sporadisch auf und können oft auf den Verzehr kontaminierter Lebensmittel zurückgeführt werden, was die Annahme unterstreicht, dass die natürliche Infektionsroute über den Gastrointestinaltrakt läuft. Trotzdem gab es aber auch bereits Ausbruchsfälle, bei denen sich keine Verbindung mit Lebensmitteln knüpfen ließ, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass es sporadische Fälle von Listeriose gibt, die nicht durch die Nahrungsaufnahme verursacht wurden (Farber und Peterkin, 1991).

Die klassische Diagnostikmethode bei der Listeriose ist die Isolation und Kultivierung der Bakterien aus normalerweise sterilen Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut oder Rückenmarksflüssigkeit. Eine Kultivierung aus dem Stuhl der Patienten ist für eine Diagnose ungeeignet, da gesunde Personen oft asymptomatische Träger von *L. monocytogenes* sein können. In einer Studie zu diesem Thema konnte bei gesunden Erwachsenen durchschnittlich zweimal pro Jahr *L. monocytogenes* im Stuhl nachgewiesen werden (Grif *et al.*, 2003). Die meisten Länder innerhalb der Europäischen Union (EU) haben eine jährliche Inzidenz von 2–10 gemeldeten Fällen pro einer Million Einwohnern pro Jahr (de Valk *et al.*, 2005). 2015 wurden dem Robert-Koch-Institut in Deutschland 662 Fälle von humaner Listeriose gemeldet (Robert Koch Institut, 2016). Abbildung 2 zeigt die Bekanntmachungsraten von Zoonosen, also zwischen Mensch und Tier übertragbaren Krankheiten, in bestätigten Fällen in der EU aus einer Überwachung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) im Jahr 2013, welche in 32 europäischen Ländern durchgeführt wurde. Campylobakteriose ist dabei die am häufigsten gemeldete gastrointestinale Krankheit in der EU, gefolgt von der Salmonellose, wobei der Schweregrad beider Erkrankungen mit 0,05 % bzw. 0,14 % in Bezug auf die Letalitätsrate gering ist (EFSA und ECDC, 2015). Bestätigte Fälle von Listeriose sind hingegen in ihrer Häufigkeit gering, jedoch steht diese Erkrankung trotzdem im Fokus der

Gesundheitsüberwachung, da sie eine der höchsten Sterberaten unter allen von Lebensmitteln verursachten Infektionen aufweist, welche bei dieser Überwachungsstudie bei 15,6 % lag.

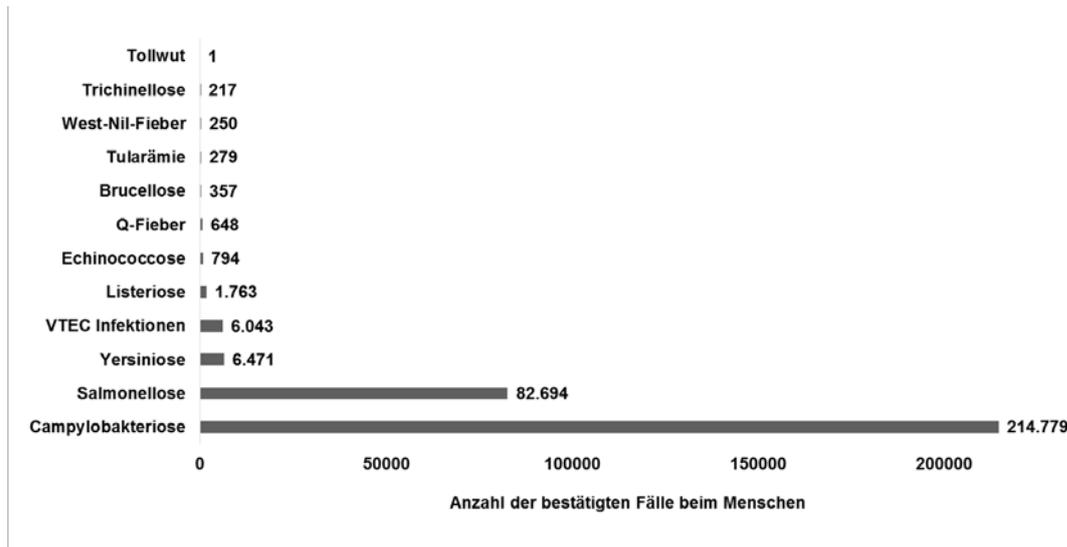


Abbildung 2: Gemeldete und bestätigte Fälle von Zoonosen beim Menschen in der EU im Jahr 2013. Die Campylobakteriose stellt dabei die am häufigsten gemeldete zoonotische Erkrankung dar, gefolgt von der Salmonellose. Fälle von Listeriose sind im Vergleich dazu selten (EFSA und ECDC, 2015).

Nach wie vor gibt es keine Impfung gegen die Listeriose. In den Vereinigten Staaten von Amerika (USA) stehen Listerien als Todesursache unter den mit Lebensmitteln übertragenen Pathogenen an dritter Stelle (Scallan *et al.*, 2011). Außerdem ist die Diagnose aufgrund der langen Inkubationsperiode und der unspezifischen Symptome sehr schwierig (Mateus *et al.*, 2013), was somit die Suche nach Zusammenhängen zur Verhinderung weiterer Infektionen erschwert. Einer der größten Listeriose-Ausbrüche der letzten Jahre und außerdem in der Geschichte der USA in den letzten 90 Jahren ereignete sich im Jahr 2011 und resultierte in 147 Krankheitsfällen, 33 Toten und einer Fehlgeburt bei Einwohnern von 28 Staaten. Der Ausbruch konnte auf den Verzehr von Cantaloupe-Melonen einer bestimmten Farm in Colorado zurückgeführt werden (CDC, 2011). Andere Fälle von Ausbrüchen in den letzten Jahren waren meistens mit kontaminierten, rohen Fleisch- oder Wurstwaren assoziiert (Winter *et al.*, 2009; Gilmour *et al.*, 2010; Hächler *et al.*, 2013) oder durch belasteten Käse verursacht worden (Koch *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2014; Schoder *et al.*, 2014; Swaminathan und Gerner-Smidt, 2007). Zur Erhöhung der Sicherheit von Lebensmitteln stellen Bakteriophagen eine vielversprechende Alternative zu Konservierungsstoffen dar. Phagen wurden bereits erfolgreich zum Schutz von Nahrungsmitteln vor einer listeriellen Besiedelung verwendet (Hagens und Loessner, 2014). So konnte beispielsweise die Applikation des Bakteriophagen LISTEX P100 auf rohem Lachsfilet die bakterielle Menge von *L. monocytogenes* signifikant reduzieren und außerdem auch deren Wachstum verhindern (Soni, 2010). Auch auf Edelstahl-Oberflächen konnte eine Reduktion der kolonieformenden Einheiten (CFU) erreicht werden (Soni und Nannapaneni, 2010). Bei immobilisierten Phagen auf Cellulose-Membranen konnte außerdem gezeigt werden, dass diese Listerien binden und lysieren können, was für die Entwicklung antibakterieller

Verpackungsmaterialien von Interesse sein könnte (Anany *et al.*, 2011). Neben diesem Einsatz in der Lebensmittelindustrie wurden Phagen ebenfalls mit Erfolg zur Bekämpfung bakterieller Infektionen eingesetzt. Bei *L. monocytogenes* ist dies jedoch aufgrund des intrazellulären Wachstums der Bakterien nicht möglich, was die Verwendung von Phagen auf den Herstellungsprozess von Lebensmitteln beschränkt (Hagens und Loessner, 2014).

Eine Listerien-Infektion in gesunden Erwachsenen kann asymptomatisch bleiben oder zu einer nicht-invasiven, selbstlimitierenden, gastrointestinalen Erkrankung führen (Ooi und Lorber, 2005). Bei anfälligen Menschen können schwerwiegenden Infektionen auftreten. Die invasive Form der Listeriose kann zu Schwangerschaftsabbrüchen, Früh- und Totgeburten führen. Bei Neugeborenen kann eine Sepsis und eine Hirnhautentzündung verursacht werden, was meist tödlich verläuft. Bei immunsupprimierten Personen können Meningitis, Enzephalitis, Meningoenzephalitis und Sepsis auftreten (Schuchat *et al.*, 1991; Bell und Kyriakides, 2005; Abram *et al.*, 2003). Die nicht-invasive Form führt zu unspezifischen, erkältungsähnlichen Symptomen wie Fieber, Kopfschmerzen und Durchfall (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Zur Behandlung werden Antibiotika eingesetzt, bevorzugt β -Lactam-Antibiotika, oder eine Kombination mit Aminoglykosiden, welche für einen Zeitraum von mindestens zwei Wochen eingenommen werden müssen (Hernandez-Milian und Payeras-Cifre, 2014).

1.1.3 Infektionszyklus von *L. monocytogenes*

Der Infektionszyklus von *Listeria* beginnt nach dem Verzehr von kontaminierter Nahrung (Abbildung 3). Die Listerien wandern durch den Verdauungstrakt in Richtung Darm, wobei sie das saure Milieu des Magens überstehen müssen. Die Adhäsion an und Invasion in Epithelzellen stellt einen aktiven Prozess dar, welcher durch die Internaline A und B (InIA und InIB) vermittelt wird. Diese beiden Faktoren sind sowohl notwendig als auch ausreichend für einen bakteriellen Eintritt in nicht-professionelle, phagozytierende Zellen wie Epithelzellen, Enterozyten, Fibroblasten und Hepatozyten sowie Makrophagen und dendritische Zellen (Kuhn und Goebel, 1997; Hamon *et al.*, 2006; Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi und Cossart, 1998). Der spezifische Rezeptor für InIA, das Ca^{2+} -abhängige Transmembranprotein E-Cadherin, befindet sich auf der Oberfläche eukaryotischer Zellen (Mengaud *et al.*, 1996; Dussurget *et al.*, 2004). Es konnte gezeigt werden, dass InIA-vermittelte Zelladhäsion von Listerien einen wirtsspezifischen Prozess darstellt, der beim Menschen, bei Hunden, Hasen, Meerschweinchen und Wüstenrennmäusen erfolgreich ist. Lediglich eine einzelne Aminosäure (AS) im E-Cadherin von Mäusen ist dafür verantwortlich, dass Listerien nicht in Mauszellen eindringen können (Lecuit *et al.*, 1999). Mäuse sind allerdings für Studien der Wirt-Pathogen-Interaktion wichtig, weswegen transgene Stämme gezüchtet wurden, die humanes E-Cadherin exprimieren und dadurch für Pathogenitätsstudien mit *L. monocytogenes* verwendet werden können (Lecuit *et al.*, 2001). InIB interagiert mit Met, dem Rezeptor für Hepatozyten-Wachstumsfaktoren, welcher auf der Oberfläche von Wirtszellen exprimiert wird. Diese Bindung ermöglicht *L. monocytogenes*, in die Zelle einzudringen (Shen *et al.*, 2000). Durch die Adhäsion der Listerien werden Signalwege aktiviert, die zur Veränderung

des Cytoskeletts und zum Eintritt der Listerien über einen sogenannten "Zipper"-Mechanismus führen. Die Bakterien werden daraufhin in einer Vakuole, dem Phagosom, internalisiert. Durch die Sekretion zweier Phospholipasen, PlcA und PlcB und dem porenbildenden Toxin Listeriolysin O wird die Vakuolenmembran zerstört, was eine listerielle Vermehrung im Cytoplasma der Wirtszellen ermöglicht. Listerien können sich auch mit Hilfe des auf der bakteriellen Oberfläche befindlichen Proteins ActA durch Aktin-Polymerisierung von Zelle zu Zelle bewegen. Der Kontakt zum extrazellulären Milieu wird auf diese Weise minimiert und ein Zusammentreffen mit zirkulierenden Antikörpern oder anderen Zellen des Immunsystems vermieden. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass Antikörper bei der Immunität gegen Listerien keine große Rolle spielen (Portnoy, 1992; Hamon *et al.*, 2006). Andere intrazelluläre Bakterien wie *Mycobacterium* sp., *Rickettsia* sp., *Shigella* sp. and *Burkholderia* sp. sind ebenfalls in der Lage, Vesikel zu lysieren, um damit ins Cytosol zu gelangen, und sich von dort aus über Polymerisierung des Wirtszell-Cytoskeletts innerhalb und zwischen Zellen fortzubewegen (Stevens *et al.*, 2006).

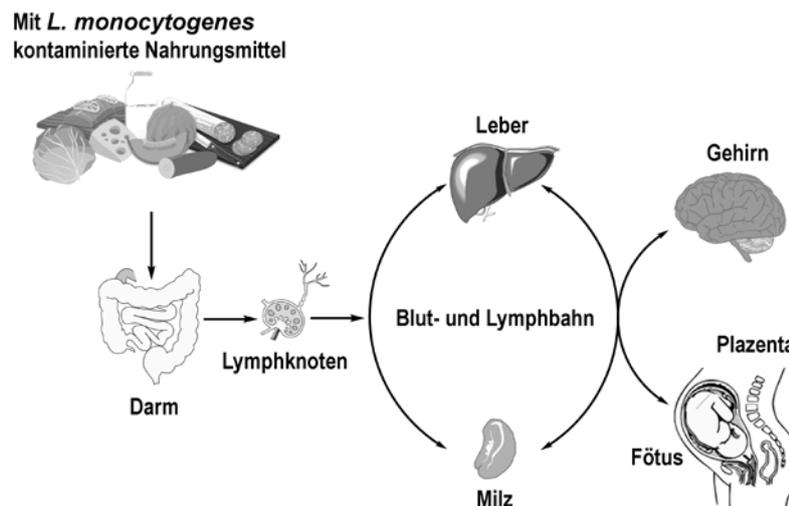


Abbildung 3: Infektionszyklus von *L. monocytogenes*.

Die Bakterien gelangen über kontaminierte Nahrungsmittel in den Intestinaltrakt und dringen von dort mit Hilfe von Internalinen in Epithelzellen ein. Über die Blut- oder Lymphflüssigkeit gelangen sie zu den Lymphknoten und Organen wie Leber und Milz. Listerien sind außerdem in der Lage, die Blut-Hirn- sowie die Blut-Plazenta-Schranke zu überwinden (modifiziert nach Cossart und Toledo-Arana, 2008).

Nach Invasion in die Epithelzellen des Darms vermehren sich Listerien bevorzugt in den Peyer-Plaques. Dort wird *hly*, welches das porenformende Cytolysin Listeriolysin codiert, als essentieller Virulenzfaktor benötigt (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Nachdem die Darmbarriere überwunden wurde, verteilen sie sich in der Blut- oder Lymphbahn und gelangen so zu Organen wie den Mesenteriallymphknoten, der Leber oder Niere (Marco *et al.*, 1992; Pron *et al.*, 1998). Bakterien im Blut oder der Leber werden, nach dortiger Anreicherung und Replikation in Hepatozyten, normalerweise von Makrophagen aus Niere und Leber sehr schnell entfernt. Spezialisierte Makrophagen, die sogenannten "Kupffer"-Zellen, spielen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung der Listerien und der Induktion von antigenabhängiger Proliferation der T-Lymphozyten sowie Cytokinsekretion zum Aufbau einer antilisteriellen Immunität. Neutrophile Granulozyten sind

ebenfalls wichtig, um eine Listerien-Infektion unter Kontrolle zu halten und letztendlich zu eliminieren (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Bei immunkompetenten Menschen kann eine bakterielle Infektion durch diese Immunfunktionen beseitigt werden. Dies müsste häufig der Fall sein, betrachtet man die hohe Frequenz, mit der man diesem ubiquitären Bakterium ausgesetzt ist und die Tatsache, dass bei gesunden Personen oft anti-Listerien T-Lymphozyten gefunden werden (Munk und Kaufmann, 1988; Zlei *et al.*, 2003). Falls die Listerien aufgrund von Defiziten der Immunabwehr nicht eliminiert werden, können sie ernsthafte Komplikationen verursachen (s. Abschnitt 1.1.2, S. 16) und letztendlich zum Tod des Patienten führen.

1.2 Metabolismus von *L. monocytogenes*

1.2.1 Pathometabolismus - Metabolismus trifft Virulenz

Der Wechsel des Umfeldes aus der Umwelt in einen Wirt erfordert viele Anpassungsprozesse und präzise, regulatorische Mechanismen, die *Listeria* eine erfolgreiche Invasion und Replikation in Wirtszellen ermöglichen. Diese Umstellungen umfassen beispielsweise den Verlust der Flagellen und das Umschalten auf die Aktin-basierte Fortbewegung zwischen Zellen sowie die Manipulation des Wirts, um dessen Immunsystem zu entgehen. Die meisten der Gene, die bei *L. monocytogenes* nach dem Wirtseintritt exprimiert werden, unterliegen der Kontrolle des zentralen Virulenzregulators PrfA (Kreft und Vázquez-Boland, 2001; Bruno und Freitag, 2010). Auch der alternative Sigmafaktor σ^B , ein weiterer Schlüsselregulator, ist für die Virulenz, für die Anpassung an die sich ändernden Umweltbedingungen und für die Stressantwort wichtig (Abram *et al.*, 2008). Von besonderer Bedeutung ist jedoch vor allem die Anpassung an die sich ändernden Nährstoffbedingungen beim Wechsel in eine neue Umgebung, da diese im Darm, innerhalb von Wirtszellen und in Körperflüssigkeiten, wie Blut oder Lymphe, völlig unterschiedlich sind. Ein funktionierender Metabolismus ist dabei eine Voraussetzung für die Expression der Virulenz pathogener Bakterien. Die metabolisch generierte Energie und neu synthetisierte Stoffwechselprodukte werden für die Kolonisierung des Darmepithels, die Proliferation im Darm, zur Produktion von Virulenzfaktoren, zum Umgehen der Immunabwehr des Wirts und letztendlich zur weiteren Verbreitung der Bakterien in der Umwelt benötigt (Staib und Fuchs, 2014).

In der Pathogenitätsforschung fand der Metabolismus bisher wenig Beachtung, da sich das Interesse in diesem Feld hauptsächlich auf klassische Virulenzfaktoren wie die oben genannten beschränkte. Dies änderte sich jedoch in den letzten Jahren durch neue Forschungsergebnisse, nicht zuletzt aus dem von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützten Schwerpunktprogramm SPP1316 (Wirtsadaptierter Metabolismus von bakteriellen Infektionserregern), unter welchem auch die vorliegende Forschungsarbeit aufgehängt ist. In vielen dieser Studien konnte gezeigt werden, dass es regulatorische Verbindungen zwischen dem Stoffwechsel und der Ausprägung der bakteriellen Virulenz gibt, und der bakterielle Metabolismus, bzw. die Fähigkeit von Bakterien zur Anpassung an bestimmte Nährstoffnischen, für eine erfolgreiche Infektion essentiell ist (Eisenreich *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2012a; Fuchs *et*

al., 2012b; Abu Kwaik und Bumann, 2015; Eisenreich *et al.*, 2016). Dies betrifft nicht nur den bakteriellen Stoffwechsel, sondern auch die durch eine Infektion induzierten metabolischen Veränderungen in der Wirtszelle. Diese enge Wechselwirkung der beiden Interaktionspartner und die damit einhergehenden, vielfältigen Abhängigkeiten werden inzwischen als „Pathometabolismus“ bezeichnet (Abbildung 4). Dessen Untersuchung ist zum einen notwendig, um bakterielle Infektionen, die von intrazellulären Pathogenen verursacht wurden, besser verstehen zu können, zum anderen können so auch wichtige Gene und Faktoren gefunden werden, die für die Entwicklung neuartiger, antibakterieller Therapeutika von Bedeutung sind. Im Zuge der zunehmenden Anzahl an Antibiotikaresistenzen ist das Auffinden neuer Ansatzpunkte von hoher Bedeutung. Metabolische Faktoren stellen hierfür ideale Kandidaten dar, insbesondere solche, die im Infektionsgeschehen für *L. monocytogenes* essentiell sind. Mit geeigneten Medikamenten könnten bestimmte Stoffwechselwege unterbrochen und Infektionen so besser behandelt werden (Eisenreich *et al.*, 2015).

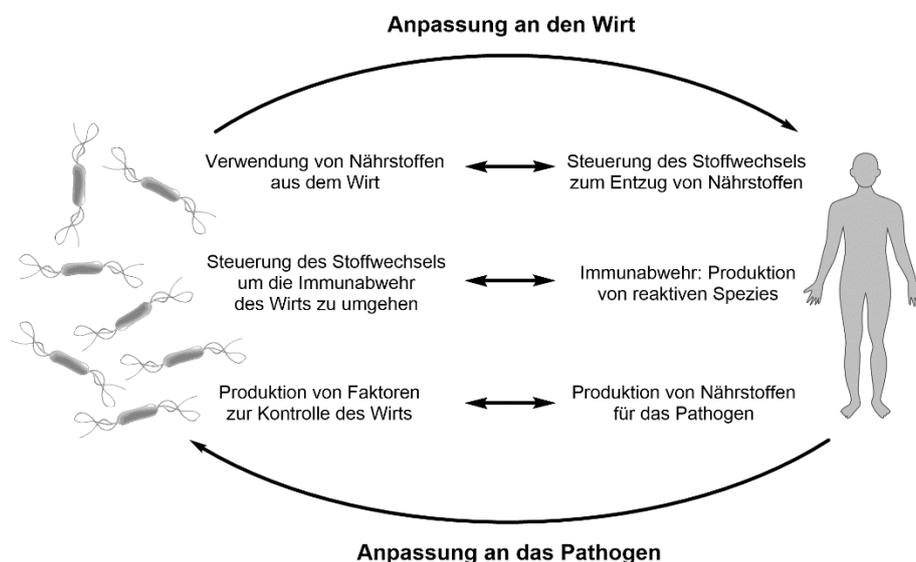


Abbildung 4: Der Pathometabolismus.

Dieser Begriff beschreibt die enge Wechselwirkung von Wirt und Pathogen und die damit einhergehenden, vielfältigen Abhängigkeiten (modifiziert nach Eisenreich *et al.*, 2016).

1.2.2 Kohlenstoff-Metabolismus

Zur Versorgung mit Energie und Kohlenstoff (C) beziehen Listerien Zucker und Zuckeralkohole über sogenannte PTS-Systeme (Phosphotransferase-Systeme), von denen ungewöhnlich viele im Genom von *L. monocytogenes* codiert sind (Glaser *et al.*, 2001). 11,6 % aller Gene codieren für Transporter, von diesen wiederum 26 % für den PTS-medierten Transport von C-Quellen. Als solche verwenden sie beim Wachstum in einem definierten Medium bevorzugt Glucose, Fructose, Mannose und Cellobiose (Tsai und Hodgson, 2003; Slaghuis *et al.*, 2007). Diese Zucker werden in reichhaltigem Medium hauptsächlich über die Glykolyse abgebaut, in nährstoffärmerer Umgebung scheinbar jedoch über den Pentosephosphatweg (PPP), da die Gene für den PPP beim Wachstum in einem Minimalmedium (MM) induziert wurden und diese für die Glykolyse nur

noch gering reguliert waren. Der gleiche Effekt konnte auch für *L. monocytogenes* gezeigt werden, die im Cytosol von Säugerzellen wuchsen (Joseph *et al.*, 2006). Der Citratzyklus (TCA), welcher zur Energiegewinnung und Bereitstellung von Zwischenprodukten für anabolische Zwecke dient, ist bei Listerien unvollständig, da das Enzym α -Ketoglutarat-Dehydrogenase fehlt (Eisenreich *et al.*, 2006; Trivett und Meyer, 1971). Folglich wird Oxalacetat, welches einen Vorläufer für die Synthese von AS der Aspartat-(Asp)-Familie darstellt, hauptsächlich durch die Carboxylierung von Pyruvat über die Pyruvatcarboxylase (PycA) gewonnen (Eisenreich *et al.*, 2006). Auch phosphorylierte Hexosen, wie Glucose-6-Phosphat, können als C-Quellen verwendet werden, wofür der Transporter UhpT identifiziert werden konnte (Chico-Calero *et al.*, 2002). C₂-Körper und auch Fettsäuren scheiden aufgrund eines fehlenden Glyoxylat-Zyklus als C-Quellen aus, jedoch kann der C₃-Körper Glycerin effektiv verstoffwechselt werden (Tsai und Hodgson, 2003; Hain *et al.*, 2007; Joseph *et al.*, 2008). AS können nicht als alleinige C-Quelle dienen, ohne die Anwesenheit weiterer Substrate findet ein rascher Eintritt in die stationäre Phase statt (Gefen *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass AS beim Wachstum im Cytosol einer Wirtszelle hauptsächlich direkt in die Proteine eingebaut und nicht katabolisiert werden (Grubmüller *et al.*, 2014).

1.2.3 Stickstoff-Metabolismus

Stickstoff (N) ist ein essentieller Baustein für AS, Nukleinsäuren und andere zelluläre Komponenten. Bakterien können ihren N-Bedarf durch einfache Moleküle, wie anorganisches N₂ oder Nitrat, abdecken, aber sie können auch komplexe Moleküle, wie AS oder Nucleoside, verwenden. Stickstoff wird über verschiedene Wege in die AS Glutamat (Glu) und Glutamin (Gln) eingebaut, welche bei zellulären, biosynthetischen Reaktionen eine wichtige Rolle als Lieferanten dieses essentiellen Elements spielen. Über den listeriellen Metabolismus und den N-Bedarf im Speziellen konnten viele Erkenntnisse durch die Entwicklung von MM gewonnen werden (Siddiqi und Khan, 1982; Phan-Thanh und Gormon, 1997; Schneebeil und Egli, 2013). Diese spezifischen Wachstumsmedien, bei denen die genaue Zusammensetzung bekannt ist und exakt verändert werden kann, werden für Substratstudien bei Bakterien verwendet. Sie ersetzen die sogenannten Vollmedien, wie beispielsweise BHI (Hirn-Herz-Bouillon), die mit nährstoffreichen Zusätzen wie Hefeextrakt oder Pepton aufgrund der Nährstoffanforderungen von *L. monocytogenes* für lange Zeit in vielen Studien verwendet wurden. Nur mit einem genau definierten Medium können Aussagen darüber getroffen werden, welche Stoffe in welcher Menge für die bakterielle Proliferation notwendig sind.

Die Assimilation von Stickstoff verläuft zwischen den Substraten α -Ketoglutarat, Glu und Gln (Abbildung 5). Dabei katalysiert die NADPH₂-abhängige Glutamatdehydrogenase (GDH, *Imo0560*) die Konvertierung von Glu zu α -Ketoglutarat und umgekehrt. Mit Hilfe der Glutamatsynthase (GOGAT, *Imo1733/1734/gltD*) entstehen durch Übertragung der Amidgruppe von Gln auf α -Ketoglutarat zwei Moleküle Glu. Das für die letztere Reaktion benötigte Gln wird wiederum durch die ATP-abhängige Glutamat-Ammonium-Ligase (GS, *Imo1299/glnA*), durch die

Übertragung eines Moleküls Ammonium auf Glu, gebildet. Der GS-GOGAT-Weg ist unter N-limitierenden Bedingungen der dominante und konservierte Weg zur Assimilation von Ammonium, wohingegen die GDH aufgrund ihrer geringen Affinität zu Ammonium nur bei hohen, intrazellulären Ammonium-Konzentrationen aktiv ist (Forchhammer, 2007; Reitzer, 2003). Bei beiden Wegen wird α -Ketoglutarat, welches das C-Gerüst von Glu darstellt, aus dem TCA gewonnen. Diese Reaktion stellt daher eine wichtige, metabolische Verknüpfung dar, die den N mit dem C-Metabolismus verbindet (Commichau *et al.*, 2006; Sonenshein, 2007; Gunka und Commichau, 2012).

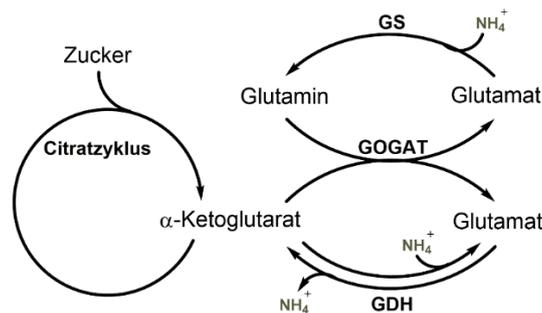


Abbildung 5: Der Auf- und Abbau von Glutamat bei *L. monocytogenes*.

Die Biosynthese von Glutamat verbindet den C- und N-Metabolismus über das gemeinsame Zwischenprodukt α -Ketoglutarat (modifiziert nach Gunka und Commichau, 2012). Abkürzungen: GS, Glutamat-Ammonium Ligase; GOGAT, Glutamatsynthase; GDH, Glutamatdehydrogenase.

Bacillus subtilis ist das am besten charakterisierte grampositive Bakterium mit geringem GC-Gehalt in der DNS, und dient daher auch als Modellorganismus für den N-Metabolismus (Gunka und Commichau, 2012). Bei *B. subtilis* werden die meisten Gene des N-Metabolismus von den Transkriptionsregulatoren TnrA und GlnR kontrolliert, im Gegensatz zu Enterobakterien, bei denen diese von einem Ntr-Zweikomponentensystem geregelt werden (Magasanik, 1993; Merrick und Edwards, 1995). *L. monocytogenes* besitzt ähnliche Gene wie *B. subtilis* für diese Regulation, jedoch fehlt TnrA, sodass die Koordination der verschiedenen Reaktionen ausschließlich über GlnR (*Imo1298*, globaler N-Regulator) verläuft (Doroshchuk *et al.*, 2006). Das GlnR-Regulon ist bei *Streptococcus* spp. und *Staphylococcus* spp., welche ebenfalls kein TnrA besitzen und GlnR dessen Funktion übernommen hat, hochkonserviert (Castellen *et al.*, 2011; Kloosterman *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2006), sodass für *L. monocytogenes* ein ähnlicher Mechanismus angenommen wird. Gene, die beim GS-GOGAT-Weg beteiligt sind (*glnA*, *gltAB*), sind intrazellulär hochreguliert und könnten für die Anpassung an das intrazelluläre Milieu und die Proliferation im Cytosol einer Wirtszelle essentiell sein (Joseph *et al.*, 2006).

Stickstoff-Quellen von *L. monocytogenes*

Gln konnte bei *Listeria* beim Wachstum in modifizierter, mit AS angereicherter Welshimer's Bouillon (MWB) als primäre N-Quelle identifiziert werden (Premaratne *et al.*, 1991; Welshimer, 1963). Diese AS ist ein optimaler N-Lieferant für viele bakterielle Spezies wie z.B. *B. subtilis* (Merrick und Edwards, 1995; Hu *et al.*, 1999; Detsch und Stülke, 2003) oder *Corynebacterium*

glutamicum (Rehm *et al.*, 2010). Sie kann leicht zu Glu umgebaut werden, welches den Haupt-Stickstoffdonor für andere AS und die Nucleosid-Biosynthese darstellt. Weitere AS könnten ebenfalls als N-Quellen dienen, da die Gene für viele ihrer zum Abbau notwendigen Wege im Genom von *L. monocytogenes* vorhanden sind (Glaser *et al.*, 2001). Lediglich zwei AS, Methionin (Met) und Cystein (Cys), erwiesen sich in Wachstumsexperimenten mit systematischer Deletion von Enzymen der Biosynthesewege als essentiell. Der Grund dafür könnte an den fehlenden Genen zur Sulfatreduktion liegen, bei der Sulfid entsteht, welches einen Vorläufer in der Cys-Synthese darstellt und da Thiosulfat, ein alternatives Vorläufermolekül, Cys nicht ersetzen kann. Die beim Wachstum mit nur diesen beiden essentiellen AS Met und Cys beobachtete lange Latenzphase kann durch Zugabe eines AS-Mixes kompensiert werden (Tsai und Hodgson, 2003). Die verzweigt-kettigen AS (BCAAs) Leucin (Leu), Isoleucin (Ile) und Valin (Val) wirken sich in definiertem Medium stark fördernd auf die Wachstumsrate aus, sodass diese AS ebenfalls einen essentiellen Beitrag zum N-Umsatz leisten könnten (Premaratne *et al.*, 1991; Welshimer, 1963). Gln kann durch anorganisches Ammonium ersetzt werden, wodurch die listeriellen Wachstumsraten sogar erhöht werden (Tsai und Hodgson, 2003; Kaspar *et al.*, 2014). *L. monocytogenes* ist aufgrund fehlender Gene für die benötigten Reduktasen nicht in der Lage, Nitrat oder Nitrit zu reduzieren. Die Versorgung mit Stickstoff beschränkt sich daher auf reduzierte N-Quellen. Auch Harnstoff kann nicht verstoffwechselt werden, da bei Listerien die dafür benötigte Urease fehlt (Glaser *et al.*, 2001). Arginin (Arg) wurde bisher ebenfalls als wichtige N-Quelle vermutet, da diese AS in manchen Listerien-Stämmen die Wachstumsrate erhöht, und in einigen sogar für das Wachstum notwendig ist (Friedman und Roessler, 1961; Tsai und Hodgson, 2003; Premaratne *et al.*, 1991; Welshimer, 1963). Der Abbau von Arg und die Ammoniumproduktion daraus können ausschließlich über den Arginin-Deiminase-(ADI)-Weg laufen (Ryan *et al.*, 2009), da die Gene für die Arginase oder die Arginin-Oxygenase-Stoffwechselwege, welche von *Bacillus* und anderen Spezies genutzt werden, fehlen (Glaser, 2001). Als weitere, von *L. monocytogenes* nutzbare Quellen, kommen außerdem Ethanolamin und Glucosamin in Frage (s. Abschnitt 1.2.6, S. 27).

1.2.4 Metabolismus während der Replikation im Wirt

Trotz weniger verfügbarer Daten über den listeriellen Metabolismus zeigten mehrere Studien in den vergangenen Jahren, dass es signifikante Unterschiede zwischen dem *in vivo*- und dem *in vitro*-Stoffwechsel gibt (Muñoz-Elías und McKinney, 2006; Toledo-Arana *et al.*, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010). In Transkriptom-Analysen, bei denen das Wachstum von *Listeria* in Standardmedium mit dem im Blut und im Darm verglichen wurde, waren zahlreiche Gene unterschiedlich reguliert, davon ein großer Anteil an Genen, die am bakteriellen Metabolismus beteiligt sind (Toledo-Arana *et al.*, 2009).

Die listerielle Infektionsroute beginnt im Gastrointestinaltrakt, nach der Aufnahme kontaminierter Nahrung. An die 1000 bakterielle Spezies besiedeln den menschlichen Darm, ein einzelner Mensch beherbergt dort mindestens 160 Spezies, die eine bakterielle Menge von ca. 10^4

prokaryotischen Zellen ausmachen (Qin *et al.*, 2010). Neben anderen Stressfaktoren, die es zu überwinden gilt, herrscht hier daher auch ein Konkurrenzkampf um Nährstoffe, sowohl mit dem Wirt, als auch mit der kommensalen Mikrobiota. Enteropathogene müssen, um in diesem Milieu überleben zu können, spezielle metabolische Nischen besiedeln. Der Abbau von *myo*-Inositol (Legakis *et al.*, 1976; Yoshida *et al.*, 1997; Kawsar *et al.*, 2004), Ethanolamin, welches von Phosphatidylethanolamin abgespalten wird (Roof und Roth, 1988; Tsoy *et al.*, 2009; Garsin, 2010), Fucose aus mukosalen Glycokonjugaten (Salyers und Pajean, 1989; Snider *et al.*, 2009; Staib und Fuchs, 2014) oder 1,2-Propanediol als Fermentationsprodukt von Fucose oder Rhamnose (Conner *et al.*, 1998; Korbel *et al.*, 2005; Staib und Fuchs, 2014) sind dabei nur einige Beispiele für spezielle Nährstoffquellen, durch deren Nutzung Enteropathogene einen Wachstumsvorteil erreichen können. Die Konzentration der verwendbaren Substrate variiert dabei je nach Darmabschnitt (Staib und Fuchs, 2014). Ein Beispiel für eine besondere Wechselwirkung mit dem Wirt konnte für *Salmonella* gezeigt werden. Tetrathionat wird von diesen Bakterien als Elektronenakzeptor für den anaeroben Abbau von Ethanolamin benötigt (Price-Carter *et al.*, 2001). Die Bildung dieser Verbindung resultiert aus dem von Darmbakterien gebildeten Schwefelwasserstoff (H_2S), welcher toxisch ist und deshalb ebenfalls von diesen weiter in Thiosulfat umgewandelt wird. Thiosulfat kann dann anschließend durch reaktive Sauerstoffradikale (ROS) zu Tetrathionat oxidiert werden. Diese ROS werden dabei im Zuge der Immunantwort des Wirts auf die Salmonelleninfektion durch Entzündungsreaktionen produziert (Winter *et al.*, 2010). *L. monocytogenes* besitzt keine orthologe Tetrathionat-Reduktase, kann diesen Elektronen-Akzeptor daher scheinbar nicht nutzen. Die *pdu*-Gene, die zur Nutzung von Propanediol benötigt werden, sind neben denen für die Ethanolamin-Nutzung (*eut*) während des intrazellulären Wachstums in Epithelzellen sowie im Darm von Mäusen hochreguliert, was darauf hindeutet, dass Propanediol und Ethanolamin für die listerielle Pathogenität von Bedeutung sind (Archambaud *et al.*, 2012). Beim Wachstum in Minimalmedium (MM) mit Propanediol oder Vitamin B₁₂ unter verschiedenen Bedingungen konnte jedoch auch unter Zugabe möglicher Elektronenakzeptoren wie Tetrathionat, Nitrat, Dimethylsulfoxid oder Fumarat kein Wachstum erreicht werden, weshalb vermutet wird, dass *L. monocytogenes* einen anderen, für seine *in vivo*-Nische spezifischen Elektronenakzeptor für die Nutzung von Propanediol oder Ethanolamin unter anaeroben Bedingungen benötigt (Mellin *et al.*, 2013). In einer Studie konnte außerdem auch gezeigt werden, dass die Anwesenheit der umgebenden Mikrobiota sich ebenfalls auf die Genexpression von *L. monocytogenes* auswirkt. So führte die An- oder Abwesenheit verschiedener Stämme von *Lactobacillus* sp. im Darm eines Mausmodells zu unterschiedlichen Transkriptionsmustern bei den Listerien (Archambaud *et al.*, 2012).

L. monocytogenes ist, neben Bakterien wie enteroinvasiven *Escherichia coli* und *Shigella flexneri*, auch in der Lage, sich innerhalb des Cytosols einer Wirtszelle zu vermehren. Dort herrscht ein neutraler pH-Wert und Magnesium, Natrium, Eisen und bis zu 100 mögliche Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphat- und Sulfatquellen liegen in geringer Konzentration vor (Ray *et al.*, 2009). Die genaue Zusammensetzung des Cytosols ist jedoch immer noch nicht bekannt und hängt stark von der Art der Zelle ab. Bisher wurde angenommen, dass das Cytosol ein sehr nährstoffreiches Kompartiment darstellt, jedoch zeigten Experimente, bei denen extrazelluläre Pathogene wie

Yersinia enterocolitica und *E. coli* ins Cytoplasma injiziert wurden, dass diese dort nicht wachsen konnten (Goetz *et al.*, 2001). Dies kann zum einen bedeuten, dass vorhandene Nährstoffe nicht zugänglich sind, oder dass metabolische Anpassungen der Bakterien notwendig sind, um ein Überleben dort zu bewerkstelligen. Der Zusammenhang mit der Virulenz wird durch die Tatsache deutlich, dass nicht-pathogene Stämme wie *L. innocua* nicht in der Lage sind, sich im Cytoplasma effektiv zu vermehren (Slaghuis *et al.*, 2004).

1.2.5 Intrazelluläre Nutzung von Kohlenstoff und anderen Nährstoffen

Dem C-Metabolismus kommt eine entscheidende Rolle bei der listeriellen Virulenz zu. Sämtliche Gene für ABC-Transporter sind in Listerien konserviert, jedoch nicht solche für PTS-Systeme, wie ein Vergleich von *L. monocytogenes* mit dem nicht-pathogenen Stamm *L. innocua* ergab (Glaser *et al.*, 2001; Buchrieser *et al.*, 2003). Beim Wachstum in MM mit PTS-Zuckern wie Glucose, Mannose oder Cellobiose kann eine starke Kohlenstoff-Katabolitrepession (CCR) und eine geringe Aktivität des zentralen Virulenzregulators PrfA beobachtet werden (Mertins *et al.*, 2007), welcher auch unter anderem die Gene für den Eintritt in die Wirtszelle (*inIA*, *inIB*), für das Verlassen des Phagosoms (*hly*, *plcA* und *plcB*) und für die intra- und interzelluläre Fortbewegung (*actA*) kontrolliert (Vázquez-Boland *et al.*, 2001). Auch beim Wachstum im Cytoplasma zeigen die vom zentralen Virulenzregulator PrfA kontrollierten Gene in Anwesenheit von Glucose eine geringere Expression (Joseph *et al.*, 2006; Joseph *et al.*, 2008). Die für die Glykolyse notwendigen Faktoren werden ebenfalls nicht hochreguliert, was vermuten lässt, dass wenig freie Glucose im Cytoplasma vorhanden ist und Listerien sich dort eher an alternativen Quellen bedienen (Hain *et al.*, 2007). Eine Überexpression von PrfA führt sogar zu einer Inhibition der Glucose-Aufnahme (Marr *et al.*, 2006), was die Vermutung, dass Glucose im Infektionsgeschehen eine untergeordnete Rolle spielt, weiter untermauert.

Stattdessen können Glycerin und Glucose-6-Phosphat als C-Quellen genutzt werden (Eylert *et al.*, 2008). Glucose-6-Phosphat wird dabei über den Antiporter UhpT (*Imo0838*) aufgenommen, der bei nicht-pathogenen *Listeria*-Spezies nicht vorhanden ist. Infizierte Wirtszellen einer primären Zelllinie nahmen dabei im Vergleich zu nicht-infizierten vermehrt Glucose auf, was möglicherweise auch durch die Bakterien selbst induziert wird, da diese wiederum von *L. monocytogenes* nach Phosphorylierung als Glucose-6-Phosphat genutzt werden kann (Gillmaier *et al.*, 2012). Die Verbindung zur Pathogenität von *L. monocytogenes* wird weiterhin durch die Tatsache deutlich, dass UhpT von PrfA gesteuert wird (Chico-Calero *et al.*, 2002; Toledo-Arana *et al.*, 2009). Die *hpt*-Gene waren außerdem während des intrazellulären Wachstums von *L. monocytogenes* stark hochreguliert und ein Defekt in diesen Genen führte zu deutlich verringerten Replikationsraten (Chico-Calero *et al.*, 2002; Milohanic *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu zeigten von PrfA regulierte Gene mit dem nicht-PTS-Zucker Glycerin als C-Quelle eine hohe Transkription. Auch waren die Gene für diverse PTS-Transportsysteme induziert sowie jene für den PPP, welcher bei alternativen C-Quellen anstelle von Glucose bevorzugt für deren Katabolismus verwendet wird (Chatterjee *et al.*, 2006; Joseph *et al.*, 2006;

Joseph *et al.*, 2008). Beim Wachstum im Darm waren Gene für die Glycerin-Aufnahme und dessen Abbau zur Energieversorgung hochreguliert (Toledo-Arana *et al.*, 2009) wohingegen Glucose-6-Phosphat eher für anabole Zwecke genutzt wird (Grubmüller *et al.*, 2014). Dies zeigt deutlich, wie sich *L. monocytogenes* durch die flexible und zeitgleiche Nutzung verschiedener Nährstoffquellen für unterschiedliche metabolische Reaktionen an ein Überleben in einer Wirtszelle angepasst hat.

Da Listerien einen unvollständigen Citratzyklus besitzen, kann das Oxalacetat darin nur durch Carboxylierung von Pyruvat gebildet werden. Eine Mutante im zugehörigen Gen *pycA* konnte sich zwar in einem reichhaltigen Medium wie BHI (Hirn-Herz-Bouillon) noch vermehren, nicht jedoch in Säugerzellen, und in einem Maus-Sepsismodell ließ sich sogar eine hohe Attenuierung beobachten (Schär *et al.*, 2010). Da die Pyruvatcarboxylase abhängig von der Lipoat-Protein-Ligase LplA1 ist, war eine Mutante mit einem Defekt in diesem Enzym ebenfalls stark im intrazellulären Wachstum inhibiert (O'Riordan *et al.*, 2003). Dies führt vor Augen, dass die Pyruvatcarboxylase für die Infektion von entscheidender Bedeutung ist, und somit ein Schlüsselenzym im zentralen Metabolismus von *L. monocytogenes* darstellt (Schär *et al.*, 2010).

Listerien sind weiterhin nicht in der Lage, bestimmte Vitamine wie Riboflavin, Thiamin oder Biotin selbst zu synthetisieren, weshalb diese beim Wachstum in einem MM zugesetzt werden, und bei einer Infektion im Wirt von jenem bezogen werden müssen. Die intrazelluläre Proliferation hängt daher auch von der Verfügbarkeit dieser Vitamine ab, was für Thiamin und dessen Aufnahme über *thiT* (*Imo1429*) bereits gezeigt werden konnte, da eine Mutante in diesem Gen in Epithelzellen eine verringerte Replikationsrate zeigte (Schauer *et al.*, 2009). Beim Wachstum im Darm waren *pycA* und auch *thiT* herunterreguliert (Toledo-Arana *et al.*, 2009), was bedeuten könnte, dass diese Gene hauptsächlich bei intrazellulärem Wachstum eine Rolle spielen.

Auch viele andere Proteine, die am Transport bestimmter Nährstoffe beteiligt sind, erscheinen essentiell, wie beispielsweise für Eisen (*Imo1683*) oder Ferrochrom (*Imo2430*; Toledo-Arana *et al.*, 2009; Chatterjee *et al.*, 2006). Die verstärkte Synthese von Purinen und Pyrimidinen bei intrazellulär replizierenden Listerien, die für deren Proliferation essentiell ist, deutet hingegen darauf hin, dass diese Verbindungen innerhalb der Zelle rar oder schwer zugänglich sind (Joseph *et al.*, 2006; Schauer *et al.*, 2010). Das Gen *relA*, welches den Repressor CodY reguliert, der bei der stringenten Antwort von Bakterien und somit bei der Umstellung des Metabolismus bei Nährstoffknappheit eine Rolle spielt, ist vermutlich ebenfalls für das Überleben *in vivo* von Bedeutung, da eine Mutante beim intrazellulären Wachstum in Epithelzellen und Makrophagen stark attenuiert war (Bennett *et al.*, 2007).

1.2.6 Intrazellulärer Stickstoff-Metabolismus

Ähnlich wie beim Kohlenstoff scheinen sich Listerien auch in Bezug auf den Stickstoff innerhalb eines Wirtes an alternativen Quellen zu bedienen, was einerseits auf deren Verfügbarkeit zurückzuführen ist, andererseits aber auch vermutlich dazu dient, die Beeinträchtigung des

Wirtes zu minimalisieren, um sich diese geschützte Umgebung möglichst lange zu erhalten. *E. coli* Stämme, welche eine Nitrat-Reduktase besitzen, profitieren ähnlich wie Salmonellen bei der Tetrathionat-Nutzung (s. Abschnitt 1.2.4, S. 24) von Entzündungsreaktionen im Darm. Nitrat, das während einer Infektion entsteht, kann von ihnen als Elektronenakzeptor verwendet werden, wodurch sie sich einen Wachstumsvorteil verschaffen können (Winter *et al.*, 2013). Eine solche Strategie ist bei Listerien aufgrund der fehlenden Nitrat-Reduktase-Gene jedoch nicht möglich (Glaser *et al.*, 2001).

Gene, die an der Biosynthese für Glu und Gln beteiligt sind, waren in Studien bei intrazellulärer Replikation hochreguliert (Joseph *et al.*, 2006), Gln wird also unter diesen Bedingungen von den Bakterien vermehrt selbst synthetisiert. Des Weiteren war das Gen für den Gln-Transporter *Imo0847* sowohl im Blut als auch im Darm herunterreguliert (Toledo-Arana *et al.*, 2009). Es wird daher angenommen, dass für die Versorgung mit Stickstoff anstelle von Gln andere N-Quellen wie Ammonium, Arg oder Ethanolamin dienen können, da zahlreiche Studien Hinweise für diese These liefern (Buchrieser *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2006; Joseph und Goebel, 2007; Ryan *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2012b; Staib und Fuchs, 2014). Das Gen für den Ammoniumtransporter *NrgAB* war bei Studien im Mäusedarm herunter-, in humanen Epithelzellen jedoch stark hochreguliert (Toledo-Arana *et al.*, 2009; Joseph *et al.*, 2006). *ArpJ*, ein Arginin ABC Transporter, wird in Makrophagen verstärkt exprimiert (Klarsfeld *et al.*, 1994). Ethanolamin kann von vielen pathogenen Bakterien und auch von *L. monocytogenes*, vor allem innerhalb eines Wirtes, als Nährstoffquelle verwendet werden. Es wird dabei vermutlich hauptsächlich in Form von Phosphatidylethanolamin über den Transporter *EutH (Imo1186)* aufgenommen. Phosphatidylethanolamin ist ein in den Membranen von Säugetier- und Bakterienzellen häufig vorkommendes Phospholipid, welches über eine Phospholipase (*PlcB*) zu Glycerin und Ethanolamin abgebaut werden kann (s. Abbildung 6). In Bezug auf die Nährstoffversorgung von Bakterien stellen Epithelzellen im Darm und die Wirtsdiet somit üppige Quellen für Ethanolamin dar. Das Molekül besteht aus einem primären Amin und einem primären Alkohol, kann über die Ethanolamin-Ammoniak-Lyase *EutBC* in Ammonium und Acetaldehyd gespalten und von vielen Bakterien wie beispielsweise *Salmonella* spp., *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. oder *Escherichia* spp. als einzige C-, N- oder Energiequelle verwendet werden (Roof und Roth, 1988; Garsin, 2010; Srikumar und Fuchs, 2011; Staib und Fuchs, 2014). *L. monocytogenes* besitzt alle Gene des *eut*-Operons, die für die Metabolisierung von Ethanolamin notwendig sind (Glaser *et al.*, 2001), weswegen die Nutzung dieses Substrats, möglicherweise auch primär unter *in vivo*-Bedingungen, sehr wahrscheinlich ist. Auch für *plcB* konnte gezeigt werden, dass das Gen beim Wachstum innerhalb von Wirtszellen erheblich hochreguliert ist, Ethanolamin also vermehrt gebildet wird. Eine Mutation resultierte bei cytosolischem Wachstum in einer dezimierten Replikationsrate (Goetz *et al.*, 2001). Die Ethanolamin-Lyase *EutABC* scheint darüber hinaus für ein normales intrazelluläres Wachstum notwendig zu sein, da eine Mutante im Gen *eutB* sich in der Epithelzelllinie Caco-2 schlechter vermehren konnte als der Wildtyp (Joseph und Goebel, 2007; Joseph *et al.*, 2006). Da Ethanolamin aus Phosphatidylethanolamin gebildet werden kann, kommen auch Phospholipide, welche zahlreich im Wirtsdarm vorhanden sind, als N- aber auch als C- und Energiequelle während einer Infektion in Frage.

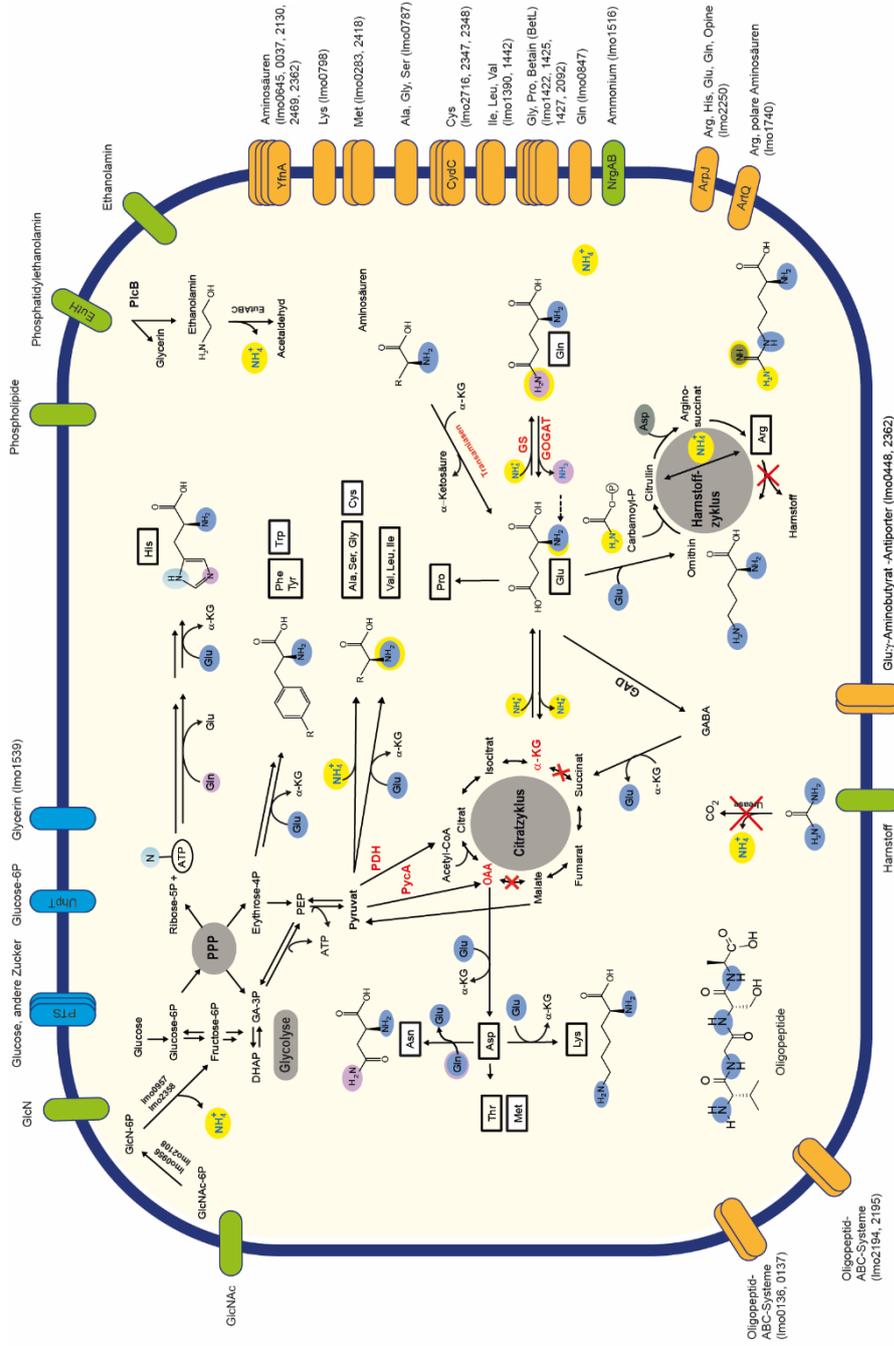


Abbildung 6: Übersicht über den Metabolismus von *L. monocytogenes*.

Gezeigt wird das metabolische Grundgerüst, welches für die *de novo*-Biosynthese aller AS notwendig ist. C-Quellen werden über blau gezeichnete Transporter in die Zelle geschleust, solche relevanter N-Quellen sind in orange und grün dargestellt (s. auch Tab. S1 in Kutzner *et al.*, 2016). Gelb markierte N-Atome stammen von anorganischem NH_3 , blaue von der Gln-Seitenkette. Wichtige Enzyme und Substrate sind rot markiert, durchgestrichene Pfeile bedeuten ein Fehlen der notwendigen Gene. Abkürzungen: ATP, Adenosintriphosphat; α -KG, α -Ketoglutarat; P, Phosphat; R, Rest; GA-3P, Glycerinaldehyd-3-phosphat; PEP, Phosphoenolpyruvat; PPP, Pentosephosphatweg; OAA, Oxalacetat; CoA, Coenzym A; GABA, α -Aminobutyrat; GlnN, Glucosamin; GlnAC, N-Acetylglucosamin; GS, Glutamat-Ammonium-Ligase; GOGAT, Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase (Glutamatsynthase); GAD, Glutamat-Decarboxylase (modifiziert nach Kutzner, nicht veröffentlicht).

Für diese Hypothese spricht außerdem, dass Ethanolamin *in vivo* nur unter anaeroben Bedingungen metabolisiert werden kann, da hierfür Cobalamin (Vitamin B₆) als Cofaktor benötigt wird, welches nur unter Sauerstoffabschluss synthetisiert wird (Price-Carter *et al.*, 2001; Winter *et al.*, 2010; Srikumar und Fuchs, 2011).

Auch das Monosaccharid N-Acetylglucosamin (GlcNAc) kann *L. monocytogenes* anstelle von Glucose als C-Quelle dienen (Pine *et al.*, 1989; Premaratne *et al.*, 1991). GlcNAc und Ethanolamin kommen ubiquitär im Darm vor und sind daher in Bezug auf den listeriellen Metabolismus unter *in vivo*-Bedingungen von besonderem Interesse (Staub und Fuchs, 2014; Martin *et al.*, 2009). Da es sich bei Glucosamin (GlcN) um einen Aminozucker handelt, könnte dieser ebenfalls als N-Quelle verwendet werden. Die Aufnahme erfolgt in Form von GlcNAc oder GlcN, worauf ein Umbau in GlcN-6-Phosphat erfolgt (s. Abbildung 6). Anschließend wird dieses entweder weiter für die Biosynthese von Peptidoglycan verwendet, oder aber zu Fructose-6-Phosphat und Ammonium abgebaut (Popowska *et al.*, 2012).

Mindestens sechs listerielle Transporter wurden in einer Studie identifiziert, die für das Überleben und die erfolgreiche Replikation in Makrophagen essentiell sind. Diese sind höchstwahrscheinlich an der Aufnahme von AS und Oligopeptiden beteiligt (Joseph und Goebel, 2007; Schauer *et al.*, 2010). Auch der Oligopeptid-Transporter *Imo0135-0137* trägt zur Proliferation in murinen Makrophagen und auch in Caco-2-Zellen bei (Chatterjee *et al.*, 2006; Schauer *et al.*, 2010). Das Oligopeptid-bindende Protein OppA, Teil des Oligopeptid-Permease-Operons *opp*, ist ebenfalls für das intrazelluläre Überleben von *L. monocytogenes* wichtig, eine *oppA*-Mutante war beim Wachstum in Makrophagen und im Mausmodell signifikant beeinträchtigt (Borezee *et al.*, 2000). Diese Ergebnisse stärken die Annahme, dass *L. monocytogenes* bei der intrazellulären Versorgung mit Nährstoffen auch Oligopeptide für die Versorgung mit AS und damit auch als N-Quelle verwendet.

Dass AS generell für eine effiziente Proliferation wichtig zu sein scheinen, konnte in einer Pilotstudie gezeigt werden, in der ¹³C in den Stoffwechsel von Makrophagen eingeführt wurde. Hier stellte sich heraus, dass bis zu 50 % der AS Alanin (Ala), Asp und Glu von der Wirtszelle stammten und außerdem nur die Hälfte der untersuchten AS *de novo* synthetisiert wurden (Eylert *et al.*, 2008). Auch bei weiterführenden Studien dieser Art bauten Listerien die vom Wirt aufgenommenen AS eher direkt in Proteine ein, als sie abzubauen, möglicherweise aufgrund eines Mangels an katabolischen Intermediaten und Cofaktoren, wie Pyruvat oder Succinyl-CoA, die für den Aufbau der AS essentiell sind. Die *de novo*-Synthese bestimmter AS, insbesondere der BCAAs, ist jedoch trotz allem essentiell für die intrazelluläre Replikation (Grubmüller *et al.*, 2014). Stämme, die auxotroph waren für die aromatischen AS Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp) und Tyrosin (Tyr) waren weniger virulent im Mausmodell als der Wildtyp (Marquis *et al.*, 1993), was die Notwendigkeit dieser Biosynthesen unterstreicht. Auch konnten bei der Untersuchung von *L. monocytogenes* Insertions-Mutanten, welche in Epithelzellen eine Attenuierung zeigten, zahlreiche Gene identifiziert werden, die am AS-Metabolismus beteiligt sind (Schauer *et al.*, 2010).

Im Vergleich zum nicht-pathogenen Stamm *L. innocua* besitzt *L. monocytogenes* eine größere Anzahl an stoffwechselrelevanten Genen, wobei die Gene für den C- und N-Metabolismus und für Transportproteine rund 17 % des gesamten Genoms ausmachen (Glaser *et al.*, 2001). Zusammenfassend lässt sich somit abermals betonen, dass der bakterielle Stoffwechsel und dessen Anpassung an die veränderte Umgebung beim Eintritt in einen Wirt und der Besiedelung verschiedener Nischen für die Pathogenität und Virulenz von zentraler Bedeutung sind. Eine schematische Übersicht des listeriellen N-Metabolismus mit den zugehörigen AS-Synthesewegen sowie Transportern für relevante N- und C-Substrate ist in Abbildung 6 dargestellt.

1.3 Isotopologue Profiling

Die Untersuchung von biosynthetischen Stoffwechselwegen und Stoffflüssen unter *in vivo*-Bedingungen ist von essentieller Bedeutung, um den Metabolismus und die Physiologie von Mikroorganismen verstehen zu können. Viele wichtige Eigenschaften können aus Genomsequenzen, RNS-Transkripten, Protein- und Metabolit-Profilen und der Modellierung der daraus gewonnenen Daten abgeleitet werden. Eine direkte Beobachtung der Stoffwechselwege von *L. monocytogenes* während des Wachstums in eukaryotischen Zellen scheiterte jedoch bisher am Mangel an adäquater Methodik (Fuchs *et al.*, 2012b).

Ein neuerer Ansatz für die quantitative Analyse von metabolischen Flüssen, die durch biologische Systeme fließen, ist das sogenannte *Isotopologue Profiling*. Die Methode basiert auf der Verwendung von Isotopen, Atomen, die eine andere Masse aufweisen als die normalerweise natürlich auf der Erde vorkommende. Kohlenstoff existiert beispielsweise hauptsächlich als ^{12}C (98,9 %), wohingegen das schwerere Isotop ^{13}C nur zu 1,1 % vorkommt. Stickstoff existiert zu 99,6 % als ^{14}N , der natürliche Anteil an ^{15}N liegt jedoch unter einem Prozent (Meija *et al.*, 2016). Der Massenunterschied solcher Moleküle, die ein schwereres Atom enthalten, ist mit Hilfe von Massenspektrometrie messbar (Lee und Lee, 1998). Durch die Zugabe solcher ganz oder teilweise „markierter“ Substrate zu einem Kulturmedium werden diese während des Wachstums von den Bakterien aufgenommen und verstoffwechselt. Die Isotopologen, diejenigen Moleküle, die markierte Atome enthalten, durchlaufen eine Vielzahl enzymatisch katalysierter Reaktionen, werden entweder direkt in andere Verbindungen eingebaut oder degradiert und zur Neusynthese von Zellbestandteilen verwendet. Dabei verteilen sie sich im gesamten Stoffwechselnetzwerk und bilden somit einen hochkomplexen Metabolitfluss, was zur Folge hat, dass mit dieser Methode ein breites Spektrum an biosynthetischen Stoffwechselwegen abgedeckt, untersucht und letztendlich rekonstruiert werden kann (Eisenreich und Eylert, 2010; Eisenreich *et al.*, 2016).

Um das metabolische Schicksal eines markierten Substrates zu verfolgen, werden die bakteriellen Proteine isoliert und durch saure Hydrolyse zu AS aufgeschlossen (Eisenreich *et al.*, 2006). Für die Analyse der Isotopenverteilung in den Proteinen werden die Magnetresonanzspektroskopie (NMR) und die mit der Gaschromatografie gekoppelte

Massenspektrometrie (GC-MS) eingesetzt. MS ist ein gut etabliertes Werkzeug zur Bestimmung der Isotopologen-Muster in AS und weist eine hohe Sensitivität auf (Zamboni und Sauer, 2009). Bereits bei geringen Probenmengen von 10^8 Bakterienzellen oder 1 mg trockenem Zellpellet können Signale mit einem hohen Signal-Stör-Verhältnis bei der Messung von proteingebundenen AS gewonnen werden (Eisenreich *et al.*, 2010). Diese Mengen können bei *in vitro*- oder Zellkulturerperimenten leicht erzielt werden, *in vivo* stößt die Methode allerdings an ihre Auflösungsgrenzen und konnte daher bislang nicht bei Infektionen von Mäusen angewandt werden.

Die aus der Proteinhydrolyse gewonnenen AS werden in Tert-Butyldimethylsilyl-Derivate (TBDMS) konvertiert und durch MS anhand ihrer Masse aufgetrennt. Auf Basis der entstehenden Massenmuster kann für ungefähr 50 Massenfragmente aus 15 TBDMS-AS bestimmt werden, welche markierten Atome diese enthalten (Fuchs *et al.*, 2012b). Von diesen Analyten lassen sich bei 29 Fragmenten von 12 TBDMS-AS (Gly, Glycin; Ala; Ser, Serin; Asp; Thr, Threonin; Glu; Val; Leu; Ile; Met; Tyr; Phe, Phenylalanin) die Isotopenzusammensetzungen zuverlässig quantifizieren (Antoniewicz *et al.*, 2007). Durch unterschiedliche Markierungsstrategien, die zu spezifischen Profilen in diesen Fragmenten führen, können in solchen Studien bestimmte Biosynthesewege identifiziert werden. Für zuverlässige und vollständige Daten sollte die Anreicherung mit dem markierten Substrat bei 0,2 % oder höher liegen (Fuchs *et al.*, 2012b).

Die genaue Position der markierten Isotope im Molekül kann mit GC-MS nur beschränkt untersucht werden. Besser geeignet dafür ist die NMR-Spektroskopie, da hier über spezifische Frequenzsignale in einem Magnetfeld diejenigen Positionen innerhalb einer AS, die von markierten C-Atomen besetzt werden, genau erfasst werden können. Für die Messung wird aufgrund der geringen Sensitivität (Eisenreich und Bacher, 2007) jedoch viel mehr Probenmaterial benötigt, nämlich mindestens 10^{12} Bakterienzellen oder 10 mg trockenes Zellpellet.

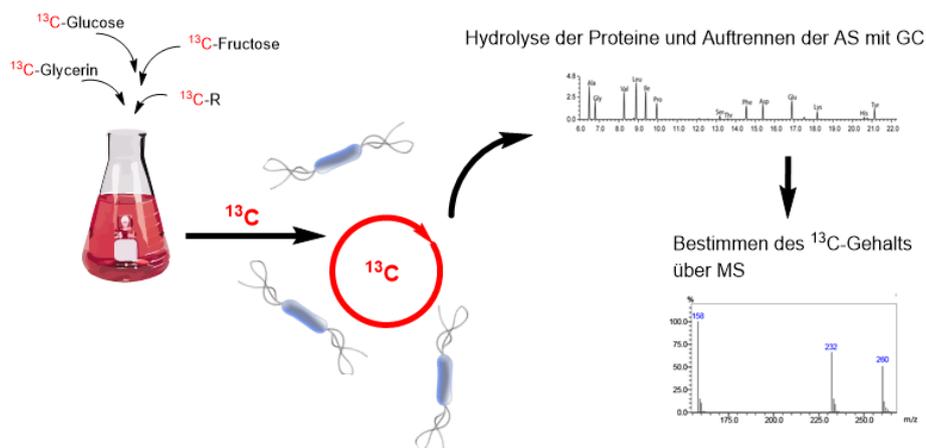


Abbildung 7: Übersicht über die Isotopologue Profiling Analyse.

Die Bakterien werden in einem Medium angezogen, dem markierte Substanzen zugesetzt wurden. Während der Proliferation werden die markierten Atome aufgenommen und verstoffwechselt. Nach Hydrolyse der bakteriellen Proteine werden die AS mit Gaschromatographie (GC) aufgetrennt und der ^{13}C -Gehalt massenspektrometrisch (MS) bestimmt. Abkürzung: R, Rest (modifiziert nach Eisenreich *et al.*, 2016).

Isotopologue Profiling stellt eine Schlüsseltechnologie dar, um Stoffflüsse in Bakterien zu definieren und metabolische Netzwerke zu entschlüsseln. Die Methode, welche in Abbildung 7 dargestellt ist, wurde an *L. monocytogenes* eingeführt und wird mittlerweile bereits bei verschiedenen anderen Bakterien wie Salmonellen, Staphylokokken, Streptokokken, Yersinien, Pseudomonaden, Legionellen und Chlamydien, sowie Pflanzen und Tieren erfolgreich zur Aufklärung und Belegung metabolischer Gegebenheiten angewandt (Eisenreich *et al.*, 2010; Eisenreich und Eylert, 2010). Bei *L. monocytogenes* wurde beispielsweise gezeigt, dass Kohlenstoff aus der Glucose für den Aufbau von AS verwendet wird, und dass das Fehlen einer α -Ketoglutarat-Dehydrogenase im dadurch unvollständigen Citratzyklus zur Folge hat, dass das Intermediat Oxalacetat durch Carboxylierung von Pyruvat gebildet wird (Eisenreich *et al.*, 2006). Beim Wachstum von *L. monocytogenes* in Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die Bakterien verschiedene C-Substrate aus dem Cytosol der Wirtszelle nutzen. 50–100 % der AS wurden dabei vom Wirt bezogen, und auch C₃-Körper wie Glycerin dienten als C-Quellen (Eylert *et al.*, 2008).

Isotopologue Profiling wurde bisher nur für die Untersuchung des C-Metabolismus unter Verwendung von ¹³C eingesetzt. Ähnliche Experimente zur Untersuchung des N-Stoffwechsels mit markiertem Stickstoff wurden bislang nicht durchgeführt.

1.4 *Caenorhabditis elegans* als Modellorganismus

Caenorhabditis elegans ist ein freilebender, nicht parasitischer Fadenwurm aus der Familie der Rhabditidae. Er kommt ubiquitär in der Erde vor und durchläuft während seiner Entwicklung zum adulten Wurm nach der Embryonalphase im Ei vier Larvenstadien (L1–L4), was ca. 3 Tage dauert (Altun und Hall, 2009). Dabei erreicht er eine Größe von ungefähr 1 mm. Die meisten dieser Würmer sind Hermaphroditen, jedoch gibt es auch männliche Exemplare, die jedoch selten vorkommen und an der geringeren Größe sowie dem typischen, gefächerten Schwanz zu erkennen sind (Abbildung 8). *C. elegans* ist einfach zu kultivieren, hat eine kurze Generationszeit von zwei bis vier Tagen und eine definierte Anzahl von 959 Zellen (Conradt und Xue, 2005; Corsi *et al.*, 2015). Aufgrund dieser Eigenschaften etablierte der Nobelpreisträger Sydney Brenner *C. elegans* in den siebziger Jahren als Modellorganismus für die Entwicklungsbiologie für seine genetischen und neuronalen Studien (Brenner, 1974). Seitdem ist die Zahl der Forschungslabore, die an oder mit diesem Wurm arbeiten, auf über 1000 gestiegen und jährlich werden auf Forschungsgebieten wie der Genetik, der Entwicklungsbiologie, Neurologie oder Zellbiologie mehr als 1200 Artikel publiziert (Corsi *et al.*, 2015). Dabei werden die unterschiedlichsten Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Depression oder Diabetes untersucht (Hulme und Whitesides, 2011). Einige bahnbrechende wissenschaftliche Erkenntnisse auf dem Gebiet der Biologie und Medizin wurden durch Experimente in *C. elegans* gewonnen, diese betreffen die Krankheiten Alzheimer, Diabetes Typ 2 und Depression (Kaletta und Hengartner, 2006).

C. elegans kann mit vielen verschiedenen krankheitserregenden Organismen infiziert werden. Der Darm des Wurmes weist einige charakteristische Ähnlichkeiten mit humanen Darmzellen auf, weshalb er daher auch gerne für Studien zur Pathogen-Darm-Interaktion verwendet wird (McGhee, 2007). Durch seine Transparenz eignet er sich außerdem unter Einsatz von *in vivo*-Fluoreszenzmarkern gut für mikroskopische Studien, um beispielsweise das Wachstum von Axonen zu verfolgen, oder aber für Infektionsstudien unter Verwendung von mit grünem, fluoreszierenden Protein (GFP) markierten Bakterien. Auf diese Weise kann eine Infektion von Beginn an verfolgt und die Verteilung der Bakterien im Wurm beobachtet werden. *C. elegans* lässt sich weiterhin mit stabilen Isotopen, wie ^{15}N oder ^{13}C , für Metabolismus-Studien, wie *Isotopologue Profiling*, markieren (Gouw *et al.*, 2011; Kern *et al.*, 2016).



Abbildung 8: Adulte Nematoden vom wildtypischen Stamm *C. elegans* N2.

Links ist ein hermaphroditischer Wurm zu sehen, rechts ein männlicher Wurm. Die männlichen Exemplare kommen selten vor und sind an der geringeren Körpergröße sowie dem typischen, gefächerten Schwanz zu erkennen.

Der Wurm fand als Modellorganismus bereits in vielen Pathogenitätsstudien mit Bakterien Verwendung, wie beispielsweise mit *Salmonella enterica*, *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* und *Yersinia* spp. (Aballay *et al.*, 2000; Begun *et al.*, 2007; Darby *et al.*, 1999; Garsin *et al.*, 2001; Labrousse *et al.*, 2000; Maadani *et al.*, 2007; Spanier *et al.*, 2010; Styer *et al.*, 2005; Sifri *et al.*, 2005; Darby, 2005), von denen auch viele Krankheitserreger beim Menschen darstellen. *C. elegans* ernährt sich prinzipiell von Bakterien, wodurch er unter einfachen Bedingungen im Labor kultiviert werden kann, jedoch konnte in diversen dieser Arbeiten gezeigt werden, dass Pathogene dem mechanischen und humoralen Stress trotzen können, dem sie im Darm des Wurmes ausgesetzt sind. Infektionen mit entsprechenden Stämmen können somit durch Fütterung des Wurmes mit den jeweiligen Bakterien herbeigeführt werden. Bei Experimenten, in denen *C. elegans* mit dem grampositiven Bakterium *Enterococcus faecalis* infiziert wurde, konnte beispielsweise ein Faktor gefunden werden, dessen Deletion auch im Mausmodell zu einer Attenuierung bei der Virulenz führte. Hierbei handelt es sich um *fsrB*, welcher Teil eines Quorum-Sensing-Systems darstellt und somit für die chemische Kommunikation der Bakterienzellen untereinander wichtig ist (Garsin *et al.*, 2001). Als weiteres Beispiel konnten durch Untersuchung einer Transposonbank in *C. elegans* attenuierte Mutanten von *Pseudomonas aeruginosa* gefunden werden, welche Defekte in

regulatorischen Genen aufwiesen. Die Relevanz dieser Gene für eine Infektion bei höheren Organismen konnte später auch im Mausmodell bestätigt werden (Tan *et al.*, 1999).

C. elegans bietet somit als Modellorganismus für *in vivo*-Studien mit bestimmten Pathogenen eine einfache, kostengünstige und zeitsparende Alternative im Vergleich zur Verwendung von Zellkultur- oder Mausmodellen, kann jedoch nicht als völliger Ersatz dienen. Hierbei muss weiterhin betont werden, dass auf Seiten der Pathogene primär Virulenzfaktoren untersucht werden können, welche evolutionär konserviert sind, da diese oftmals auch bei unterschiedlichen Spezies einen ähnlichen Effekt verursachen (Garsin *et al.*, 2001). Bezogen auf den Wurm lassen sich wiederum hauptsächlich die Mechanismen der innate Immunantwort studieren, welche ebenfalls zu großen Teilen konserviert sind, und somit einem ähnlichen Ablauf unterliegen wie bei Säugetieren.

Unter den grampositiven Bakterien konnte die Pathogenität gegenüber *C. elegans* für einige Vertreter dieser Gruppe wie *E. faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* oder *Microbacterium nematophilum* bestätigt werden (Garsin *et al.*, 2001; Sifri *et al.*, 2003; Hodgkin *et al.*, 2000). Wenige Studien haben sich bisher mit der Interaktion von *C. elegans* und *Listeria* sp. beschäftigt. Die Ergebnisse sind ferner sehr kontrovers, unter anderem wurde von einer verkürzten Lebensspanne nach Fütterung mit *L. monocytogenes* berichtet (Thomsen *et al.*, 2006; Forrester *et al.*, 2007), andererseits von einem verlängerten Überleben der Würmer (Guha *et al.*, 2013). In der zuletzt genannten Studie wurde weiterhin spekuliert, dass *C. elegans* vermutlich einen Vektor für *L. monocytogenes* darstellt, welcher den Bakterien die Verbreitung in der Umwelt ermöglicht. Dies würde bedeuten, dass *L. monocytogenes* im Wurm überleben und sich dort eventuell sogar vermehren kann. Bei einer solchen Interaktion wäre *C. elegans* ein geeignetes Kolonisierungsmodell zur Untersuchung von Nährstoffflüssen im Darm, zwischen dem Wurm und *L. monocytogenes*. Da sich *C. elegans* außerdem mit stabilen Isotopen nahezu vollständig markieren lässt, könnte hier auch die Methode des *Isotopologue Profiling* (s. Abschnitt 1.3, 31), unter Verwendung von ^{15}N , für die Untersuchung von N-Flüssen, eingesetzt werden.

1.5 Ziel der Arbeit und angewandte Methodik

Teil 1: Untersuchung von N-Quellen von *L. monocytogenes*

Metabolismus-Studien bei Listerien, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, haben sich in der Vergangenheit hauptsächlich mit dem C-Metabolismus beschäftigt. Mit Hilfe von ^{13}C -*Isotopologue Profiling* und *L. monocytogenes* Stämmen, welche Mutationen in relevanten Genen tragen, konnte die Aufnahme und Metabolisierung von Stoffen aus dem Wirt bewiesen und bestimmte Biosynthesewege rekonstruiert werden (Eisenreich *et al.*, 2006; Eylert *et al.*, 2008; Eisenreich *et al.*, 2010). Über den N-Metabolismus von *L. monocytogenes* gibt es hingegen bisher nur wenige Daten, und *Isotopologue Profiling* mit markiertem Stickstoff, analog zu den ^{13}C -Experimenten, wurde ebenfalls noch nicht durchgeführt. Studien der letzten Jahre über den listeriellen N-Metabolismus beschäftigten sich *in vitro* hauptsächlich mit dessen Regulation

(Doroshchuk *et al.*, 2006; Groot Kormelink *et al.*, 2012), z.B. unter dem Einfluss verschiedener Temperaturen (Kaspar *et al.*, 2014), mit der Identifizierung verschiedener Gene, die im N-Metabolismus eine Rolle spielen und mit ihrer differentiellen Regulierung beim Wachstum in Medium im Vergleich zu anderen Wachstumsbedingungen wie eukaryotischen Zellen, Blut oder dem Darm von Mäusen (Joseph *et al.*, 2006; Toledo-Arana *et al.*, 2009). Bisher publizierte Daten über die Nutzung von N-Quellen stammen aus verschiedenen Studien zur Entwicklung von Wachstumsmedien (s. Abschnitt 1.2.3, S. 22). In diesen Studien lag der Fokus nicht auf der Identifizierung von N-Quellen, welche auch *in vivo* relevant sein könnten, ebenso wenig wurde ermittelt, in welchem Ausmaß Stickstoff aus diesen Quellen tatsächlich für den zentralen N-Bedarf von *L. monocytogenes* und den Aufbau von Aminosäuren eingesetzt wird.

Das Ziel dieser Arbeit war daher die Untersuchung des N-Metabolismus von *L. monocytogenes* zum einen unter *in vitro*-Bedingungen, beim Wachstum in einem Minimalmedium (Teil 1), und zum anderen unter *in vivo*-Bedingungen, bei der Replikation in *C. elegans* (Teil 2). Die *Isotopologue Profiling*-Methode sollte im ersten Teil dieser Arbeit zunächst für die Untersuchung des N-Metabolismus mit ^{15}N etabliert werden. Im Anschluss sollten verschiedene N-Quellen von *L. monocytogenes* identifiziert und deren Verwendung im Anabolismus von Proteinen bzw. AS quantifiziert werden. Dabei sollten außerdem auch Mutanten eingesetzt werden, die Defekte in am N-Stoffwechsel beteiligten Genen tragen, um mit diesen Ergebnissen genauere Erkenntnisse über den N-Metabolismus von *L. monocytogenes* gewinnen zu können. Dafür sollten folgende Versuchsbedingungen angewendet werden:

- Anzucht von *L. monocytogenes* in einem definierten MM, welches nach dem Rezept für MWB hergestellt wird (Premaratne *et al.*, 1991). In diesem Medium ist Glucose die C-Quelle. Des Weiteren enthält es Salze, verschiedene AS (unter anderem Gln und Arg), Eisen, Magnesium und essentielle Vitamine.
- Ersetzen der zu untersuchenden Substrate, falls im Medium vorhanden, mit der entsprechenden ^{15}N -markierten Substanz. Die Standardrezeptur wird dabei für die Versuche jeweils so modifiziert, dass die Zahl der potentiellen N-Quellen im Medium beschränkt ist. Für die Versuche mit ^{15}N -Ammonium, Ethanolamin und Glucosamin wird somit kein Gln zugesetzt.
- Aufgrund fehlender Daten Ermittlung der Wachstumsparameter bei der Verwendung von Ethanolamin und Glucosamin.
- Kultivierung der Bakterien unter Schütteln bei 37 °C bis zur logarithmischen Phase und anschließendes Abtöten mit Natriumazid (NaN_3).
- Waschen der Bakterienpellets mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), Autoklavieren und Lagerung bei -20 °C für das *Isotopologue Profiling*.

Die durch Erika Kutzner am Lehrstuhl für Biochemie (Garching) durchzuführende, biochemische Analytik sollte in folgenden Schritten erfolgen:

- Etablieren der Messparameter für die Messung von ^{15}N in den bakteriellen Proteinen.
- Saure Hydrolyse der Proben zur Gewinnung der bakteriellen AS.
- Auftrennen und Untersuchen der AS auf ihren ^{15}N -Gehalt mit GC-MS.

Auf diese Weise sollte herausgefunden werden, welche Substrate *L. monocytogenes* generell als N-Quellen verwendet, und in welchem Umfang der Stickstoff aus diesen Quellen für den Anabolismus von Proteinen bzw. AS genutzt wird. Zusätzlich sollten einzelne der identifizierten Substrate mit *L. monocytogenes* Stämmen getestet werden, die Mutationen in bestimmten, am N-Metabolismus beteiligten Genen tragen, um durch eine Veränderung der Isotopen-Zusammensetzung in den AS dieser Mutanten Rückschlüsse auf metabolische Wege ziehen zu können. Abbildung 7 zeigt eine Übersicht über den experimentellen Ansatz.

Teil 2: Untersuchung von Stoffflüssen zwischen *C. elegans* und *L. monocytogenes*

Bisherige Pathogenitätsstudien mit *C. elegans* liefern keine klaren Ergebnisse darüber, ob sich *L. monocytogenes* gegenüber dem Nematoden virulent verhält, oder ob diese beiden Organismen in einer symbiotischen Beziehung zueinander stehen (s. Abschnitt 1.4, S. 33). Die Methode des *Isotopologue Profiling* wurde in der Vergangenheit mit ^{13}C sowohl *in vitro*, beim Wachstum in Medium, als auch *in vivo*, beim Wachstum in Zellkultur eingesetzt. Für Studien zur Messung von Metabolitflüssen bei vielzelligen Organismen wie *C. elegans* wurde *Isotopologue Profiling* bislang jedoch nicht verwendet. Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte daher zunächst die Eignung von *C. elegans* als Kolonisierungsmodell für *L. monocytogenes* untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten Pathogenitätsstudien durchgeführt werden, um herauszufinden, in welchem Umfang *L. monocytogenes* die Lebensspanne des Wurmes beeinflusst und ob eine persistente Besiedelung des Nematodendarmes erreicht werden kann. Falls eine Besiedelung stattfindet, sollte die im ersten Teil der Arbeit etablierte Methode des ^{15}N -*Isotopologue Profiling* eingesetzt werden, um die N-Flüsse zwischen *C. elegans* als Wirt und *L. monocytogenes* als besiedelndes Bakterium untersuchen zu können, und Hinweise dafür zu finden, welche Stoffe dabei von *L. monocytogenes* aufgenommen werden. Aufgrund des Neuigkeitscharakters dieses experimentellen Ansatzes waren sämtliche Schritte ebenfalls erst zu entwickeln und zu etablieren. Dafür sollten folgende Versuchsbedingungen angewendet werden:

- Dokumentieren des Überlebens von *C. elegans* nach Fütterung mit *L. monocytogenes* im Vergleich zum Standard Futterstamm *E. coli* OP50.
- Untersuchung der auf diese Weise „infizierten“ Nematoden über einen Zeitraum von einer Woche auf eine persistente Besiedelung durch Kultivierung auf Selektivagar und Mikroskopierung.
- Bei gegebener Persistenz Entwicklung einer Methode zur Isolation der Listerien aus dem Nematodendarm, um eine anschließende Untersuchung der Bakterienproteine mit GC-MS zu ermöglichen.

- Markierung von *C. elegans* mit ^{15}N und Charakterisierung.
- Untersuchung der Stoffflüsse mit *Isotopologue Profiling* in zwei verschiedenen Versuchsaufbauten, wobei einmal *C. elegans* und einmal der Futterstamm *E. coli* OP50 vorab mit ^{15}N markiert werden, um herauszufinden, aus welchen Quellen Listerien im Nematodendarm ihre N-Zufuhr beziehen.

Die durch Erika Kutzner am Lehrstuhl für Biochemie (Garching) durchzuführende, biochemische Analytik sollte in folgenden Schritten erfolgen:

- Saure Hydrolyse der Proben zur Gewinnung der bakteriellen AS.
- Auftrennen und Untersuchen der AS auf ihren ^{15}N -Gehalt mit GC-MS.

Eine detaillierte Beschreibung der in dieser Arbeit etablierten und verwendeten Methoden ist in Kutzner *et al.* (2016) und Kern *et al.* (2016) enthalten und weiterhin auch in Teilen in der Ergebnisdiskussion aufgeführt.

2. Ergebnisse und Diskussion

2.1 Identifizierung von N-Quellen von *L. monocytogenes* (Teil 1)

2.1.1 Entwicklung von ¹⁵N-Isotopologue Profiling

Die *Isotopologue Profiling*-Methode wurde bereits erfolgreich für die Untersuchung des C-Stoffwechsels bei *L. monocytogenes* eingesetzt. Hierbei konnte mit Hilfe von ¹³C-markierten Substanzen der C-Metabolismus *in vitro* oder unter *in vivo*-Bedingungen, beim Wachstum in eukaryotischen Zellen, weiter charakterisiert werden (Eisenreich *et al.*, 2006; Eylert *et al.*, 2008; Grubmüller *et al.*, 2014; Joseph *et al.*, 2008; Eisenreich *et al.*, 2010). Für den N-Metabolismus wurde diese Methode bisher nicht verwendet, weswegen zunächst ein Protokoll etabliert werden musste, welches *Isotopologue Profiling* für den Einsatz von ¹⁵N nutzbar macht. Hierfür wurde *L. monocytogenes* in Standard-MM angezogen. Aus den Bakterienpellets wurden die einzelnen AS mittels saurer Hydrolyse gewonnen. Trp, Met und Cys werden unter diesen Bedingungen abgebaut, weswegen deren Detektion mit dieser Methode nicht möglich ist. Asparagin (Asn) und Gln werden zu Asp und Glu hydrolysiert, die ¹⁵N-Werte für Asp und Glu beinhalten somit auch diese für Asn bzw. Gln. Alle sonstigen, messbaren AS konnten bei der GC-MS-Analyse klar voneinander differenziert werden (Tab. S3 in Kutzner *et al.*, 2016).

Im nächsten Schritt wurden zur Etablierung der ¹⁵N-Detektion eine Standardlösung von [U-¹⁵N₄]Arg sowie ein ¹⁵N-Algal-Aminosäuremix gemessen. Hierbei konnten solide Daten darüber generiert werden, welche AS generell ¹⁵N enthalten und, im Falle der AS mit mehr als einem N-Atom (Lys; Histidin, His; Arg), wie viele dieser N-Atome markiert sind (Tab. S2 und S4 in Kutzner *et al.*, 2016). Durch die Analyse solcher Fragmente können Rückschlüsse auf den Metabolismus der AS gezogen werden, da die Anzahl der markierten Atome im Molekül in direktem Zusammenhang mit den zugrundeliegenden, enzymatischen Reaktionen steht. AS enthalten in ihrem Grundgerüst ein N-Atom in der Aminogruppe. Je nach Beschaffenheit der Seitenkette kommen null bis vier weitere N-Atome hinzu. Beim Ionisierungsprozess von His (3 x N) und Arg (4 x N) entstehen Fragmente, die nur aus der Imidazol- oder Guanidin-Seitenkette bestehen, sodass bei diesen AS die Lage des markierten N-Atoms bestimmt werden kann, ob dieses sich also im Grundgerüst, in der Seitenkette oder neben dem α -C-Atom befindet. Bei Lys (2 x N) entsteht nur ein Fragment, somit können mit GC-MS bei dieser AS keine genaueren Aussagen über die Lage des markierten Stickstoffs getroffen werden. Der Großteil aller AS enthält jedoch nur ein N-Atom.

Im Gegensatz dazu befinden sich im Grundgerüst jeder AS zwei C-Atome sowie weitere in den Seitenketten, sodass jede AS insgesamt zwei (Gly) bis elf (Trp) C-Atome besitzt. Bei ¹³C-Experimenten spielt die Positionsauflösung der markierten Elemente somit eine größere Rolle und die Möglichkeiten, über diese Informationen bestimmte Synthesewege zu rekonstruieren, sind daher bei der Untersuchung des C-Metabolismus weitaus umfangreicher. In dieser Arbeit sollte belegt werden, aus welchen Quellen und in welchem Umfang *L. monocytogenes* Stickstoff

für den Anabolismus von AS zur Bildung von Proteinen verwendet. Die Methode, unter Nutzung von stabilen N-Isotopen und Messung über GC-MS, lieferte hierfür ausreichende Daten, um diverse Substrate zu identifizieren und deren Nutzung charakterisieren zu können, und ist in der folgenden Abbildung 9 dargestellt:

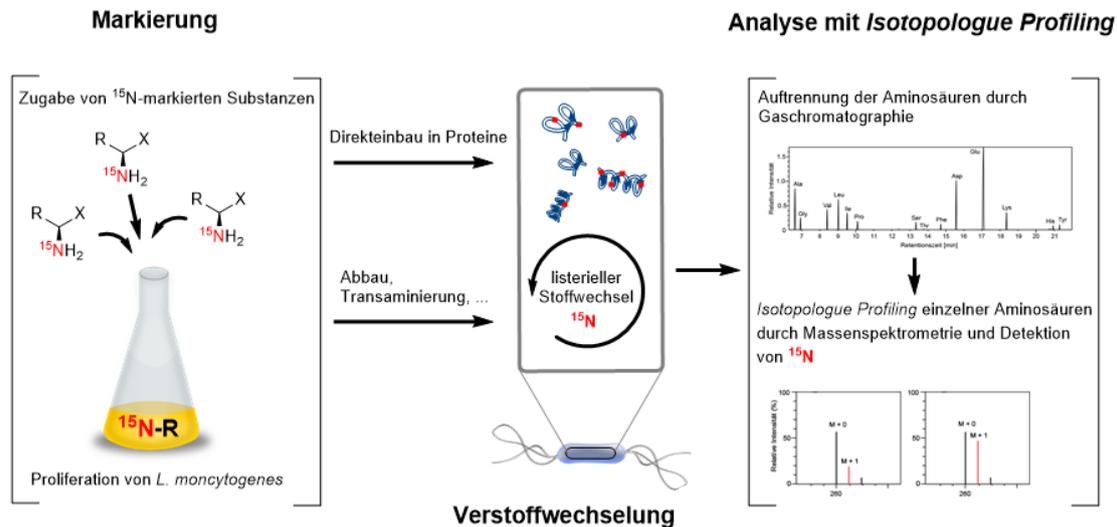


Abbildung 9: ^{15}N -Isotopologie Profiling.

L. monocytogenes proliferiert in einem MM, dem mit ^{15}N -markierte Substanzen als potentielle N-Quellen zugesetzt werden. Diese werden dabei entweder direkt in Proteine eingebaut oder aber degradiert und für den Anabolismus anderer N-haltiger Komponenten verwendet. Die listeriellen Proteine werden im Anschluss hydrolysiert. Die Auftrennung der TBDMS-AS zur Detektion von ^{15}N -Mustern in AS erfolgt über Gaschromatografie und Massenspektrometrie (GC-MS). Die Massenverhältnisse werden durch ^{15}N verändert (modifiziert nach Eisenreich *et al.*, 2010).

2.1.2 *L. monocytogenes* nimmt AS auf und bevorzugt den Direkteinbau in Proteine

Zur Charakterisierung einzelner Substrate, die für ein Wachstum bei Bakterien essentiell sind oder wachstumsfördernd wirken, bieten sich definierte Nährmedien an. Ein solches MM wurde auch für die Identifizierung von N-Quellen, die *L. monocytogenes* aufnimmt, verstoffwechselt und für den Aufbau von AS nutzt, eingesetzt. Dabei wurden die Bakterien zunächst in einem Medium angezogen, in dem anstelle der AS ein vollmarkierter ^{15}N -Algal-Aminosäuremix zugegeben wurde. Dieser Mix, welcher auch zur Etablierung der Messparameter verwendet wurde (s. Abschnitt 2.1.1, S. 39), enthält kein Cys, Asn, Trp und Gln, weshalb zusätzlich unmarkiertes, für Listerien essentielles Cys zugegeben wurde. *L. monocytogenes* zeigte wildtypisches Wachstum, Asn, Trp und Gln können unter diesen Bedingungen also selbst synthetisiert werden. Bei allen AS, deren ^{15}N -Gehalt quantifiziert wurde, war eine hohe Gesamtanreicherung messbar, welche für His (87%) und Arg (87%) am höchsten, und für Asp (67%) und Thr (67%) am niedrigsten war (Abb. 1A, Kutzner *et al.*, 2016).

Diese hohen Einbauraten zeigen, dass sämtliche AS durch die Listerien effektiv aufgenommen und höchstwahrscheinlich zu einem großen Teil direkt für den Proteinaufbau eingesetzt wurden.

Da bis auf Cys sämtliche AS im Medium markiert waren, kann mit dieser Methode nicht genau festgestellt werden, inwiefern einzelne AS abgebaut wurden, um deren Stickstoff für den Anabolismus anderer AS zu nutzen. Bei gleichzeitiger Verwendung von markierten und unmarkierten N-Atomen in den Ausgangssubstraten würde dies zu gemischten Isotopologengmustern in AS mit mehr als einem N-Atom (Lys, His, Arg) führen. Viele AS stellen nicht nur gute N-Quellen dar, sondern dienen außerdem auch als C- und Energielieferanten. Durch direkten Einbau von AS anstatt ihrer Synthese kann eine schnellere Proliferation unter weniger Energieaufwand stattfinden (Marin und Krämer, 2009), was auch hier den unmittelbaren Einbau aufgrund des reichhaltigen AS-Angebotes erklärt. Eine gute Ausstattung mit verschiedenen Transportern ist weiterhin wohl auch unter *in vivo*-Bedingungen, bei der Proliferation im Darm oder in Epithelzellen, und der damit einhergehenden Veränderung des Nährstoffangebots, von großer Bedeutung (Borezee *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2012b). *L. monocytogenes* besitzt dafür ein großes Repertoire an AS- und Oligopeptid-Aufnahmesystemen. Tab. S1 aus Kutzner *et al.* (2016) zeigt hierzu eine Übersicht der bisher bekannten Transporter des listeriellen N-Metabolismus. Viele dieser Transporter sind beim Wachstum in verschiedenen Umgebungen wie BHI, Blut oder dem Darm differentiell reguliert, was die bakterielle Anpassung an solch unterschiedliche Milieus ermöglicht (Toledo-Arana *et al.*, 2009).

Gln, welches nicht im ¹⁵N-AS-Mix enthalten war und für viele Bakterien eine optimale N-Quelle darstellt (Hu *et al.*, 1999; Débarbouillé und Fisher, 2002), scheint unter dem Überangebot der enthaltenen AS für ein normales Wachstum nicht notwendig zu sein. Gln kann über die Glutamat-Ammonium-Ligase (GS) aus NH₄⁺ und Glu gebildet werden (s. Abbildung 5). Neben Glu kommt Gln eine zentrale Rolle im N-Stoffwechsel zu, da diese beiden AS als Aminogruppen-Donoren für den Aufbau anderer AS und für Nucleotide fungieren. Die maximalen ¹⁵N-Einbauraten von nur 88 % in den listeriellen AS deuten darauf hin, dass die fehlenden 12 % aus einer weiteren, unmarkierten N-Quelle stammten. Die im Medium befindlichen Vitamine Riboflavin, Thiamin und Biotin können als zusätzliche N-Donoren ausgeschlossen werden, da deren Konzentration für Markierungswerte in dieser Höhe zu gering ist. Das essentielle, unmarkiert hinzugefügte Cys konnte durch weiterführende Versuche ebenfalls ausgeschlossen werden, da Cys kaum für die *de novo*-Biosynthese der AS verwendet wurde (s. Abschnitt 2.1.7, S. 49). Da die Messungen des AS-Mixes bei der Etablierung der Methode die vom Hersteller angegebenen durchschnittlichen Markierungsraten von 98% in den einzelnen AS bestätigten (Tab. S4 in Kutzner *et al.*, 2016), muss angenommen werden, dass der AS-Mix mit weiteren, unmarkierten N-Quellen kontaminiert war.

2.1.3 Ammonium und Glutamin sind Haupt-N-Quellen für die AS-Synthese

Da die gleichzeitige Verwendung verschiedener, markierter AS keine detaillierteren Einblicke in die Metabolisierung einzelner AS erlaubt, wurde eine Reihe dieser Substrate in Bezug auf ihre Bedeutung als N-Quelle separat getestet und *L. monocytogenes* in markierter Form während der

Proliferation in MM zugeführt. Gln und NH_4Cl konnten dabei als wichtige N-Quellen identifiziert werden, wobei der von diesen Quellen stammende Stickstoff Einbauraten von bis zu 46 % ($[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$) bzw. 47 % ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) in allen messbaren AS zeigte (Abbildung 10 und Abb. 2A in Kutzner *et al.*, 2016).

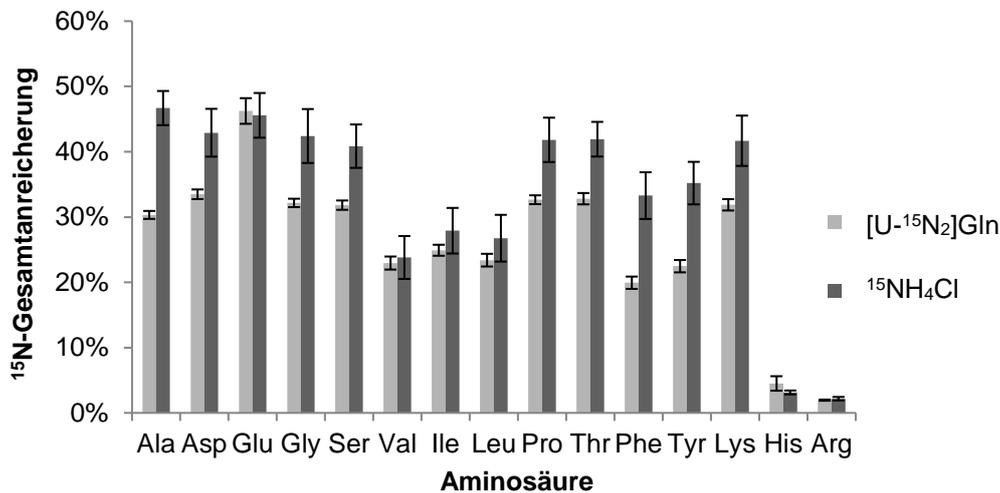


Abbildung 10: ^{15}N -Einbauraten in listeriellen AS beim Wachstum in MM mit $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ oder $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in Gegenwart von Arg.

Die hohen Einbauraten von bis zu 46 % ($[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$) bzw. 47 % ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) in allen messbaren listeriellen AS zeigen, dass Gln und Ammonium wichtige N-Quellen darstellen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Waren beide Substrate im Medium vorhanden, wurde aus NH_4Cl stammender Stickstoff bevorzugt verwendet (Abb. 2B in Kutzner *et al.*, 2016). His wurde in allen Experimenten hauptsächlich aus dem Medium aufgenommen und nur in sehr geringen Raten von maximal 5 % selbst synthetisiert. Die maximalen ^{15}N -Einbauraten von unter 50 % deuten darauf hin, dass neben Gln oder NH_4Cl auch andere im MM vorhandene, unmarkierte Substrate für den Aufbau von AS verwendet werden.

In beiden Experimenten zeigten die Markierungsmuster der BCAAs Val, Leu und Ile, dass diese trotz ihrer Anwesenheit im MM auch in Raten von 23–25 % (Gln) bzw. 24–28 % (NH_4Cl) *de novo* synthetisiert wurden, und zwar unter Nutzung der von Gln oder NH_4Cl stammenden Aminogruppen. Arg und His, welche beide im Medium vorhanden waren, wurden hingegen nur in geringen Mengen von unter 5 % von den Listerien selbst aufgebaut. Dass manche Substrate trotz ihres Vorhandenseins im Medium zusätzlich noch zu einem Teil von den Bakterien selbst hergestellt werden unterstreicht abermals die enorme Komplexität, mit der *L. monocytogenes* seinen N-Metabolismus zu regulieren scheint. Bei 76 % (Gln) bzw. 70 % (NH_4Cl) der markierten Lys-Moleküle war nur eines der beiden N-Atome ($M + 1$) markiert (Abb. S2A in Kutzner *et al.*, 2016). Der Einbau nur eines markierten N-Atoms aus Gln oder NH_4Cl statt zwei N-Atomen ist deshalb wahrscheinlicher, da bei der Biosynthese von Lys zwei Enzyme benötigt werden, nämlich

die Aspartat-Transaminase (*Imo1897*), für die Konvertierung des Vorläufers Oxalacetat zu Asp, und eine zweite Aminotransferase (*Imo1006*), zur Aminierung von dessen Seitenkette (Abbildung 6). Welches dieser beiden N-Atome markiert war, konnte mit GC-MS nicht ermittelt werden. Die beiden anderen AS mit mehr als einem N-Atom, His und Arg, waren hauptsächlich M + 1 markiert in der am α -C-Atom befindlichen Aminogruppe, ohne Veränderung der Imidazol- oder Guanidin-Seitenketten. Diese Markierungsmuster der AS könnten somit auf eine komplexere Synthese aus verschiedenen Vorgängermolekülen hindeuten, jedoch lassen sich aufgrund der geringen Einbauraten keine weiteren soliden Erkenntnisse aus den Markierungsmustern dieser beiden AS gewinnen.

Beim Wachstum mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ war die Gesamtanreicherung der einzelnen AS mit ^{15}N höher als beim Wachstum mit $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ (Abb. 2A in Kutzner *et al.*, 2016). Die gleichzeitige Zugabe beider Substrate in äquimolaren Konzentrationen konnte dieses Ergebnis weiter bestätigen. ^{15}N aus $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ zeigte 1,2-fach (Glu) bis 2,1-fach (Ala) höhere Einbauraten in den messbaren AS als ^{15}N aus $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ (Abb. 2B in Kutzner *et al.*, 2016). Die Markierungsmuster von Lys zeigten beim Wachstum mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ 1,6-fach mehr (M + 2)-Moleküle verglichen mit dem korrespondierenden Experiment, bei dem $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ eingesetzt wurde (24 % gegenüber 15 %), *L. monocytogenes* scheint daher unter *in vitro*-Bedingungen exogenes NH_4Cl exogenem Gln vorzuziehen, und Stickstoff aus NH_4Cl effizienter in AS einzubauen. Dies steht im Gegensatz zum Wachstum bei *B. subtilis*, bei dem Gln die ideale N-Quelle darstellt (Hu *et al.*, 1999) und konnte auch speziell bei niedrigeren Wachstumstemperaturen von 24 °C nachgewiesen werden. Eine mögliche Theorie hierfür wurde so formuliert, dass der Mehrverbrauch von α -Ketoglutarat für den Aufbau von Glu beim Wachstum mit Ammonium im Vergleich zu dem mit Gln den Fluss im oxidativen Zweig des Citratzyklus verstärkt und somit zu besseren Proliferationsbedingungen führt, wofür auch die leicht erhöhte Transkription von Genen des Citratzyklus, wie *Imo1566* (Isocitrat-Dehydrogenase) und *Imo1641* (Aconitase), beim Wachstum mit Ammonium sprechen würde (Kaspar *et al.*, 2014).

NH_4Cl wird über den Transporter NrgA (*Imo1516*) in die Bakterienzelle geschleust. Dieser wird bei N-Mangel vom Transkriptionsregulator TnrA aktiviert. Bei der Vermehrung im Cytosol sind die Gene für den Transport und auch für die Nutzung von NH_4Cl hochreguliert. Dies steht im Widerspruch zu der Annahme, dass intrazellulär wenig freies NH_4Cl verfügbar sein kann, da es in großen Mengen toxisch ist (Joseph *et al.*, 2006). Trotzdem wird vermutet, dass NH_4Cl während der listeriellen Replikation innerhalb von Zellen eine wichtige N-Quelle darstellt. Dies könnte auch auf andere (v. a. enterische) Bakterien zutreffen, da mit NH_4Cl die schnellsten Wachstumsraten erreicht werden können und die Nutzung weiterer N-Quellen in Anwesenheit von NH_4Cl unterbunden wird (Fisher, 1999; Reitzer, 1996). Solch eine Inhibierung könnte auch mit einer Rolle spielen, warum *L. monocytogenes* bei gleichzeitiger Anwesenheit von Gln und NH_4Cl letzteres effizienter verwertet und weniger Stickstoff aus Gln in die AS einbaut, als beim Wachstum mit nur dieser Quelle. Enterische Bakterien weisen unter Verwendung von NH_4Cl die geringsten Mengen an GS auf, welche bei der Assimilierung von NH_4Cl über GS/GOGAT eine wichtige Rolle spielt. Die Bildung von Gln über GS aus NH_4Cl und Glu, welches als N-Donor für die Biosynthese von

ungefähr 85 % der N-haltigen Zellkomponenten dient, ist jedoch der einzige Weg zur Biosynthese von Gln (Abbildung 5). Dieser AS kommt eine zentrale Rolle zu, da sie sowohl als Baustein für Proteine als auch als N-Quelle für die Synthese von ungefähr 15 % der N-haltigen Moleküle in der Zelle verwendet wird (Fisher, 1999).

Bei His waren auch bei gleichzeitigem Vorhandensein von Gln und NH_4Cl , ähnlich zu den Einzelexperimenten, nur sehr geringe ^{15}N -Einbauraten von 3 % (Gln) und 5 % (NH_4Cl) messbar, was zeigt, dass His hauptsächlich aus dem Medium aufgenommen wird, obwohl *L. monocytogenes* auch alle notwendigen Gene für die Biosynthese dieser AS aus Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) besitzt (Glaser *et al.*, 2001).

2.1.4 Arginin wird direkt eingebaut und nicht für den AS-Aufbau verwendet

Arg wurde unter Verwendung von 23 % ($[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$) bzw. 37 % ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$) ^{15}N aus diesen Quellen *de novo* synthetisiert, wenn es nicht im Medium vorhanden war (Abb. 2B in Kutzner *et al.*, 2016). Diese Werte sind vergleichbar mit denen aller anderen AS, die in diesen Experimenten gemessen wurden. Bei Anwesenheit von Arg konnten nur geringe Mengen (2–3 %) an ^{15}N aus $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ darin gemessen werden, was auf eine geringe Neusynthese hindeutet (Abb. 2A in Kutzner *et al.*, 2016). Alle anderen messbaren AS wurden, wenn sie im Medium vorhanden waren, in sämtlichen durchgeführten Wachstumsversuchen auch zu größeren Teilen *de novo* synthetisiert. *L. monocytogenes* zieht es somit vor, die AS Arg aufzunehmen und direkt in Proteine einzubauen, ohne den Vorrat durch selbst synthetisiertes Arg weiter aufzufüllen.

Die Verwendung von Stickstoff aus Arg für den Anabolismus anderer AS wurde mit Hilfe von $[\text{U}-^{15}\text{N}_4]\text{Arg}$ untersucht. Beim Wachstum mit diesem Substrat konnte gezeigt werden, dass es sehr effizient aufgenommen wurde, was zu Markierungswerten von 80 % führte, jedoch wurde es nicht degradiert und für den Aufbau anderer AS verwendet, da in diesen kaum ^{15}N gemessen werden konnte (Abbildung 11). Der dafür benötigte Stickstoff wurde somit von Gln, welches in geringer Menge von 0,5 mM zugegeben wurde, um generell listerielles Wachstum zu ermöglichen, und den anderen in dieser Arbeit ermittelten N-Quellen bezogen. Die Tatsache, dass *L. monocytogenes* ohne Zugabe von Gln oder Ammonium in diesem Medium nicht wachsen kann, war bereits ein erster Hinweis darauf, dass Arg hier keine ausreichende N-Quelle darstellt. Die Arg-Isotopenmuster hingen stark von der An- oder Abwesenheit dieser AS im Medium ab. 56 % der Arg-Moleküle waren beim Wachstum mit $[\text{U}-^{15}\text{N}_4]\text{Arg}$ vollständig an allen vier N-Atomen ($M + 4$) markiert, was den direkten Einbau von Arg in die bakteriellen Proteine bestätigt. Bei 43 % der Arg-Moleküle waren nur drei der N-Atome markiert ($M + 3$), somit muss das α - ^{15}N -Atom durch ^{14}N aus einer anderen Quelle ersetzt worden sein, da die Seitenkette vollständig markiert war (Abb. S2 in Kutzner *et al.*, 2016). Dies deutet abermals darauf hin, dass kaum *de novo*-Biosynthese von Arg stattfindet, wenn diese AS auch im Medium vorhanden ist, was theoretisch durch Repression der anabolen Arg-Gene durch Anwesenheit dieser AS verursacht werden könnte (Ryan *et al.*, 2009). Der Austausch des α -N-Atoms konnte auch in den Experimenten mit $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ beobachtet werden, bei denen Arg im Medium zugegeben wurde (Abb.

S2A in Kutzner *et al.*, 2016). Markiertes Arg lag in diesen beiden Experimenten nur in geringen Mengen von 2 % vor. Dabei handelte es sich hauptsächlich um (M + 1)-Isotopomere, was zeigt, dass der Austausch des N-Atoms trotz der Anwesenheit ausreichender N-Quellen stattfindet. Arg könnte somit möglicherweise, ohne dabei abgebaut zu werden, als N-Donor für die Synthese von nicht-proteinhaltigen Molekülen, wie Nucleotiden oder Aminosuckern, dienen.

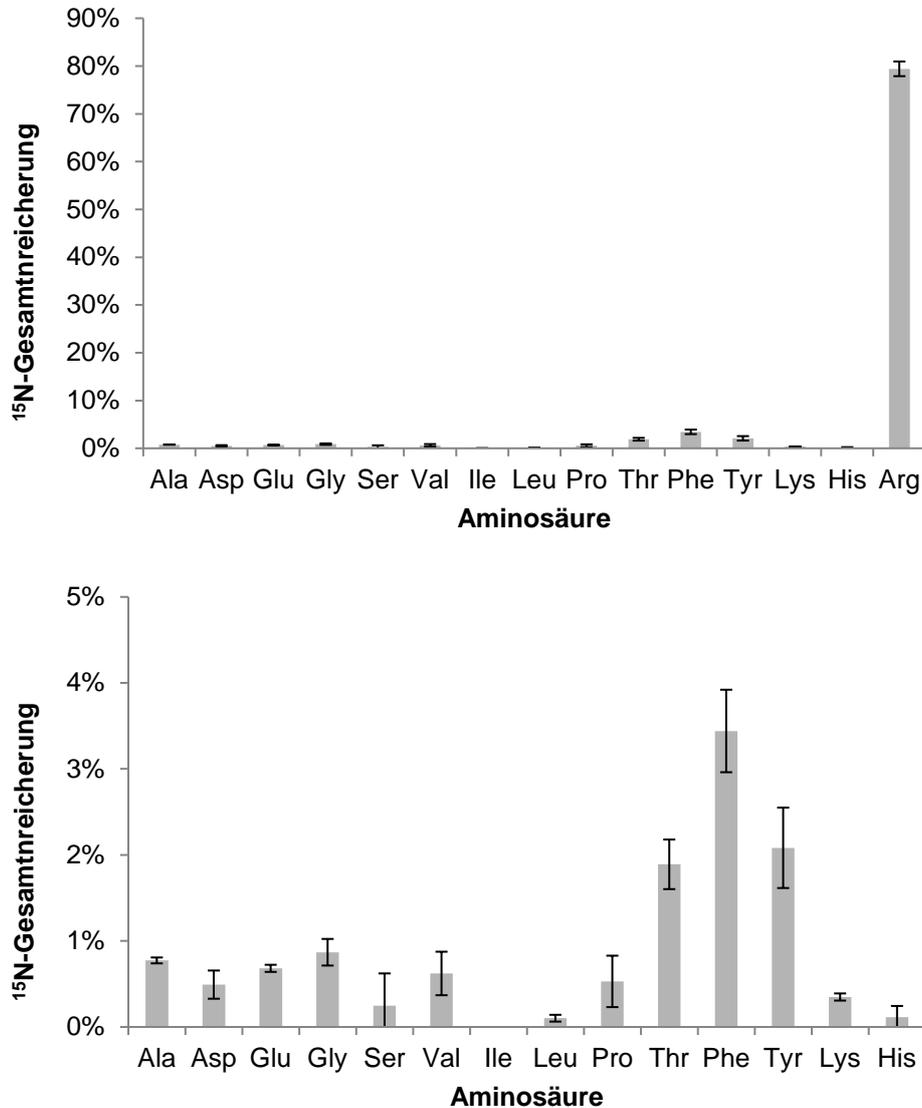


Abbildung 11: ^{15}N -Einbauraten in listeriellen AS beim Wachstum in MM mit ^{15}N -Arg.

Arg zeigte die höchste ^{15}N -Anreicherung und wurde somit effektiv aufgenommen. Die geringen Werte in allen anderen messbaren listeriellen AS belegen, dass Arg nicht als N-Quelle für andere AS verwendet wurde. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Ohne Arg im Medium wird dieses unter Verwendung von Stickstoff aus $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ und $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, in Kombination mit unmarkiertem Stickstoff, neu synthetisiert, da unter diesen Umständen alle möglichen Kombinationen an Arg-Molekülen, also mit ein bis vier markierten N-Atomen, gemessen werden konnten (Abb. S2B in Kutzner *et al.*, 2016). Stickstoff aus Ammonium wird bevorzugt, da bei den Experimenten mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ ein größerer Anteil an (M + 3)- und (M + 4)-

Isotopomeren gefunden wurde im Vergleich zum Wachstum mit [U-¹⁵N₂]Gln. Dies kann durch den Biosyntheseweg von Arg erklärt werden, der von Glu ausgeht, welches das neben dem α-C-Atom gelegene N-Atom liefert (Abbildung 6). Glu wird dabei durch die Transaminierung der Carboxygruppe in der Seitenkette mit Hilfe eines weiteren Moleküls Glu zu Ornithin umgeformt, sodass zwei der benötigten N-Atome bereits von Glu geliefert werden. Die N-Atome der Guanidin-Seitenkette hingegen stammen von einem Molekül Ammonium, das aus Carbamoylphosphat gewonnen wird, und einem weiteren N-Atom, welches von Asp übertragen wird. Somit führt das Wachstum mit NH₄Cl zu heterogeneren, ¹⁵N-markierten Substraten, die eher zu einer Bildung von (M + 3)- und (M + 4)-Isotopomeren führt.

B. subtilis nutzt Arg oder Ammonium in Abwesenheit der bevorzugten N-Quelle Glutamin (Detsch und Stülke, 2003; Fisher, 1999). Im Gegensatz dazu konnte für *L. monocytogenes* die Verwendung von Arg als N-Quelle unter den gegebenen experimentellen Bedingungen widerlegt werden. Beim Abbau von Arg in Ornithin, Ammonium und CO₂ sind drei Enzyme beteiligt, die zusammen das Arginin-Deiminase-(ADI)-System bilden (Abbildung 12), nämlich die Arginin-Deiminase ADI (*Imo0043*), die katabole Ornithin-Carbamoyltransferase cOTCase (*Imo1587*) und die Carbamat-Kinase CK (*Imo0039*), für die homologe Gene bei *L. monocytogenes* bestätigt werden konnten (Cunin *et al.*, 1986; Glaser *et al.*, 2001). Ein Mol Arg führt über das ADI dabei zu zwei Molen Ammonium. Die Aktivität der Gene dieses Systems bei *L. monocytogenes* konnte bereits experimentell belegt werden. Hierbei wurde gezeigt, dass das ADI-System beim Wachstum und dem Überleben unter sauren pH-Werten eine Rolle spielt, und dass die ADI-Gene bei solchem, unter anaeroben Bedingungen und außerdem in Anwesenheit von Arg verstärkt exprimiert werden (Ryan *et al.*, 2009). Das ADI System ist bei *L. monocytogenes* das einzige System zum Abbau von Arg. *B. subtilis* besitzt hingegen noch andere Abbauewege für Arg, nämlich über eine Arginase, welche zur Bildung von Harnstoff und Ornithin führt, über eine Stickstoffmonoxid-Synthase-Oxygenase (*nosA*) die Stickstoffmonoxid bildet, und über eine Arginin-Decarboxylase und eine Agmatinase (*speAB*), welche aufeinanderfolgend Agmatin und Putrescin bilden. Generell scheint das ADI-System bei der Pathogenität bedeutend zu sein, so konnte bereits eine Modulation durch die Virulenzregulatoren PrfA und SigB gezeigt werden (Ryan *et al.*, 2009). Bei *Streptococcus pyogenes* waren Mutanten im Gen *arcA* (Arginin-Deiminase) in ihrer Fähigkeit, in Zellen zu gelangen, inhibiert (Degnan *et al.*, 2000), *Streptococcus suis* zeigte starke Attenuierung in Epithelzellen bei Mutation des Arginin-Ornithin-Antiporters ArcD (Fulde *et al.*, 2014). Für *L. monocytogenes* wurde im Mausmodell gezeigt, dass die Gene *arcA* und *argR* (Arginin-Repressor) bei der Replikation in der Milz eine Rolle spielen. Ein weiterer Hinweis darauf ist außerdem, dass sechs der Gene aus dem ADI-Cluster bei dem nicht-pathogenen Stamm *L. innocua* nicht vorhanden sind.

Obwohl die Aktivität für experimentelle Bedingungen wie neutraler pH und Anwesenheit von Arg, wie in dieser Arbeit verwendet, bereits nachgewiesen werden konnte (Ryan *et al.*, 2009), wurde kein Einbau von ¹⁵N aus degradiertem Arg, welches in NH₄⁺ resultiert, in andere AS beobachtet, was vermuten lässt, dass das ADI-System bzw. der katabole Zweig davon unter den hier verwendeten Bedingungen nicht aktiv war. Für intrazellulär replizierende Listerien konnte gezeigt

werden, dass die Synthese von Arg unter diesen Bedingungen induziert wird (Hain *et al.*, 2007), und Arg somit entweder keine reichhaltig vorhandene N-Quelle in eukaryotischen Zellen darstellt oder aber zusätzlich *de novo* synthetisiertes Arg für den komplexen Metabolismus von *L. monocytogenes* notwendig ist.

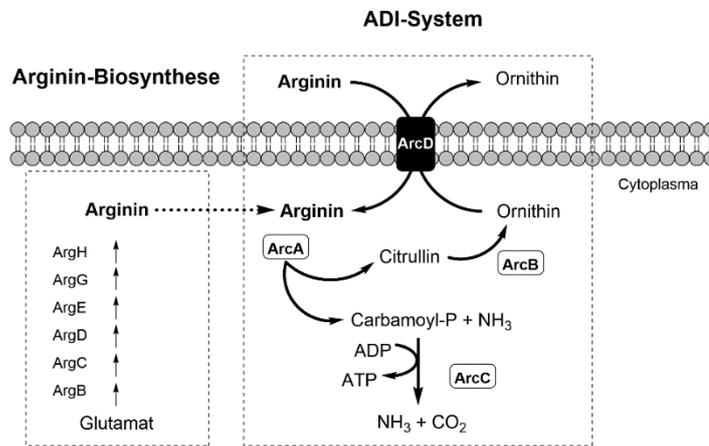


Abbildung 12: Schematische Ansicht des Arginin-Deiminase-Systems (ADI).

Drei Enzyme bilden den Abbauweg, nämlich die Arginin-Deiminase (*arcA*), die katabole Ornithin-Carbamoyltransferase (*arcB*) sowie die Carbamat-Kinase (*arcC*). Arg wird dabei über den Arginin:Ornithin-Antiporter ArcD in die Zelle transportiert. Zwei Mol Ammonium und ein Mol ATP werden pro Mol Arg, welches abgebaut wird, generiert. Intrazelluläres Arg, das aus Glutamat gewonnen wird, kann ebenfalls in das ADI-System eingeschleust werden (modifiziert nach Ryan *et al.*, 2008).

2.1.5 BCAAs werden sowohl direkt eingebaut als auch katabolisiert

Da die Verwendung von $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ oder $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ zu keiner vollständigen Markierung (33–46 %) in den AS führte und Arg als N-Donor ausgeschlossen werden konnte, wurden weitere, potentielle N-Quellen aus dem Medium in markierter Form eingesetzt. Die BCAAs verbessern durch ihre Anwesenheit im Medium die listerielle Wachstumsrate (Joseph und Goebel, 2007), was auf eine wichtige Rolle im Metabolismus hindeutet. Beim Wachstum mit ^{15}N -Leu, ^{15}N -Ile oder ^{15}N -Val konnten in allen anderen messbaren AS Markierungswerte von 10–20 % erreicht werden, ausgenommen von His und Arg (Abb. 3 in Kutzner *et al.*, 2016). Diese beiden AS waren im Medium vorhanden und wurden bevorzugt aufgenommen. Val, Ile und Leu selbst wurden neben ihrem Abbau auch direkt für den Proteinaufbau verwendet, was an der höheren ^{15}N -Gesamtanreicherung der BCAAs im Vergleich zu allen anderen AS erkennbar war. Die Katabolisierung der BCAAs erfolgt über spezifische Transaminasen und führt zur Bildung von ^{15}N -Glu, und darüber letztendlich zum Einbau markierter N-Atome in AS. Die drei BCAAs dienen *L. monocytogenes* während des Wachstums in MM somit als N-Quelle, obwohl Gln im Medium vorhanden war. Im direkten Vergleich wurde Stickstoff aus ^{15}N -Leu oder ^{15}N -Ile in größerem Maße in andere AS eingebaut als Stickstoff aus ^{15}N -Val, was wiederum bedeutet, dass weniger Leu und Ile direkt in Proteine eingebaut wurde. Die Isotopologen-Muster zeigten ähnliche Ergebnisse wie bei den Versuchen mit $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ (Abb. S3 in Kutzner *et al.*, 2016).

Auch bei Experimenten mit ^{13}C war beim Wachstum von *L. monocytogenes* in Zellen trotz der Zugabe von BCAAs eine zumindest geringe Synthese dieser AS messbar, welche außerdem mit der Aktivität von PrfA zusammenhängt und somit bei der Virulenz eine Rolle zu spielen scheint. Die Anwesenheit von Glucose als C-Quelle scheint außerdem ebenfalls zu einer verminderten BCAA-Biosynthese zu führen (Eisenreich *et al.*, 2006; Slaghuis *et al.*, 2007). Der bevorzugte Direkteinbau von AS konnte auch bei Infektionsexperimenten in Zellkultur gezeigt werden, bei denen diese in ^{13}C -markierter Form in den Stoffwechsel eingeschleust wurden. Während der intrazellulären Replikation von *L. monocytogenes* stellten AS nicht die hauptsächlichen C-Lieferanten für die Kohlenstoffgerüste zur AS-Biosynthese dar. Stattdessen schien die Mehrzahl der glykogenen und ketogenen AS direkt in Proteine eingebaut zu werden, möglicherweise aufgrund einer Knappheit an essentiellen, katabolen Intermediaten (Grubmüller *et al.*, 2014). Mutierte Stämme von *L. monocytogenes*, die keine der drei verzweigt-kettigen AS synthetisieren konnten, waren in der Replikation innerhalb von Zellen und somit in ihrer Virulenz inhibiert, nicht jedoch solche Stämme, die auxotroph waren für andere AS wie Phe, Gly oder Pro (Marquis *et al.*, 1993). Die *de novo*-Synthese der BCAAs unter intrazellulären Wachstumsbedingungen konnte auch in einer Transkriptomstudie nachgewiesen werden. Die Gene für die Biosynthese von Ile und Val waren in dieser Studie bei *L. monocytogenes* hochreguliert und eine Mutante im Gen *ilvD* (Dihydroxysäure-Dehydratase), welches für die Synthese dieser AS notwendig ist, war beim Wachstum in Epithelzellen attenuiert (Hain *et al.*, 2007). Die BCAAs scheinen daher für *L. monocytogenes*, auch in Bezug auf die Virulenz, eine wichtige Rolle zu spielen. Da ihre Synthese von einigen grundlegenden katabolischen Vorläufermolekülen (Oxalacetat, Pyruvat und Acetyl-CoA) abhängt, stellen die BCAAs auch einen wichtigen Indikator für den generellen Ernährungsstatus der Bakterienzelle dar (Slaghuis *et al.*, 2007).

2.1.6 Methionin wird als N-Quelle verwendet

Neben den bereits bestätigten N-Quellen Gln, Ammonium und den BCAAs wurden außerdem die für *L. monocytogenes* essentiellen AS Met und Cys getestet. Beim Wachstum mit ^{15}N -Met konnten Anreicherungsgrade von 3–28 % gemessen werden (Abb. 4 in Kutzner *et al.*, 2016). Bei allen bisherigen Experimenten mit ^{15}N -markierten Substanzen war die automatische, programm-basierte Auswertung von Met nicht durchführbar, da Met leicht oxidiert wird (Pickering und Newton, 1990) und die Anzahl der intakten Met-Moleküle nach der sauren Hydrolyse somit zu gering für die GC-MS Analyse war. Durch manuelle Auswertung konnte in diesem Experiment jedoch für Met eine ^{15}N -Anreicherung von 66 % festgestellt werden. Am geringsten war der ^{15}N -Anteil für His und Arg, da diese AS direkt aufgenommen und in Proteine eingebaut werden. Überraschend waren die Werte für Phe und Tyr, die signifikant höher waren als in den vorhergehenden Experimenten (28 % bzw. 21 %). Dies könnte möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die Transaminierung von Asp, Cys, Phe und Tyr vom gleichen Enzym katalysiert wird, nämlich der Aspartat-Aminotransferase (*Imo1897*). Dieses Enzym setzt Glu zu α -Ketoglutarat um und katalysiert auch die umgekehrte Reaktion. ^{15}N -Met wird zunächst zu Cys abgebaut, welches dann anschließend durch die Aspartat-Aminotransferase über den Transfer

eines markierten Stickstoff-Atoms von Met auf α -Ketoglutarat transaminiert wird, wodurch Glu entsteht. Aus diesem ^{15}N -Gln wird durch das gleiche Enzym wiederum Phe und Tyr gebildet. Trotz dieser Katabolisierungsreaktionen wurde Met zu einem Großteil allerdings direkt in die listeriellen Proteine eingebaut, was zu den hohen Markierungswerten von bis zu 65 % in Met führt. Ein Restanteil von 35 % wurde allerdings *de novo* synthetisiert, in Anwesenheit von Cys, welches einen direkten Vorläufer in der Met-Synthese darstellt. His, Lys und Arg zeigten ähnliche Isotopenmuster wie in den Experimenten mit den BCAAs (Abb. S2C in Kutzner *et al.*, 2016), was die Desaminierung von Met bestätigt. Met konnte hier als weitere N-Quelle belegt werden, wenn auch zu geringeren Anteilen im Vergleich zu allen anderen identifizierten Substraten. Eine Ursache dafür könnte der komplexere Abbauweg dieser AS darstellen. Des Weiteren legt die Tatsache, dass Met von *L. monocytogenes* nicht selbst synthetisiert werden kann, die Vermutung nahe, dass diese AS bevorzugt aufgenommen und direkt verstoffwechselt wird.

2.1.7 Cystein wird hauptsächlich direkt in Proteine eingebaut

Cys kann über die Cystathionin- β -Lyase (*Imo1679*) zu Pyruvat und Ammonium abgebaut werden. Beim Wachstum mit ^{15}N -Cys konnten jedoch nur sehr geringe ^{15}N -Werte in den AS gemessen werden. Die maximalen Einbauraten lagen bei 3 % für Ala und 2,5 % für Thr, bei allen anderen AS bei unter 1,5 % (Abb. 4 in Kutzner *et al.*, 2016). N-Atome aus Cys werden somit grundsätzlich zwar in andere AS eingebaut, jedoch nur zu einem sehr geringen Anteil. Diese Vermutung wurde auch durch ein weiteres Experiment bestätigt, bei dem *L. monocytogenes* mit dem ^{15}N -Aminosäuremix plus ^{15}N -Cys angezogen wurde, und bei dem die ^{15}N -Gesamtanreicherungen in den AS durch die zusätzliche, markierte N-Quelle nicht anstiegen (nicht gezeigt). *L. monocytogenes* kann diese AS nicht selbst synthetisieren und verwendet sie daher unter diesen Bedingungen scheinbar ausschließlich für den Direkteinbau in Proteine. *L. monocytogenes* EGD-e besitzt die Gene zur Synthese von Met über L-Homocystein (Glaser *et al.*, 2001), jedoch nicht für den Aufbau von Cys. Einige andere Listerienstämme sind jedoch für das Wachstum auch auf die Zugabe von Met angewiesen (Friedman und Roessler, 1961; Premaratne *et al.*, 1991; Tsai und Hodgson, 2003). Bei der Proliferation innerhalb von Wirtszellen ist *L. monocytogenes* je nach Stamm daher auf die Versorgung mit wenigstens der AS Cys angewiesen. Cys ist für Säugerzellen nicht essentiell, Met hingegen schon, somit könnte für beide Parteien hier ein Wachstumsvorteil in Bezug auf die Nährstoffversorgung mit diesen AS entstanden sein (Slaghuis *et al.*, 2007).

2.1.8 Ethanolamin ist eine alternative N-Quelle

Da die Rolle der *eut*-Gene bei der N-Versorgung von *L. monocytogenes* bisher nicht experimentell belegt wurde, wurden Versuche durchgeführt, um herauszufinden, ob Ethanolamin als hauptsächliche N-Quelle genutzt werden kann, und ob daraus gewonnener Stickstoff tatsächlich für die AS-Synthese verwendet wird. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden zunächst die Wachstumsbedingungen für diese Substanz etabliert. *L. monocytogenes* wurde in

MM ohne Gln angezogen, als C-Quelle wurde statt Glucose Glycerin zugesetzt. Dieses entsteht beim Abbau von Phosphatidylethanolamin und mindestens zwei Gene, die bei der Ethanolamin-Nutzung involviert sind (*eutE* und *eutJ*), werden in Gegenwart dieses Zuckeralkohols induziert (Joseph *et al.*, 2006). Außerdem wurde Cobalamin zugegeben, da dieses als Coenzym für die Ethanolamin Ammoniak Lyase EutBC notwendig ist. Ethanolamin wurde in Konzentrationen von 4 bis 82 mM getestet, wobei sich herausstellte, dass ab Konzentrationen von über 50 mM kein Wachstum mehr stattfand (nicht gezeigt) und 30 mM zu Wachstumsraten führte, die mit denen durch 4,1 mM Gln oder Ammonium erreichten vergleichbar waren (Abb. 5A in Kutzner *et al.*, 2016). Die verlängerte Latenzphase im Vergleich zum Wachstum in Standard-MM resultiert aus der Nutzung von Glycerin als C-Quelle, anstelle von Glucose. Eine Mutante, die einen Defekt im Gen *eutB* (große Untereinheit der Ethanolamin-Ammoniak Lyase) aufweist, war unter diesen Bedingungen in der Proliferation stark inhibiert. Das Wachstumsverhalten ähnelte dabei dem des wildtypischen Stammes in einem Medium ohne Zugabe von Ethanolamin als notwendige N-Quelle (Kontrolle), was die Bedeutung des Enzyms für die Ethanolamin-Nutzung demonstriert. Für solch eine Mutante konnte auch beim Wachstum in Caco-2-Zellen eine reduzierte Replikationsrate gezeigt werden, was einen Hinweis darauf liefert, dass die Versorgung mit Ethanolamin für *L. monocytogenes* beim Wachstum *in vivo* eine wichtige Rolle spielt (Joseph *et al.*, 2006).

Die N-Einbauraten in die einzelnen AS wurden nach Anzucht mit ¹⁵N-Ethanolamin untersucht und zeigten hohe ¹⁵N-Werte von 30 % (Val) bis 66 % (Glu), ausgenommen His und Arg, welche, wie bei den vorhergehenden Versuchen, aus dem Medium bezogen wurden (Abb. 5B in Kutzner *et al.*, 2016). Die Ergebnisse lieferten mit den vorherigen Experimenten mit ¹⁵NH₄Cl vergleichbare Werte, was durch die Entstehung von Ammonium beim Abbau von Ethanolamin zu erklären ist. Glu enthält am meisten ¹⁵N aus Ethanolamin, da das daraus gewonnene Ammonium über die GDH zu Gln assimiliert wird und aus diesem bei der sauren Hydrolyse Glu entsteht (Abbildung 6). Daher waren auch die (M + 2)-Muster von Lys, wie bei Verwendung von ¹⁵NH₄Cl, höher als beim Wachstum mit allen anderen Substraten, da bei der Synthese dieser AS, ausgehend von Oxalacetat, zwei Moleküle Glu verwendet werden (Abb. S2D in Kutzner *et al.*, 2016). Die ¹⁵N-Einbauraten beim Stamm EGD-e Δ *eutB* waren unter Verwendung von ¹⁵N-Ethanolamin, wie erwartet, sehr gering (Abb. 5B in Kutzner *et al.*, 2016), da diese Mutante Ethanolamin nicht abbauen und dieses somit nicht als N-Quelle verwenden kann, wie auch im Wachstumsexperiment im Vorfeld gezeigt wurde.

Die Daten demonstrieren, dass *L. monocytogenes* Ethanolamin unter den beschriebenen Wachstumsbedingungen tatsächlich als eine mit Gln oder Ammonium vergleichbare N-Quelle für die AS-Synthese verwenden kann. Für eine Rolle bei der Pathogenität spricht die Hochregulierung der *eut*-Gene beim Wachstum in Säugerzellen, im Mausmodell oder in Blut (Joseph *et al.*, 2006; Toledo-Arana *et al.*, 2009; Garsin *et al.*, 2001; Archambaud *et al.*, 2012). Neben der Nährstofftheorie könnte der Ethanolamin-Abbau außerdem auch die Immunfunktionen des Wirtes beeinflussen, da durch das dabei entstehende Acetyl-CoA Acetat gebildet werden kann, welches über einen speziellen Rezeptor im Darm Funktionen des angeborenen

Immunsystems und Entzündungsprozesse moduliert (Maslowski *et al.*, 2009; Garsin, 2012). Die Gencluster für die Ethanolamin-Nutzung in pathogenen Bakterien sind sehr ähnlich, was ebenfalls dafür spricht, dass die Versorgung mit diesem Nährstoff maßgeblich zur Proliferation beiträgt. Dass die Nutzung alternativer N-Quellen wie Ethanolamin oder Propanediol auch aufgrund einer auftretenden Nährstoffkonkurrenzsituation induziert werden kann zeigt eine Studie, bei der im Darm von Mäusen wachsende *L. monocytogenes*-Bakterien bei Anwesenheit verschiedener Stämme von *Lactobacillus* sp. die Transkription eben jener Gene für die Nutzung dieser Substrate hochregulierte (Archambaud *et al.*, 2012).

2.1.9 Glucosamin kann als hauptsächliche C- und N-Quelle verwendet werden

Glucosamin (GlcN) führte in einer Konzentration von 20 mM in MM ohne Glucose, Gln und Arg zu Proliferationskurven vergleichbar mit denen beim Wachstum mit Gln oder Ammonium, was belegt, dass es von *L. monocytogenes* sowohl als C- als auch als N-Quelle verwendet werden kann (Abb. 5A in Kutzner *et al.*, 2016). Die ¹⁵N-Einbauraten waren im Vergleich zu denen aus ¹⁵N-Ethanolamin signifikant niedriger (Abb. 5B in Kutzner *et al.*, 2016), was auf die unterschiedlichen ¹⁵N-Ausgangsmengen der eingesetzten Substrate zurückgeführt werden könnte (20 mM GlcN im Vergleich zu 30 mM Ethanolamin). GlcN ist eine Komponente der C-Seitenketten von intestinalem Mucin und ist für die Nutzung als C-Quelle bereits bekannt (Premaratne *et al.*, 1991). N-Acetylglucosamin (GlcNAc) kommt in zahlreichen natürlichen Polymeren als monomere Einheit vor, wie z.B. im Chitin bei Arthropoden und der Zellwand vieler Pilze. GlcN und GlcNAc sind außerdem wichtige Bausteine vieler Lipopolysaccharide und auch für die Peptidoglycanschicht bakterieller Zellwände, bei der N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure β(1→4) glycosidisch miteinander verknüpft sind (Moye *et al.*, 2014). GlcN gelangt über ein Phosphotransferasesystem (PTS) in die Bakterienzelle und kann über NagB (*Imo0957*) desaminiert werden, wobei Fructose-6-Phosphat, welches im Zuckerstoffwechsel weiterverwendet werden kann, und Ammonium, welches der Bakterienzelle Stickstoff liefert, entstehen (Abbildung 6). Die Isotopologenmuster von Arg spiegeln dessen Neusynthese wider, da es nicht im Medium vorhanden war, wohingegen die Muster von Lys und His ähnliche Werte zeigten wie beim Experiment mit ¹⁵N-Ethanolamin (Abb. S2D in Kutzner *et al.*, 2016), was wiederum durch den Abbau von GlcN über Ammonium erklärt werden kann.

Im Gegensatz zu *B. subtilis*, welcher zur Nutzung von GlcN eine zusätzliche C-Quelle wie Glucose oder Glycerin benötigt (Hu *et al.*, 1999), konnte hier gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* GlcN direkt als N- und C-Quelle nutzen kann. Die listeriellen Gene zum Abbau in Fructose-6-Phosphat und Ammonium waren in einer Studie beim Wachstum in Medium in der stationären Phase hochreguliert, was auf die Nutzung als alternative Quelle bei Nährstoffknappheit hindeutet, während der Proliferation im Blut waren sie jedoch herunterreguliert, was vermuten lässt, dass dort entweder bevorzugt andere Quellen genutzt werden oder kein GlcN vorhanden ist (Toledo-Arana *et al.*, 2009). In der gleichen Studie konnte

außerdem keine Hochregulierung dieser Gene im Darm festgestellt werden, obwohl GlcN in dieser Umgebung reichlich vorhanden ist (Martin *et al.*, 2009).

Dies könnte darauf hindeuten, dass der Aminosucker dort eher von der Mikrobiota verwendet wird und nicht von Listerien, die eventuell eher bei intrazellulärem Wachstum darauf zurückgreifen, da zumindest das Gen für die Deacetylierung von GlcNAc-6-Phosphat zu GlcN-6-Phosphat intrazellulär hochreguliert war (Chatterjee *et al.*, 2006). Das Enzym ist für das listerielle Überleben *in vivo* von entscheidender Bedeutung, da eine Mutante in ihrer Zellteilung massiv beeinträchtigt war, keine normale Zellmorphologie aufwies und somit unfähig wäre eine Infektion herbeizuführen (Popowska *et al.*, 2012).

2.1.10 Mutationen in GlnR, GDH und GlnK verändern die N-Flüsse

Bakterielle Stämme, die in stoffwechselspezifischen Funktionen einen Defekt aufweisen, können durch das Fehlen von z.B. Schlüsselenzymen bestimmte metabolische Reaktionen nicht mehr durchführen. Dies kann zu kleinen Veränderungen im Stoffwechsel führen, oder aber durch die zahlreichen Verknüpfungen im metabolischen Netzwerk weitgreifende Konsequenzen haben. Beim *Isotopologue Profiling* können sich solche Veränderungen in den Markierungsmustern der AS widerspiegeln, so dass sich z.B. der Beitrag spezifischer Enzyme an bestimmten Reaktionen untersuchen lässt.

GlnR, der Repressor des *glnRA*-Operons (Glutaminsynthetase-Repressor *Imo1298*) sowie der Regulator GlnK sind zentrale Proteine des N-Metabolismus. Um die Auswirkungen eines Ausfalls dieser Proteine zu untersuchen, wurden Mutanten mit Defekten in diesen Genen untersucht. *L. monocytogenes* EGD-e Δ *glnR* (Kaspar *et al.*, 2014) zeigte nach Wachstum mit [U- $^{15}\text{N}_2$]Gln ähnliche Muster in den bakteriellen AS wie der WT. Da auch beim Wachstum mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ keine Abweichungen erkennbar waren, wurde dieser Versuch nicht wiederholt (Abbildung 13).

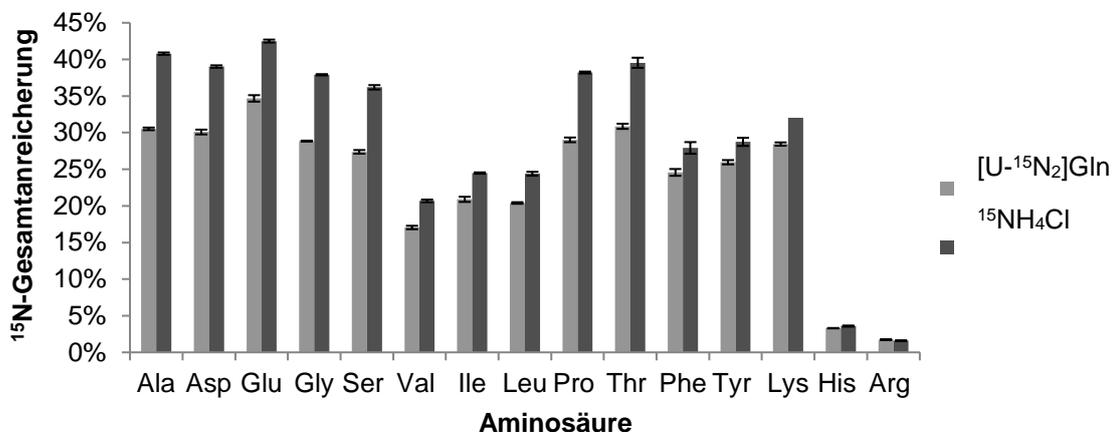


Abbildung 13: Wachstum von *L. monocytogenes* EGD-e Δ *glnR* mit [U- $^{15}\text{N}_2$]Gln oder $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten (Gln) bzw. von drei technischen Replikaten ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$).

Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das *glnRA*-Operon nur in Abwesenheit von Gln exprimiert wird, z.B. wenn Ammonium vorhanden ist, welches dann über die GDH assimiliert wird. Dies bestätigen außerdem die Ergebnisse von Kaspar *et al.* (2014), wonach eine Deletion von *glnR* sich in Anwesenheit von Gln oder Ammonium nicht auf die Transkription von *gdh* auswirkt. GlnR ist außerdem nur aktiv bei Wachstum mit N-Überschuss (Fisher, 1999).

Beim Stamm *L. monocytogenes* EGD-e Δ *Imo0560* ist die GDH mutiert und somit nicht funktionell. Die ^{15}N -Gesamtanreicherungen in den AS, welche aus dieser Mutante isoliert wurden, unterschieden sich nicht von denen des Wildtyps nach Wachstum mit ^{15}N -BCAAs. Nach Wachstum mit $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ war jedoch weniger ^{15}N -Anreicherung und mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ beinahe keine Anreicherung mehr messbar (Abb. 6 in Kutzner *et al.*, 2016). Diese Daten suggerieren eine katabole sowie anabole Funktion der listeriellen GDH im Gegensatz zu *B. subtilis*, bei dem die GDH Glu nur abbaut (Gunka und Commichau, 2012). Daher ist eine GOGAT-Mutante bei *B. subtilis* durch die Tatsache, dass dieses Enzym der einzige Weg ist Glu zu generieren, auxotroph für diese AS (Commichau *et al.*, 2007). Bei *B. subtilis* führt eine funktionslose GDH außerdem zu schweren Wachstumsdefekten (Commichau *et al.*, 2008), bei *L. monocytogenes* jedoch nicht (persönliche Kommunikation mit Stefanie Müller-Herbst). Eine anabole Funktion der GDH kann auch bei *E. coli* beobachtet werden (Reitzer, 2003). Die geringen Einbauraten beim Wachstum mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ lassen vermuten, dass $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in hohen Konzentrationen hauptsächlich über die GDH abgebaut wird. Dies kann durch die geringe Affinität der GDH zu Ammonium erklärt werden, die daher nur bei hohen Konzentrationen aktiv ist. Ein Fehlen dieses Enzyms, wie im Falle dieser Mutante, führt somit dazu, dass wenig ^{15}N aus $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ in die AS eingebaut werden kann (s. Abbildung 5).

Das Gen *nrgB* codiert das N-regulatorische P II-Protein GlnK. Beim Stamm *L. monocytogenes* EGD-e Δ *nrgB* konnte eine reduzierte ^{15}N -Anreicherung beim Wachstum mit $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ gemessen werden, jedoch nicht mit $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ oder ^{15}N -BCAAs (Abb. 6 in Kutzner *et al.*, 2016). Dies lässt für den listeriellen GlnK-Regulator eine andere Rolle vermuten als bei *E. coli*, wo GlnK unter anderem den Ammoniumtransporter AmtB reguliert (Coutts *et al.*, 2002). Da regulatorische P II-Proteine in der Lage sind, die Konzentration von α -KG wahrzunehmen, könnte GlnK so eine gleichzeitige Anpassung an verschiedene Umweltparameter, wie Temperatur oder Nährstoffverfügbarkeit, ermöglichen, um den intrazellulären C- und N-Metabolismus an veränderte Bedingungen anzupassen. Die genaue Funktion von GlnK konnte jedoch bisher noch nicht aufgeklärt werden (Forchhammer, 2008; Kaspar *et al.*, 2014).

Die Ergebnisse dieser Experimente mit Stämmen, die verschiedene Mutationen in zentralen Proteinen des N-Metabolismus tragen, zeigen deutlich, dass mit Hilfe von *Isotopologue Profiling* wertvolle Daten generiert werden können, die zum besseren Verständnis von Genfunktionen des Metabolismus beitragen können. Auf diese Art und Weise können bisher unklare Stoffwechselwege genauer beschrieben und somit letztendlich aufgeklärt werden.

2.1.11 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Methode des *Isotopologue Profiling* mit ^{15}N etabliert, um den N-Metabolismus von *L. monocytogenes* bei Wachstum unter *in vitro* Bedingungen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden beinahe alle möglichen N-Quellen eines definierten MM mit ^{15}N -markierten Substraten ersetzt um die ^{15}N -Atome während ihrer metabolischen Konvertierungen verfolgen zu können. Abbildung 14 (entspricht Abb. 7 aus Kutzner *et al.*, 2016) zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit ermittelten N-Quellen, die von *L. monocytogenes* beim Wachstum in definiertem MM für den Aufbau von AS verwendet werden.

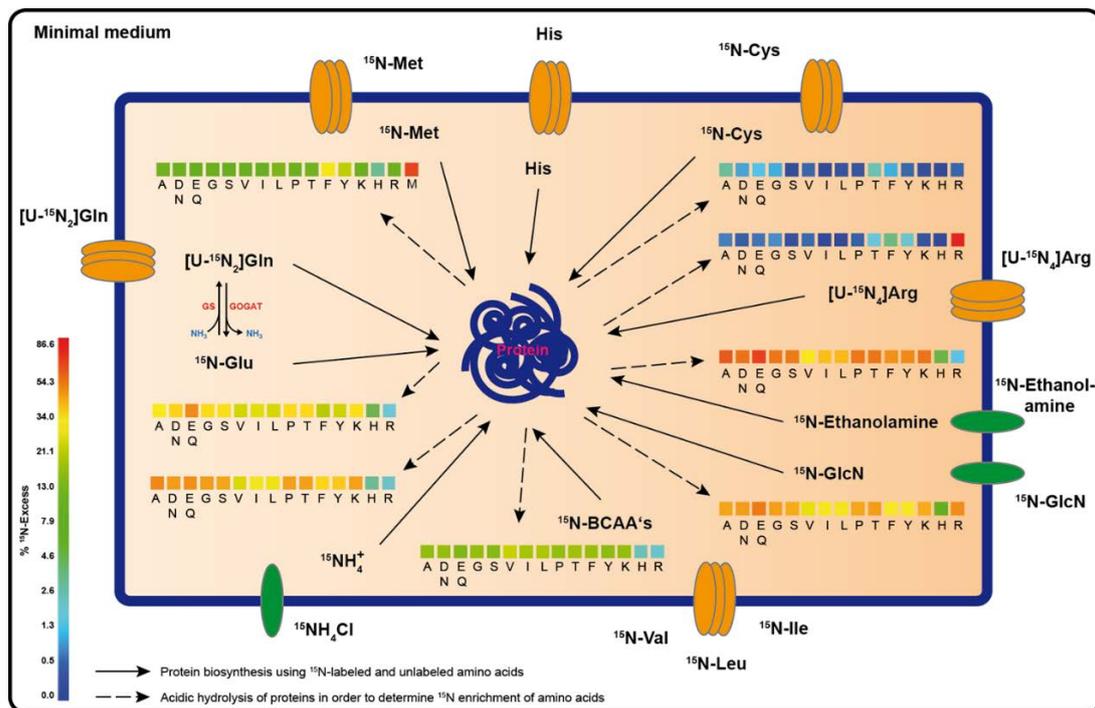


Abbildung 14: N-Quellen von *L. monocytogenes* und deren Beitrag zum gesamten N-Stoffwechsel.

Die Abbildung zeigt die in dieser Arbeit ermittelten N-Quellen und deren Beitrag zum N-Stoffwechsel. Die farbigen Kästchen zeigen die ^{15}N -Anreicherung verschiedener AS von 0 bis 88 % in quasi-logarithmischer Form, analog zum Farbschlüssel, der links im Bild dargestellt ist. Gezeigt sind die Mittelwerte von drei biologischen Replikaten. Bei den BCAAs sind die Mittelwerte der drei Experimente mit ^{15}N -Val, ^{15}N -Ile und ^{15}N -Leu dargestellt (Abb. 7 aus Kutzner *et al.*, 2016).

Neben Gln und Ammonium, die verglichen mit allen anderen Substraten prozentual den meisten Stickstoff für die AS-Synthese lieferten, konnten auch die BCAAs sowie Met als N-Quellen ermittelt werden. Daher lässt sich die bisherige Annahme, dass Substrate wie Gln oder Ammonium als „einzige“ N-Quelle dienen, nicht mehr vertreten, sondern zeigt deutlich, dass *L. monocytogenes* verschiedene N-Quellen in unterschiedlichem Ausmaß parallel nutzt. BCAAs wurden trotz ihrer Anwesenheit im Medium neben dem direkten Einbau auch zusätzlich *de novo* synthetisiert. Cys und Arg lieferten kaum Stickstoff für die Synthesen, diese AS sowie His wurden direkt eingebaut. Für Ethanolamin und Glucosamin konnte zum ersten Mal die Nutzung als N-Quelle für *L. monocytogenes* experimentell belegt werden. Beide Substrate sind auch während

einer Infektion von speziellem Interesse, da sie ubiquitär im Darm vorkommen (Staub und Fuchs, 2014; Martin *et al.*, 2009). Glucosamin konnte dabei außerdem gleichzeitig zur Versorgung mit Kohlenstoff dienen, was demonstriert, dass es eine vielseitig nutzbare Quelle für *L. monocytogenes* darstellt. Die flexible Verwendung verschiedener Substrate zeigt den robusten Metabolismus dieses Bakteriums, welcher ihm eine Anpassung an unterschiedlichste Bedingungen und somit ein Überleben unter diversen Umweltgegebenheiten oder im Wirt ermöglicht.

Durch den Einsatz von Mutanten konnten weiterhin die Möglichkeiten aufgezeigt werden, die die Methode des Isotopologue Profiling bei der Untersuchung von Stoffwechselwegen bietet. So konnte die Rolle verschiedener Gene wie *glnR*, *Imo0560*, *eutB*, *glnK* und *nrgB* näher beleuchtet werden, was zur Aufklärung des hochflexiblen N-Metabolismus von *L. monocytogenes* beitragen kann. Auf diese Weise können zukünftig auch Gene ermittelt werden, die unter in vivo-Bedingungen und bei der Infektion eines Wirtes eine Rolle spielen, und welche somit als potentielle Angriffspunkte für die Entwicklung neuartiger Antibiotika dienen können.

2.1.12 **Publikation 1:** *Isotopologue profiling* of the listerial N-metabolism

Die im vorangegangenen Abschnitt 2.1 beschriebenen Ergebnisse basieren auf der nachfolgend eingebundenen Publikation Kutzner *et al.* (2016).

Isotopologue profiling of the listerial N-metabolism

Erika Kutzner,^{1†} Tanja Kern,^{2†} Angela Felsl,²
Wolfgang Eisenreich¹ and Thilo M. Fuchs^{2*}

¹Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München, D-85747 Garching, Germany.

²Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany.

Summary

The nitrogen (N-) sources and the relative contribution of a nitrogenous nutrient to the N-pool of the gram-positive pathogen *Listeria monocytogenes* are largely unknown. Therefore, ¹⁵N-isotopologue profiling was established to study the N-metabolism of *L. monocytogenes*. The pathogen was grown in a defined minimal medium supplemented with potential ¹⁵N-labeled nutrients. The bacteria were harvested and hydrolysed under acidic conditions, and the resulting amino acids were analysed by GC-MS, revealing ¹⁵N-enrichments and isotopomeric compositions of amino acids. The differential ¹⁵N-profiles showed the substantial and simultaneous usage of ammonium, glutamine, methionine, and, to a lower extent, the branched-chain amino acids valine, leucine, and isoleucine for anabolic purposes, with a significant preference for ammonium. In contrast, arginine, histidine and cysteine were directly incorporated into proteins. *L. monocytogenes* is able to replace glutamine with ethanolamine or glucosamine as amino donors for feeding the core N-metabolism. Perturbations of N-fluxes caused by gene deletions demonstrate the involvement of ethanolamine ammonia lyase, and suggest a role of the regulator GlnK of *L. monocytogenes* distinct from that of *Escherichia coli*. The metabolism of nitrogenous nutrients reflects the high flexibility of this pathogenic bacterium in exploiting N-sources that could also be relevant for its proliferation during infection.

Accepted 20 December, 2015. *For correspondence. E-mail thilo.fuchs@wzw.tum.de; Tel. 08161-713859; Fax 08161-714492. †Both authors contributed equally.

© 2015 John Wiley & Sons Ltd

Introduction

Listeria monocytogenes is a gram-positive pathogen that mainly affects elderly and immunocompromised individuals, pregnant women, and newborns. Its most common transmission vehicles are dairy products, eggs, seafood, and vegetables. The most important listerial virulence factors required for infection are internalins that enable host cell invasion, listeriolysin O that enables listeriae to escape from the otherwise lethal phagocytic vacuole, and ActA that is responsible for manipulations of the cytoskeleton during infection (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). *L. monocytogenes* is capable of replicating under saprophytic conditions, within the cytosol of its host cells, and at refrigerator temperatures.

Under laboratory conditions, *L. monocytogenes* requires complex media such as brain heart infusion broth (BHI) for optimal growth. To study metabolic properties or to perform an analysis of the proteome of *L. monocytogenes*, however, media have been developed for optimizing the supply of carbon, nitrogen, energy sources, amino acids, vitamins, and specific growth factors. The composition of these media provided the first insights into the metabolism of this pathogen (Phan-Thanh and Gormon, 1997; Siddiqi and Khan, 1982; Schneebeli and Egli, 2013). For example, glutamine (Gln) is required as a primary nitrogen- (N-) source for growing *L. monocytogenes* in modified Welshimer's broth (MWB) that is supplemented with a set of amino acids (Welshimer, 1963; Premaratne *et al.*, 1991). More recently, this medium was simplified further by reducing the phosphate level, and strains of listeriae were demonstrated to grow with ammonium instead of Gln as the sole N-source (Tsai and Hodgson, 2003). This medium was supplemented with only two amino acids, methionine (Met) and cysteine (Cys), that are essential for listerial growth because the genes for reducing sulfate are missing in the listerial genome and thiosulfate cannot replace Cys (Tsai and Hodgson, 2003). A drawback of this simple minimal medium (MM), however, is a very long lag phase of *L. monocytogenes*, which can be abolished by the addition of an amino acid mixture (Tsai and Hodgson, 2003). Arginine (Arg) might also play a role as a N-source, because it is, depending on the strain, either necessary or stimulatory for listerial growth

(Friedman and Roessler, 1961; Welshimer, 1963; Premaratne *et al.*, 1991; Tsai and Hodgson, 2003). Further possible N-sources are the branched-chain amino acids (BCAAs) leucine (Leu), isoleucine (Ile), and valine (Val), whose presence strongly enhances the growth rate of *L. monocytogenes* (Welshimer, 1963; Premaratne *et al.*, 1991). Another aspect regarding the metabolic equipment of *L. monocytogenes* EGD-e was derived from its genome sequence that lacks genes for enzymes to catabolise urea or nitrate, indicating that these bacteria are dependent on reduced N-sources (Glaser *et al.*, 2001).

However, analytical details about the metabolic N-fluxes of *L. monocytogenes* are still missing due to a lack of powerful analytical methods. In particular, the contribution of a substrate to the N-pool of *L. monocytogenes*, the balance between direct incorporation of exogenous amino acids into proteins and their degradation, and the occurrence of additional, yet undisclosed N-sources are unclear aspects of bacterial N-metabolism. A key technology to answer these questions is isotopologue profiling that has been applied to study the carbon metabolism of *L. monocytogenes* under various conditions by introducing diverse ^{13}C -labeled tracers (Eisenreich *et al.*, 2006; Eylert *et al.*, 2008; Joseph *et al.*, 2008; Eisenreich *et al.*, 2010; Grubmüller *et al.*, 2014). Recently, we used ^{15}N -isotopologue profiling to demonstrate N-fluxes from *Caenorhabditis elegans* to *L. monocytogenes* during infection (Kern *et al.*, 2015).

The goal of this study was to analyse the N-metabolism of *L. monocytogenes* via ^{15}N -isotopologue profiling during growth in a defined medium. Using a set of ^{15}N -labeled substrates, the incorporation of ^{15}N -atoms into listerial amino acids identified novel N-sources of *L. monocytogenes* under laboratory conditions. The methodology allowed us to quantify the utilization of major and minor N-substrates of *L. monocytogenes* *in vitro* and thus to determine relevant ^{15}N -fluxes during listerial growth. This pilot study not only enabled novel insights into the N-metabolism of a gram-positive pathogen, but also identified N-sources that might contribute to the proliferation of *L. monocytogenes* during infection.

Results

^{15}N -amino acid mix as N-source for growing *L. monocytogenes*

Amino acids are either directly incorporated into bacterial proteins, or catabolized to provide ammonium for *de novo* biosynthesis of other amino acids and nitrogenous compounds [see Supporting Information Fig. S1

for an overview of ^{15}N -isotopologue profiling via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)]. A prerequisite of both pathways are amino acid and oligopeptide transporters that are encoded in huge numbers by the genome of *L. monocytogenes* (Supporting Information Table S1). For a first insight into the capability of *L. monocytogenes* to take up and possibly catabolize amino acids, strain EGD-e was grown in MM (see Experimental procedures) lacking all amino acids, to which a rich mixture (2 g l^{-1}) of algal ^{15}N -labeled amino acids was added. Cys, asparagine (Asn), tryptophane (Trp), and Gln are lacking in this mixture, and we added 0.82 mM Cys to enable the growth of *L. monocytogenes*. Wild type-like growth of EGD-e in this MM demonstrated that Gln, Asn, and Trp were dispensable for listerial proliferation in the presence of the amino acid mixture plus Cys. Isotopologue profiling revealed the highest ^{15}N -enrichments for histidine (His) (87%) and Arg (87%), and the lowest enrichment for aspartate (Asp) (67%) and threonine (Thr; 67%; Fig. 1A). These high incorporation rates demonstrate that labeled amino acids were readily taken up from the medium, and support the hypothesis that amino acid and oligopeptide transporters play an important role especially *in vivo* for the proliferation of *L. monocytogenes* in the gut and in epithelial cells (Borezee *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2012).

The ^{15}N -isotopologue patterns of Arg, His, and Lys with four, three and two N-atoms, respectively, were also determined (Fig. 1B). These three amino acids were nearly completely labeled, again indicating that they were predominantly taken up from the medium rather than *de novo* biosynthesized under these conditions. However, because the amino acid mix does not enable differentiation to the extent to which a single amino acid is degraded or directly incorporated into listerial amino acids, we investigated a series of single ^{15}N -substrates with respect to their potential use as relevant N-sources.

Contribution of Gln as N-source for amino acid synthesis

Gln is the main N-source in the MM used in this study. To determine the enrichment of Gln-derived ^{15}N -atoms within amino acids following the *de novo* biosynthesis of listerial proteins, *L. monocytogenes* was grown to the logarithmic phase in the defined MM, in which unlabeled Gln was replaced with 4.1 mM fully ^{15}N -labeled Gln ($[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$).

^{15}N -atoms were found in all detectable amino acids due to *de novo* biosynthesis with rates of up to 46% (Fig. 2A), confirming Gln as a major N-source. However,

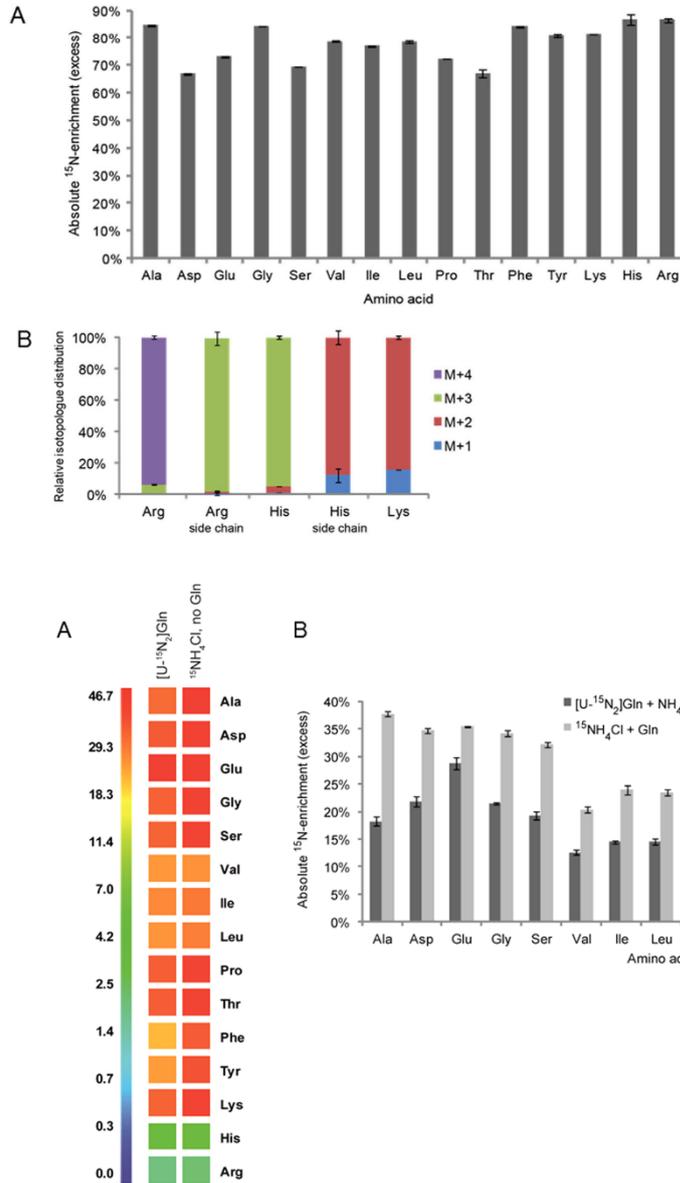


Fig. 1. ^{15}N -Incorporation into amino acids during listerial growth with an algal ^{15}N -amino acid mixture.

A. ^{15}N -enrichments of *L. monocytogenes* amino acids after growth with a mixture of labeled amino acids, which substituted unlabeled Gln, Met, and BCAAs in the defined MM, and unlabeled Cys. Mean values of three biological replicates and their standard deviations are shown.

B. Isotopologue patterns of Arg, His and Lys derived from listerial proteins. The colored columns indicate the relative percentage of the ^{15}N -isotopologues carrying up to four labeled N-atoms (M + 1 to M + 4). Mean values of three biological replicates and their standard deviations are shown. See text for selected numerical values.

Fig. 2. Analysis of protein-derived amino acids from *L. monocytogenes* grown in MM containing $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ or/and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$.

A. The ^{15}N -excess in percentage of amino acids isolated from *L. monocytogenes*. Cells were grown in MM with $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ substituting unlabeled Gln (left color column) or in MM in which Gln was replaced by 4.1 mM $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (right color column). The color maps indicate ^{15}N -excesses from 0 to 47% in quasi-logarithmic form according to the color code. Mean values and standard deviations of three biological replicates are shown.

B. *L. monocytogenes* was grown in MM lacking Arg and containing $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ and NH_4Cl (dark columns), or Gln and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (gray columns), in a concentration of 4.1 mM each. Mean values of three biological replicates are shown.

318 E. Kutzner et al.

it also suggests the utilization of further N-sources present in the MM used here. Enrichments of <5% were measured in Arg and His. This observation again indicates a very low *de novo* biosynthesis rate for these two amino acids. Both amino acids can be taken up from the MM, in which they are present in the unlabeled form, and can be directly incorporated into proteins. ~23–25% of the BCAAs Val, Leu, and Ile were ^{15}N -labeled, reflecting that a substantial proportion was *de novo* biosynthesized using Gln as a source of their amino groups despite the presence of the BCAAs in the growth medium.

The ^{15}N -isotopologue pattern of Lys revealed that 76% of the labeled Lys molecules carried one ^{15}N -atom ($M + 1$), and 24% carried two ($M + 2$; Supporting Information Fig. S2A). The incorporation of one ^{15}N -atom only is more probable, because Lys biosynthesis requires two different enzymes, one to convert the precursor oxaloacetate to Asp via the aspartate transaminase (Imo1897), and a second aminotransferase (Imo1006) responsible for the amination of the side chain (Supporting Information Fig. S1). The exact position of this atom in the molecule, however, could not be identified. Although the ^{15}N -enrichments of His and Arg were very low and therefore did not allow an unbiased analysis, we assumed that the His and Arg molecules were nearly exclusively $M + 1$ labeled at the position next to the α -C-atoms without alterations of their imidazole and guanidinium side chains. Thus, the labeling patterns of these two amino acids could reflect their synthesis from complex precursor molecules (Supporting Information Fig. S1).

^{15}N -enrichment in listerial amino acids during growth with labeled NH_4Cl

To delineate the extent to which listeriae can use ammonium as a N-source, *L. monocytogenes* was grown in MM in which Gln was replaced with 4.1 mM ^{15}N -ammonium chloride ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$). ^{15}N -Atoms were identified in all detectable amino acids (with the exception of His and Arg, see below) at enrichment rates of 24–47% (Fig. 2A). The ^{15}N -incorporation rates of 24–28% in Leu, Ile, and Val confirmed the conclusion from the experiment with $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ that the BCAAs are also synthesized *de novo*, despite their presence in the MM used here. A comparison with the data for bacteria grown with labeled Gln (see above) revealed a significantly higher enrichment of ^{15}N within all of the analysed amino acids. This finding suggests that ammonium is used more efficiently than Gln for *de novo* biosynthesis of proteinogenic amino acids.

The ^{15}N -isotopologue patterns of the three amino acids Lys, Arg, and His are shown in Supporting Information Fig. S2A. Approximately 70% of all Lys molecules carry one unlabeled N-atom derived from a nonlabeled N-source within the MM. The patterns of Arg and His measured here resembled those that were obtained after listerial growth with $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$. Two percent of all Arg molecules were labeled, and most of them carried only one ^{15}N -atom ($M + 1$), which belongs to the α -amino group because no ^{15}N was detected in the Arg side chain. For the labeled His molecules, we again observed $M + 1$ isotopomers almost exclusively, and identified the ^{15}N -atom to represent the α -amino group. No labeled N-atoms were found in the side chain.

Ammonium is the preferred N-source when both NH_4Cl and Gln are present in the medium

In the experiments described above, either labeled Gln or NH_4Cl were added to the medium. The results demonstrated that *L. monocytogenes* uses both substrates as a N-source, resulting in a higher incorporation rate of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ -derived N-atoms into amino acids. To study the simultaneous utilization of these two N-sources, *L. monocytogenes* was grown in MM containing $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ and NH_4Cl , or Gln and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ at equimolar concentrations (4.1 mM). In both experiments, Arg was omitted from the medium so its *de novo* synthesis could be studied. As shown in Fig. 2B, a 2.1-fold (alanine; Ala) to 1.2-fold (Glu) higher ^{15}N -incorporation was observed for all detectable amino acids when the pathogen was grown in the presence of $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and unlabeled Gln than in the presence of $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ and unlabeled NH_4Cl . Therefore, with respect to N-incorporation rates, exogenous ammonium is significantly favored over exogenous Gln as a N-source during listerial growth under *in vitro* conditions. The low overall ^{15}N -enrichment of 3 and 5% in His derived from $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, respectively, confirmed the preferred uptake of this amino acid from the MM over *de novo* synthesis by *L. monocytogenes*.

The labeling patterns of His resembled those observed with $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ or $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (see above). Lys extracted from listerial protein labeled with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ showed ~1.6-fold more $M + 2$ molecules compared with the corresponding experiment using $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ (24% vs. 15%), again indicating a more efficient incorporation of N-atoms derived from $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ than from Gln (Supporting Information Fig. S2A).

Although we confirmed ammonium and Gln to be major N-sources for *L. monocytogenes*, the isotopologue excess rates shown in Fig. 2A indicate that there is at least one further N-source within the MM that is

used for the anabolism of listerial proteins, most likely one or more amino acids.

Arg is directly incorporated

In the absence of Arg in the MM, we detected 23 and 37% *de novo* synthesis of this amino acid using the precursors [U-¹⁵N₂]Gln and ¹⁵NH₄Cl, respectively (Fig. 2B). These values are within the range of the enrichments of all other amino acids found in these experiments. When unlabeled Arg was present in the medium containing [U-¹⁵N₂]Gln, almost no labeling (2–3%) and thus little *de novo* biosynthesis of Arg was observed, which is in contrast to most of the other amino acids (Fig. 2A). To further investigate the fate of imported Arg, listeriae were grown in MM containing 0.5 mM [U-¹⁵N₄]Arg instead of unlabeled Arg, and 0.5 mM Gln (standard concentration of Gln in MM: 4.1 mM) to allow bacterial growth. Protein-derived Arg displayed a ¹⁵N-enrichment of 80%, while 20% of the Arg molecules were not labeled. This finding clearly demonstrates that Arg is efficiently taken up by *L. monocytogenes*, and, more importantly, that this pathogen has a strong preference for directly incorporating Arg rather than *de novo* synthesis. As ¹⁵N was not detected in any other amino acid, we conclude that Arg is not degraded and therefore not used as a N-source for biosynthesis of listerial amino acids during aerobic growth with MM. This is in contrast to *B. subtilis*, for which Arg is the second best N-source (Atkinson and Fisher, 1991), but in line with the limited availability of Arg in host tissues (Klarsfeld *et al.*, 1994). A possible explanation is that the Arg deiminase system is repressed under our experimental conditions.

The isotopologue patterns of Arg and its guanidinium side chain derived from different labeling experiments clearly depended on the presence or absence of Arg in the MM as well as on the supplied ¹⁵N tracer (Supporting Information Fig. S2B). Using [U-¹⁵N₄]Arg, ~56% of all protein-derived Arg molecules were completely labeled (M + 4), confirming that the majority of [U-¹⁵N₄]Arg precursor was taken up from the medium and directly incorporated into listerial proteins (Supporting Information Table S2). However, 43% of protein-derived Arg molecules exhibited an M + 3 pattern due to the replacement of the α-¹⁵N-atom by ¹⁴N from another N-source (see discussion for the fate of the α-¹⁵N-atom). In accordance with the experiments described above using [U-¹⁵N₂]Gln and ¹⁵NH₄Cl as tracers, this finding supports our conclusion that *de novo* biosynthesis of Arg does not occur to a significant extent when Arg is present in the medium. In the absence of Arg, however, its isotopologue pattern demonstrates *de novo* biosynthesis using N-atoms from [U-¹⁵N₂]Gln and ¹⁵NH₄Cl in combination with unlabeled

N-sources, because enriched Arg molecules are composed of all possible isotopic species (Supporting Information Fig. S2B). A slightly preferred usage of ammonium is reflected by the greater portion of M + 3 and M + 4 isotopomers found in the experiment with ¹⁵NH₄Cl in comparison with that with [U-¹⁵N₂]Gln (Supporting Information Fig. S2A).

BCAAs are directly incorporated and also catabolized

Labeling with either ¹⁵NH₄Cl or [U-¹⁵N₂]Gln resulted in an average ¹⁵N-enrichment of only 33–46% in all of the amino acids detected here. Therefore, the MM must provide further N-sources for synthesizing proteinogenic amino acids. To test whether, and to which extent, BCAAs are used for N-metabolism by *L. monocytogenes*, listerial cells were grown in MM containing ¹⁵N-Leu, ¹⁵N-Ile, or ¹⁵N-Val. All detectable amino acids showed 10–20% ¹⁵N-enrichments with the exception of His and Arg (Fig. 3). Both were present in the medium as unlabeled amino acids and were directly used in the *de novo* biosynthesis of listerial proteins (see above). Labeled Val, Ile, and Leu were also directly incorporated into proteins as reflected by the higher ¹⁵N-excess rates of each BCAA in the proteins when added in its labeled form. For comparison, all three ¹⁵N-BCAAs were added simultaneously to the medium (Fig. 3). The data also demonstrate that BCAA degradation includes specific transaminases resulting in ¹⁵N-Glu formation and subsequent incorporation of labeled N-atoms into most amino acids during *de novo* biosynthesis. Thus, the three BCAAs served as a N-source for *L. monocytogenes* during growth in MM despite the presence of (unlabeled) Gln. The excess rate of ¹⁵N in all detectable amino acids was higher when we used the medium containing ¹⁵N-Leu or ¹⁵N-Ile instead of ¹⁵N-Val. This indicates that the amounts of ¹⁵N-Leu and ¹⁵N-Ile directly incorporated into listerial proteins were lower than the amounts of ¹⁵N-Val, as confirmed by the highest ¹⁵N-incorporation rate in Val (37%) when cells were grown in the presence of ¹⁵N-Val. The isotopologue patterns of His, Lys, and Arg resembled those observed in the experiment using [U-¹⁵N₂]Gln as tracer (Supporting Information Fig. S2A).

Met, but not Cys, is a relevant N-source of L. monocytogenes

Further possible N-sources within the defined MM are Met and Cys. To delineate the extent of ¹⁵N-incorporation into listerial amino acids from ¹⁵N-Met, *L. monocytogenes* was grown in MM in which unlabeled Met was replaced with its ¹⁵N-labeled form. Upon isotopologue profiling, we observed ¹⁵N-enrichments for all of the detectable amino

320 E. Kutzner et al.

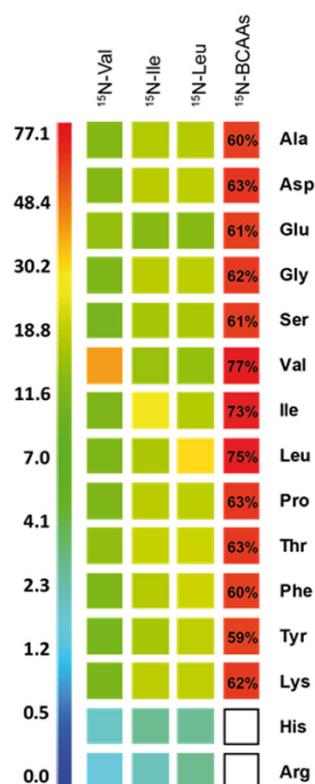


Fig. 3. BCAAs as N-source. ¹⁵N-Enrichments of *L. monocytogenes* amino acids after growth in MM in which unlabeled BCAAs were subsequently replaced by equimolar amounts of ¹⁵N-Val, ¹⁵N-Ile, ¹⁵N-Leu, or all three BCAAs simultaneously (brackets: ¹⁵N-excess rates). The color map in quasi-logarithmic form indicates the ¹⁵N-excesses that range from 0 to 37%. Mean values of three biological replicates are shown.

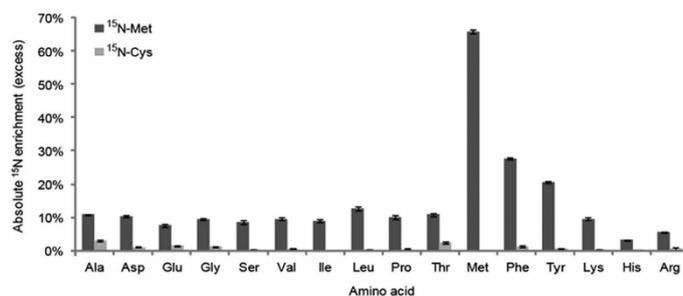


Fig. 4. Met and Cys are minor N-sources. ¹⁵N-Enrichments of *L. monocytogenes* amino acids after growth with ¹⁵N-Met or ¹⁵N-Cys. Cells were harvested in the late logarithmic phase ($OD_{600} = 2.2$). Mean values and standard deviations of three biological replicates are shown.

acids in the range of 3–28% (Fig. 4). Although the amount of intact Met molecules after acid hydrolysis is usually too low for software-based analysis of GC-MS data, a ¹⁵N-enrichment in Met of ~66% was detectable in some experiments. The ¹⁵N-incorporation was lowest for His and Arg due to their uptake and immediate utilization in protein production without being degraded. The enrichment for phenylalanine (Phe) and tyrosine (Tyr) was significantly above average (28 and 21%, respectively). A possible explanation for this observation is that under the growth conditions applied here, glutamate-oxaloacetate-transaminase is induced. This enzyme is involved in the transamination of Cys, Phe, Thr, and Asp by converting Glu to α -ketoglutarate and vice versa. Met is first degraded into Cys, which is then transaminated by the glutamate-oxaloacetate-transaminase that transfers the ¹⁵N from Met to α -ketoglutarate. Then, the same enzyme uses ¹⁵N-labeled Glu (generated during Met degradation) to build Phe and Tyr.

To a major extent, however, Met is directly incorporated into listerial proteins without further degradation, resulting in a ¹⁵N-enrichment of up to 65% in protein-derived Met. This suggests that the complementary 35% of all Met molecules are still synthesized *de novo* in the presence of Cys, which is a precursor of Met synthesis. The isotopologue patterns of His, Lys, and Arg resembled those observed in experiments using labeled BCAAs as tracers (Supporting Information Fig. S2C), confirming that Met is indeed desaminated. It can be summarized that in addition to ammonium, Gln, and the BCAAs, Met serves as a further, so far unknown N-source during listerial growth in a defined MM, albeit to a significantly lower extent presumably due to the more complex degradation of this amino acid.

To test whether Cys also serves as a N-source for *L. monocytogenes in vitro*, the bacteria were grown in MM in which Cys was replaced by ¹⁵N-Cys (Fig. 4). Cys can be degraded by cystathionine β -lyase (Imo1679) into pyruvate and ammonium. Low ¹⁵N incorporation rates were measured for Ala (3%) and Thr (2.5%), and

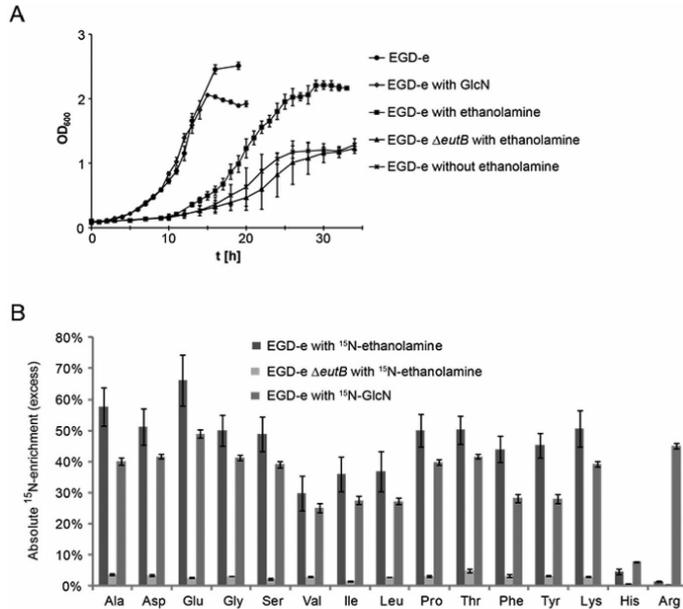


Fig. 5. Utilization of ethanolamine and GlcN as major N-source by *L. monocytogenes*.

A. Growth of EGD-e in MM, in MM with 20 mM GlcN and without glucose, Gln, and Arg, and in MM lacking glucose and Gln, and supplemented with 50 mM glycerol, 200 μM cobalamin and 30 mM ethanolamine. Mutant EGD-e Δ eutB was grown in the medium containing ethanolamine, and growth of EGD-e in MM without ethanolamine was monitored as control.

B. ^{15}N -enrichments of *L. monocytogenes* EGD-e and EGD-e Δ eutB amino acids after growth to $\text{OD}_{600} = 1.7$ with 30 mM ^{15}N -ethanolamine or *L. monocytogenes* EGD-e with 20 mM ^{15}N -GlcN under the conditions described above. Mean values including standard deviations of three biological replicates are shown.

those of the other amino acids analysed here were below 1.5%. Therefore, *L. monocytogenes* incorporates Cys-derived N-atoms into amino acids *in vitro*, but only to a very small extent in comparison with the other amino acids tested here as N-sources.

Ethanolamine and glucosamine (GlcN) are alternative N-sources

Ethanolamine is derived from phospholipids and can be used as a nitrogen, carbon, and energy source in a cobalamin-dependent manner by several bacteria (Roof and Roth, 1988; Garsin, 2010; Srikumar and Fuchs, 2011; Staib and Fuchs, 2014). To investigate whether *L. monocytogenes* can also utilize ethanolamine as a N-source, EGD-e was grown in MM without Gln and glucose, but with 200 μM cobalamin as the cofactor for ethanolamine ammonia lyase EutBC, and with ethanolamine in concentrations varying from 4 to 82 mM. The medium was supplemented with 50 mM glycerol as the essential C-source. Glycerol results from the degradation of the ethanolamine-precursor phosphatidyl-ethanolamine, and at least two genes involved in ethanolamine utilization (*eutE* and *eutJ*) are induced in the presence of glycerol (Joseph *et al.*, 2008). A listerial growth rate comparable to that with 4.1 mM Gln or ammonium as N-source was observed in the presence of 30 mM ethanolamine (Fig.

5A), whereas concentrations above 50 mM impaired bacterial growth (data not shown). The prolonged lag phase in comparison with that in defined MM is due to the presence of glycerol instead of glucose as the C-source. When a mutant strain of EGD-e lacking *eutB* was grown in the same medium, a strongly impaired growth comparable to that of EGD-e in the absence of ethanolamine was observed, which demonstrates the role of ethanolamine ammonia lyase in degrading this N-source.

Then, isotopologue profiling of listerial amino acids was performed by hydrolysing cells grown in abovementioned modified MM containing 30 mM ^{15}N -ethanolamine. High ^{15}N -incorporation rates ranging from 30% (Val) to 66% (Glu) were observed in protein-derived amino acids (Fig. 5B), again with the exception of His and Arg (see above). The excess rates in each amino acid resembled those found in the experiment with $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ due to the release of ammonium during ethanolamine degradation. For the same reason, the M-2 label of Lys was higher with ^{15}N -ethanolamine or $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as N-sources than with the other nitrogenous substrates (Supporting Information Fig. S2D). The ^{15}N -incorporation rates into Val, Leu, and Ile were below average due to their presence in the MM, and highest in Glu because ethanolamine-derived ammonium is assimilated via glutamate dehydrogenase (GDH) to Glu. As expected, incorporation rates near zero were measured when control strain EGD-e Δ eutB was grown

322 E. Kutzner et al.

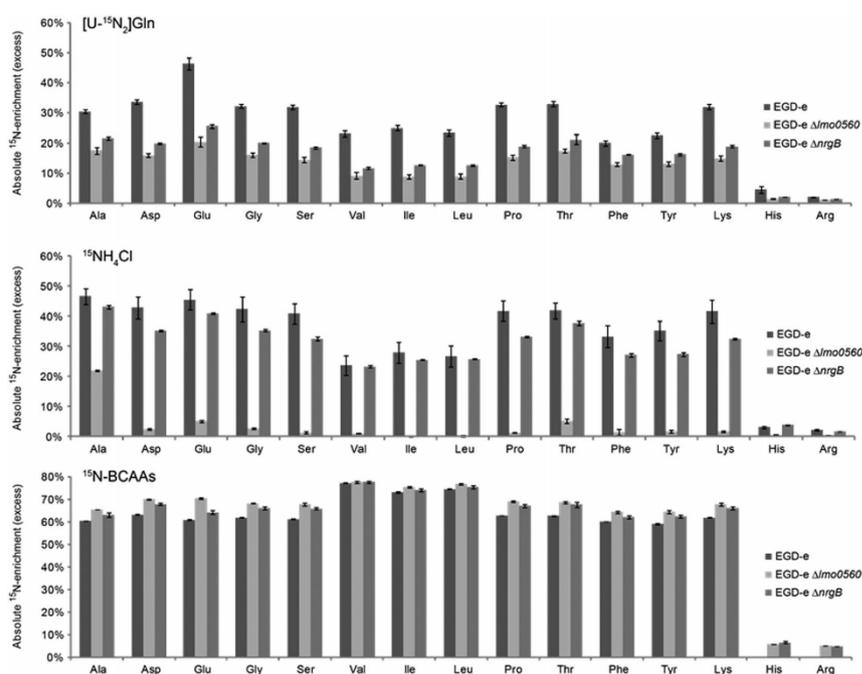


Fig. 6. Perturbation of N-fluxes in EGD-e deletion mutants. Growth of EGD-e, EGD-e Δ lmo0560 lacking GDH, and EGD-e Δ nrgB with a deletion of GlnK in the presence of $[U-^{15}N_2]$ Gln (top), $^{15}NH_4Cl$ (middle), or all three ^{15}N -BCAAs (bottom). Mean values including standard deviations of three biological replicates are shown. Mean values including standard deviations of three technical replicates are shown for experiments using $^{15}NH_4Cl$.

in MM modified as above (Fig. 5B). These data demonstrate that *L. monocytogenes* is indeed able to use ethanolamine as a N-source equivalent to Gln and ammonium for amino acid synthesis under the described conditions.

N-Acetylglucosamine has been reported to be a C-source for *L. monocytogenes* in the absence of glucose (Pine *et al.*, 1989, Premaratne *et al.*, 1991). To test whether GlcN can also serve as a major N-source for this pathogen, strain EGD-e was grown in MM containing 20 mM GlcN (Moye *et al.*, 2014), but lacking glucose, Gln and Arg. The wild type-like growth curve shown in Fig. 5A demonstrates that GlcN can indeed be substituted for Gln as N-source. In comparison with ^{15}N -ethanolamine as a N-source, the ^{15}N -incorporation rates into amino acids in the presence of ^{15}N -GlcN were significantly lower (Fig. 5B), probably due to the higher amount of N-atoms in 30 mM ethanolamine than in 20 mM GlcN. The isotopologue patterns of Lys and His resembled those observed in the experiment with ^{15}N -ethanolamine, whereas the pattern of Arg indicates its *de novo* biosynthesis due to the absence of this amino acid in the medium.

Perturbing N-fluxes by deleting *GlnR*, *GDH*, and *GlnK*

The repressor of the *glnRA* operon GlnR, the GDH and the regulator GlnK are central proteins in the N-metabolism. To investigate the effect of a *glnR* deletion on the N-fluxes in *L. monocytogenes*, EGD-e Δ *glnR* (Kaspar *et al.*, 2014) was cultivated in the presence of $[U-^{15}N_2]$ Gln and $^{15}NH_4Cl$. Amino acids from proteins isolated from this mutant did not show significant differences in their ^{15}N -excesses (data not shown). An explanation for this result is that the *glnRA* operon is expressed only in the absence of Gln, for example, in the presence of ammonium that, however, is assimilated via GDH. This is in line with the finding that a deletion of *glnR* has no effect on the transcription of *gdh* in the presence of Gln or ammonium (Kaspar *et al.*, 2014). The amino acids isolated from EGD-e Δ lmo0560, which lacks GDH, showed reduced ^{15}N -excesses after growth with $[U-^{15}N_2]$ Gln, but not with ^{15}N -BCAAs, and nearly no ^{15}N -incorporation when cells were grown with $^{15}NH_4Cl$ (Fig. 6). These data suggest a catabolic as well as anabolic function of listerial GDH in contrast to the *B. subtilis* GDH that is only

degrades glutamate (Gunka and Commichau, 2012). This assumption is further supported by the fact that a deletion of GDH results in severe growth defects of *B. subtilis* (Commichau *et al.*, 2007), but not of *L. monocytogenes* (data not shown). The mutant EGD-e $\Delta nrgB$ with a deletion of GlnK shows reduced incorporation with $[U-^{15}N_2]Gln$, but not with $^{15}NH_4Cl$ or ^{15}N -BCAAs (Fig. 6). This points to a role of listerial GlnK distinct from that in *E. coli* in which GlnK is assumed to regulate the ammonium transporter AmtB (Coutts *et al.*, 2002).

Discussion

Here, we adapted isotopologue profiling for analysing the N-metabolism of *L. monocytogenes* during growth under *in vitro* conditions. For this purpose, we substituted nearly all possible N-sources in a defined MM with ^{15}N -labeled substrates to track the ^{15}N -atoms during the metabolic conversion in *L. monocytogenes* (summarizing Fig. 7). Labeling experiments using $^{15}NH_4Cl$ and $[U-^{15}N_2]Gln$ resulted in a high ^{15}N -enrichment in all protein-derived amino acids under study and showed that ammonium as well as Gln were used as major N-sources with a significant preference for ammonium when it is present in the environment (Fig. 2A and B). In cytosolically replicating *L. monocytogenes*, genes for

ammonium use, as well as transporter genes *nrgAB*, are upregulated (Joseph *et al.*, 2006) and ammonium could therefore be an important N-source for *L. monocytogenes* during intracellular replication. This is also the case for other (enteric) bacteria as ammonium was shown to support the fastest cell growth rate, and because the utilization of other N-containing compounds is inhibited in the presence of ammonium (Reitzer, 1996; Fisher, 1999; Gunka and Commichau, 2012).

For the first time, we experimentally identified GlnK and ethanolamine as substantial N-sources for *L. monocytogenes*. Both are of special interest as they are ubiquitous in the gut (Martin *et al.*, 2009; Staib and Fuchs, 2014) and thus are potential N-sources during infection. GlnK is a component of carbohydrate side-chains in the intestinal mucin and is already known as a C-source for *L. monocytogenes* (Premaratne *et al.*, 1991) and for *B. subtilis* (Gaugue *et al.*, 2013). Ethanolamine has been assumed to contribute to the virulence properties of *L. monocytogenes* (Buchrieser *et al.*, 2003; Joseph and Goebel, 2007), and such a relevance of ethanolamine has indeed been demonstrated for *Salmonella enterica* and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (Bertin *et al.*, 2011; Thiennimitr *et al.*, 2011). By the activity of listerial phospholipases, ethanolamine might be derived from phosphatidyl-ethanolamine, a membrane lipid constituent in both mammalian and bacterial cell membranes.

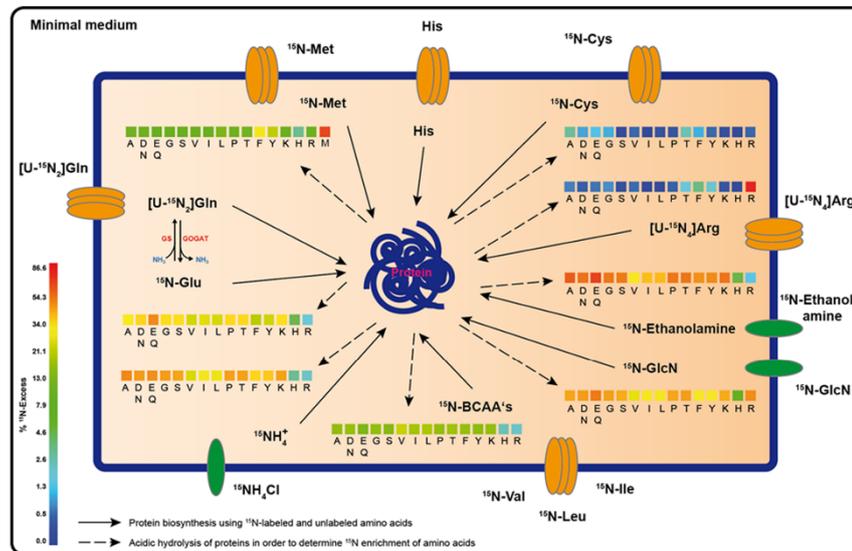


Fig. 7. N-sources of *L. monocytogenes* and their fate after uptake. Overview of the ^{15}N -fluxes in *L. monocytogenes* as determined by our experiments. The colored boxes show the ^{15}N -excess for each listerial amino acid analysed according to the color code in quasi-logarithmic form. For the BCAAs, the average data for the three experiments with ^{15}N -Val, ^{15}N -Ile, or ^{15}N -Leu are shown.

324 E. Kützner et al.

Although ethanolamine is a potential carbon source, its utilization by *L. monocytogenes* requires glycerol as demonstrated here (Fig. 5A). It should be noted that phospholipids might contribute to the proliferation of *L. monocytogenes* in various habitats including soil, decaying plant matter, food, and the host gut. The listerial genes *eutBC*, which encode the ethanolamine ammonia lyase subunits, are induced during growth in the intestine of a mouse infection model and during replication in mammalian cells (Joseph *et al.*, 2006; Toledo-Arana *et al.*, 2009).

BCAAs are major N-sources for *de novo* biosynthesis of listerial amino acids, and, surprisingly, the amino acid Met, albeit to a lower amount than Val, Ile, and Leu. In a former cell culture infection study using a ^{13}C -labeled mix of amino acids, the amino acids were ruled out as a major carbon substrate for *de novo* biosynthesis of listerial amino acids during intracellular replication (Grubmüller *et al.*, 2014). Instead, the ^{13}C -isotopologue profiles suggest that the majority of glycolytic and ketogenic amino acids are directly incorporated into listerial proteins under these conditions, probably due to a shortage of essential catabolic intermediates. The data obtained in our ^{15}N -study showed that also under *in vitro* conditions, at least the amino acids Arg and His are directly used for protein production due to a lack of enzymes responsible for their degradation. This is probably also the case for the two most important glycolytic amino acids Asp and Glu, as the absence of the enzyme oxoglutarate dehydrogenase prevents their degradation via the TCA cycle. In contrast, our data demonstrate the catabolism of further amino acids besides Gln, such as the BCAAs and Met, under the *in vitro* conditions applied here. As intracellular growth conditions are characterized by a shortage of sugars (Grubmüller *et al.*, 2014), it is appealing to speculate that the degradation of these amino acids also provides substrates for the carbon metabolism of *L. monocytogenes*.

An interesting finding was made when we analysed the isotopologue patterns of Arg from *L. monocytogenes* after growth in the presence of $[\text{U-}^{15}\text{N}_4]\text{Arg}$ (Supporting Information Fig. S2B). At low Gln concentrations, 40% of the Arg molecules were desaminated at the position next to the α -C-atom (and replaced by ^{14}N -atoms), whereas the N-atoms of the guanidinium side chain were not subject to catabolism, resulting in a 40% fraction of the (M + 3)-isotopomer. In the experiment using $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$, Arg molecules exhibit mainly an (M + 1)-isotopomer, confirming the specific exchange of the N-atom attached to the α -C-atom also when high amounts of an N-source are present (Supporting Information Fig. S2A). These findings indicate that Arg could, without being catabolized, serve as a N-donor for the synthesis of non-proteinaceous molecules such as

nucleotides or amino sugars. When *L. monocytogenes* was grown with $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ or $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ as the main N-source in the presence of unlabeled Arg, this amino acid was predominantly M + 1-labeled. This finding again suggests that following Arg uptake, only the N-atom at the position next to the α -carbon is subject to transamination, whereas the residual molecule body remains unaffected.

To summarize, *L. monocytogenes* is able to use multiple N-sources during growth in a defined MM and exhibits a high flexibility with respect to the simultaneous exploitation of alternative N-sources such as ethanolamine and GlcN. The relevance of the utilization of the latter substrates as N-sources by *L. monocytogenes* during infection, however, remains to be addressed (Buchrieser *et al.*, 2003; Kern *et al.*, 2015). Interestingly, the genes involved in ethanolamine utilization are upregulated during growth of *L. monocytogenes* in the intestinal tract of mice (Toledo-Arana *et al.*, 2009) and contribute to replication in Caco-2 cells (Joseph *et al.*, 2006). An unprecedented outcome of our study is that the BCAAs are both *de novo* biosynthesized and directly incorporated into listerial amino acids. This finding might be explained by the need for additional catabolic C-substrates such as succinyl-CoA and acetyl-CoA that are readily available from the BCAAs and thus contribute to the physiological equilibrium of a pathogen that lacks several metabolic genes and a complete TCA cycle. Evidence for the role of BCAA biosynthesis for the proliferation of pathogenic listeriae in epithelial cells and in blood has been provided (Joseph *et al.*, 2006; Toledo-Arana *et al.*, 2009). By the application of isotopologue profiling to the N-metabolism of *L. monocytogenes*, we shed further light on the pool of N-sources used by this pathogen, and the complex N-fluxes derived from their degradation. Our data also contributes to a better understanding of the highly flexible strategy that is used by a pathogen during infection of a host in order to exploit nitrogenous substrates under growth conditions where nitrogen sources are limited.

Experimental procedures

Growth and maintenance of bacteria

L. monocytogenes EGD-e (source: T. Chakraborty) used in this study was grown in flasks at 37°C and 180 rpm in brain heart infusion medium (BHI, Merck) or in a MWB MM (Premaratne *et al.*, 1991) containing 55.5 mM glucose, 218.1 mM disodium hydrogenphosphate, 48.2 mM potassium dihydrogenphosphate, 3.41 mM magnesium sulfate, 228 μM iron-III-citrate, 0.6 mg/l of Gln (4.1 mM), 0.1 mg/l of Leu, Ile, Val, Met, Arg, His, and Cys (corresponding to 0.76 mM Leu, 0.76 mM Ile, 0.85 mM Val, 0.67 mM Met, 0.57 mM Arg, 0.64 mM His, and 0.82 mM Cys), 1.33 μM

riboflavin, 3.32 μ M thiamin, 2.05 μ M biotin, and 24 pM thioctic acid. $^{15}\text{N}_2\text{Cl}$, ^{15}N -Leu, ^{15}N -Ile, ^{15}N -Val, and ^{15}N -Met were purchased from Cortecnet (Paris, France), $[\text{U}-^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$, $[\text{U}-^{15}\text{N}_4]\text{Arg}$, and ^{15}N -Cys from Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury), the mixture of amino acids (algal amino acid mixture- ^{15}N), ^{15}N -ethanolamine, ^{15}N -GlcN hydrochloride and ethanolamine from (Sigma-Aldrich, St. Louis), D(+)-GlcN hydrochloride from Carl Roth (Karlsruhe, Germany), and cyanocobalamin from AppliChem (Darmstadt, Germany). According to the manufacturer, the algal ^{15}N -amino acid mixture contained Asp (13.1%), Thr (6.9%), serine (Ser) (5.6%), Glu (9.9%), proline (Pro) (3.7%), glycine (Gly) (11.4%), Ala (15.6%), Val (7.0%), Met (1.3%), Ile (4.9%), Leu (8.8%), Tyr (1.6%), Phe (3.4%), His (0.7%), Lys (3.2%), and Arg (2.9%); all values are average relative mol%. Substances were added to the medium as a substitute for the corresponding unlabeled N-source, or as a supplement. Bacteria were grown to middle logarithmic phase (optical density at 600 nm $[\text{OD}_{600}] = 1.0$), killed with NaN_3 , washed three times with PBS, autoclaved and frozen at -20°C until further analysis. All growth experiments were conducted in biological triplicates.

Construction of mutant EGD-e Δ eutB

A non-polar, in-frame deletion of *eutB* was performed in the parental strain EGD-e as described recently (Joseph *et al.*, 2006; Schauer *et al.*, 2009). Briefly, two fragments of ~500 bp were amplified from chromosomal DNA of strain EGD-e using the oligonucleotide pairs *eutB_A* and *eutB_B* (5'-TTTAATAGAAAACGAGGTTATC-3' and 5'-GAAGATCTGTATGTATGGCCGAAT-3'), and *eutB_C* and *eutB_D* (5'-GAA-GATCTAGCCGTGCTGGAGATGCATCT-3' and 5'-CAATA TATGCGCCTGCTTCAA-3'), and were then ligated via the introduced BglII sites. Following nested PCR using the oligonucleotides *eutB_Ntd_AB* (5'-TAGGATCCGCGATTGCA-GAATCTAGTTTAATG-3') and *eutB_Ntd_CD* (5'-ATGAA TTCGATGTTAGCTTCAATCGCCGC-3') and the ligation mixture as a template, the resulting fragment was cloned into pLSV101 via BamHI and EcoRI. The resulting plasmid was then transformed into *L. monocytogenes* EGD-e by electroporation, and erythromycin-resistant bacteria growing at 43°C carrying the chromosomally integrated plasmid were selected. Cointegrates were resolved by reiterated growth at 30°C , and erythromycin-sensitive clones were screened by PCR to identify the *eutB* deletion mutant. The gene deletion was confirmed by sequencing. The mutants EGD-e Δ lmo0560 and EGD-e Δ nrpB were constructed in the same manner (Müller-Herbst, unpublished).

Isolation of amino acids

Amino acids were isolated from $\sim 10^9$ bacterial cells by dissolving the pellet in 500 μ l of 6M hydrochloric acid and hydrolysis at 105°C for 24 h. The hydrolysate was dried under a stream of nitrogen, desolved in 200 μ l glacial acetic acid and sonicated for 2 min. The resulting proteinogenic amino acids were purified using 300 μ l of a cation exchanger (7 \times 10 mm; Dowex 50W X8 200-400 mesh, 34–74 μm , H^+) and glass wool (10 mm) as a frit. Prior to

the application of the sample, the column was washed with 1 ml of methanol (70%) and 1 ml of H_2O . After applying the sample to the column it was rinsed twice with 1 ml of H_2O . The amino acids were eluted with 1 ml of 4M ammonium. An aliquot of 200 μ l of the eluate was dried under a stream of nitrogen and subsequently treated with 100 μ l of a mixture (1:1) of *N*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-*N*-methyl-trifluoroacetamide (TBDMS) containing 1% *tert*-butyldimethylsilylchloride and acetonitrile for 30 min at 70°C . The resulting *tert*-butyldimethylsilyl derivatives of amino acids were subjected to GC-MS.

The derivatisation of Arg requires a different procedure as the TBDMS derivative of Arg converts to ornithine (Leimer *et al.*, 1977; Halket *et al.*, 2005). The loss of two N-atoms is undesirably; thus, the derivatisation of Arg was accomplished by esterification of the carboxyl group and subsequent acylation of the amino groups with trifluoroacetic acid (TFA) anhydride at 140°C . The derivatisation of Arg was confirmed by GC-MS and led to three detectable fragments (Supporting Information Fig. S2 and Table S2). For this purpose, another aliquot of 500 μ l of the eluate was dried and subsequently treated with 200 μ l of 3 M methanolic hydrochloric acid for 30 min at 70°C . After removing the methanolic hydrochloric acid using a stream of nitrogen, 50 μ l of TFA (anhydrous) were added to the dry sample and incubated at 140°C for 10 min. The sample was dried under a stream of nitrogen, resolved in 200 μ l of ethyl acetate, and subjected to GC-MS.

GC-MS

The GC-MS measurements were performed on a GC 2010 Gas Chromatograph and a GCMS-QP 2010 Plus mass spectrometer coupled to a QP-5000 mass selective detector (Shimadzu, Duisburg, Germany) working with electron impact (EI) ionisation at 70 eV. The system was provided with the GCMSsolution Ver. 2 software. A Silica capillary column Equity TM-5 (film thickness: 30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) from Supelco Inc. (Bellefonte, PA) was used. An aliquot of amino acid derivatives was injected in 1:5 split mode at 260°C and a helium inlet pressure of 102.6 kPa (76.1 kPa for Arg). The interface temperature was 260°C and the helium column flow was 1.11 ml/min (1.19 ml/min for Arg). For amino acids analysis, the column was first developed at 150°C for 3 min and further with a temperature gradient of $7^\circ\text{C}/\text{min}$ to a final temperature of 280°C that was held for 3 min. For Arg the column was first developed at 70°C for 3 min and then with a temperature gradient of $10^\circ\text{C}/\text{min}$ to a final temperature of 200°C that was held for 3 min. Each sample was analysed three times to acquire selected ion monitoring data.

The relative intensities of the standards and the samples obtained from GC-MS analysis (peak integration) were calculated with an inhouse excel based software package according to (Braumann, 1966; Pickup and McPherson, 1976; Korzekwa *et al.*, 1990; Lee *et al.*, 1991.). For each amino acid, the fragment that occurred most frequently was used for the calculation of ^{15}N -enrichment.

Bioinformatic and metabolic analyses

The amino acid metabolic network was reconstructed based on the information from the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database (Ogata *et al.*, 1999; <http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>) and the latest annotation of *L. monocytogenes* EGD-e (GenBank accession number: NC_003210). Tools from the National Centre for Biotechnology Information database (including <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/and> and <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) were used to identify listerial amino acid transporters.

Acknowledgements

The authors thank Stefanie Müller-Herbst and Jakob Schardt for the gift of mutants and the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) for financial support of this study (FU375/7-1, FU375/7-2, EI384/6-1, and EI384/6-2).

References

- Atkinson, M.R., and Fisher, S.H. (1991) Identification of genes and gene products whose expression is activated during nitrogen-limited growth in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 23–27.
- Bertin, Y., Girardeau, J.P., Chaucheyras-Durand, F., Lyan, B., Pujos-Guillot, E., Harel, J., and Martin, C. (2011) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* gains a competitive advantage by using ethanolamine as a nitrogen source in the bovine intestinal content. *Environ Microbiol* **13**: 365–377.
- Borezee, E., Pellegrini, E., and Berche, P. (2000) OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect Immun* **68**: 7069–7077.
- Braumann, J.I. (1966) Least squares analysis and simplification of multi-isotope mass spectra. *Anal Chem* **38**: 607–610.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., and Glaser, P. (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 207–213.
- Commichau, F.M., Wacker, I., Schleider, J., Blencke, H.M., Reif, I., Tripal, P., and Stülke, J. (2007) Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**: 106–113.
- Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D., and Merrick, M. (2002) Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* **21**: 536–545.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., and Goebel, W. (2010) Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol* **8**: 401–412.
- Eisenreich, W., Slaghuys, J., Laupitz, R., Bussemer, J., Stritzker, J., Schwarz, C., *et al.* (2006) ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2040–2045.
- Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W. (2008) Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol* **69**: 1008–1017.
- Fisher, S.H. (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol Microbiol* **32**: 223–232.
- Friedman, M.E., and Roesler, W.G. (1961) Growth of *Listeria monocytogenes* in defined media. *J Bacteriol* **82**: 528–533.
- Fuchs, T.M., Eisenreich, W., Kern, T., and Dandekar, T. (2012) Towards a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection. *Front Microb Immunol* **3**: 137–143.
- Garsin, D.A. (2010) Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nat Rev Microbiol* **8**: 290–295.
- Gaugue, I., Oberto, J., Putzer, H., and Plumbridge, J. (2013) The use of amino sugars by *Bacillus subtilis*: presence of a unique operon for the catabolism of glucosamine. *PLoS One* **8**: e63025.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., *et al.* (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849–852.
- Grubmüller, S., Schauer, K., Goebel, W., Fuchs, T.M., and Eisenreich, W. (2014) Analysis of carbon substrates used by *Listeria monocytogenes* during growth in J774A.1 macrophages suggests a bipartite intracellular metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 1–14.
- Gunka, K., and Commichau, F.M. (2012) Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Mol Microbiol* **85**: 213–224.
- Halket, J.M., Waterman, D., Przyborowska, A.M., Patel, R.K., Fraser, P.D., and Bramley, P.M. (2005) Chemical derivatization and mass spectral libraries in metabolic profiling by GC/MS and LC/MS/MS. *J Exp Bot* **56**: 219–243.
- Joseph, B., and Goebel, W. (2007) Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* **9**: 1188–1195.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schar, J., Umeha, K.R., Luo, Q., *et al.* (2008) Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **190**: 5412–5430.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuys, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W. (2006) Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* **188**: 556–568.
- Kaspar, D., Auer, F., Schardt, J., Schindele, F., Ospina, A., Held, C., *et al.* (2014) Temperature- and nitrogen source-dependent regulation of GlnR target genes in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **355**: 131–141.
- Kern, T., Kutzner, E., Eisenreich, W., and Fuchs, T.M. (in press) Pathogen-nematode interaction: Nitrogen supply

- of *Listeria monocytogenes* during growth in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol Rep* 2015 Oct 19. doi: 10.1111/1758-2229.12344. [Epub ahead of print].
- Klarsfeld, A. D., Goossens, P. L., and Cossart, P. (1994). Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol* 13: 585–597.
- Korzekwa, K., Howald, W.N., and Traeger, W.F. (1990) The use of Braumańs least squares approach for the quantification of deuterated chlorophenols. *Biomed Environ Mass Spectrom* 19: 211–217.
- Lee, W.N., Byerley, L.O., Bergner, E.A., and Edmond, J. (1991) Mass isotopomer analysis: theoretical and practical considerations. *Biol Mass Spectrom* 20: 451–458.
- Leimer, K.R., Rice, R.H., and Gehrke, C.W. (1977) Complete mass spectra of N-trifluoroacetyl-n-butyl esters of amino acids. *J Chromatogr* 141: 121–144.
- Martin, F.P., Wang, Y., Yap, I.K., Sprenger, N., Lindon, J.C., Rezzi, S., et al. (2009) Topographical variation in murine intestinal metabolic profiles in relation to microbiome speciation and functional ecological activity. *J Proteome Res* 8: 3464–3474.
- Moye, Z. D., Burne, R. A., and Zeng, L. (2014). Uptake and metabolism of N-acetylglucosamine and glucosamine by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 80: 5053–5067.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H., and Kanehisa, M. (1999) KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 29–34.
- Phan-Thanh, L., and Gormon, T. (1997) A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *Int J Food Microbiol* 35: 91–95.
- Pickup, J.F., and McPherson, K. (1976) Theoretical considerations in stable isotope dilution mass spectrometry for organic analysis. *Anal Chem* 48: 1885–1890.
- Pine, L., Malcolm, G.B., Brooks, J.B., and Daneshvar, M.J. (1989) Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol* 35: 245–254.
- Premaratne, R.J., Lin, W.J., and Johnson, E.A. (1991) Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 57: 3046–3048.
- Reitzer, L.J. (1996) Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, asparagine, L-alanine, and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C., Curtiss, III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., et al. (eds). Society for Microbiology (ASM) Press, Washington, DC, pp. 391–407.
- Roof, D.M., and Roth, J.R. (1988) Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 170: 3855–3863.
- Schauer, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T., and Fuchs, T.M. (2010) Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* 11: 573.
- Schauer, K., Stolz, J., Scherer, S., and Fuchs, T.M. (2009) Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 191: 2218–2227.
- Schneebeli, R., and Egli, T. (2013) A defined, glucose-limited mineral medium for the cultivation of *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol* 79: 2503–2511.
- Siddiqi, R., and Khan, M.A. (1982) Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 253: 225–235.
- Srikumar, S., and Fuchs, T.M. (2011) Ethanolamine utilization contributes to proliferation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in food and in nematodes. *Appl Environ Microbiol* 77: 281–290.
- Staub, L., and Fuchs, T.M. (2014) From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology* 160: 1020–1039.
- Thiennimitr, P., Winter, S.E., Winter, M.G., Xavier, M.N., Tolstikov, V., Huseby, D.L., et al. (2011) Intestinal inflammation allows *Salmonella* to use ethanolamine to compete with the microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 17480–17485.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., et al. (2009) The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459: 950–956.
- Tsai, H.N., and Hodgson, D.A. (2003) Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* 69: 6943–6945.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., et al. (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* 14: 584–640.
- Welshimer, H.J. (1963) Vitamin Requirements of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* 85: 1156–1159.

Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

Fig. S1

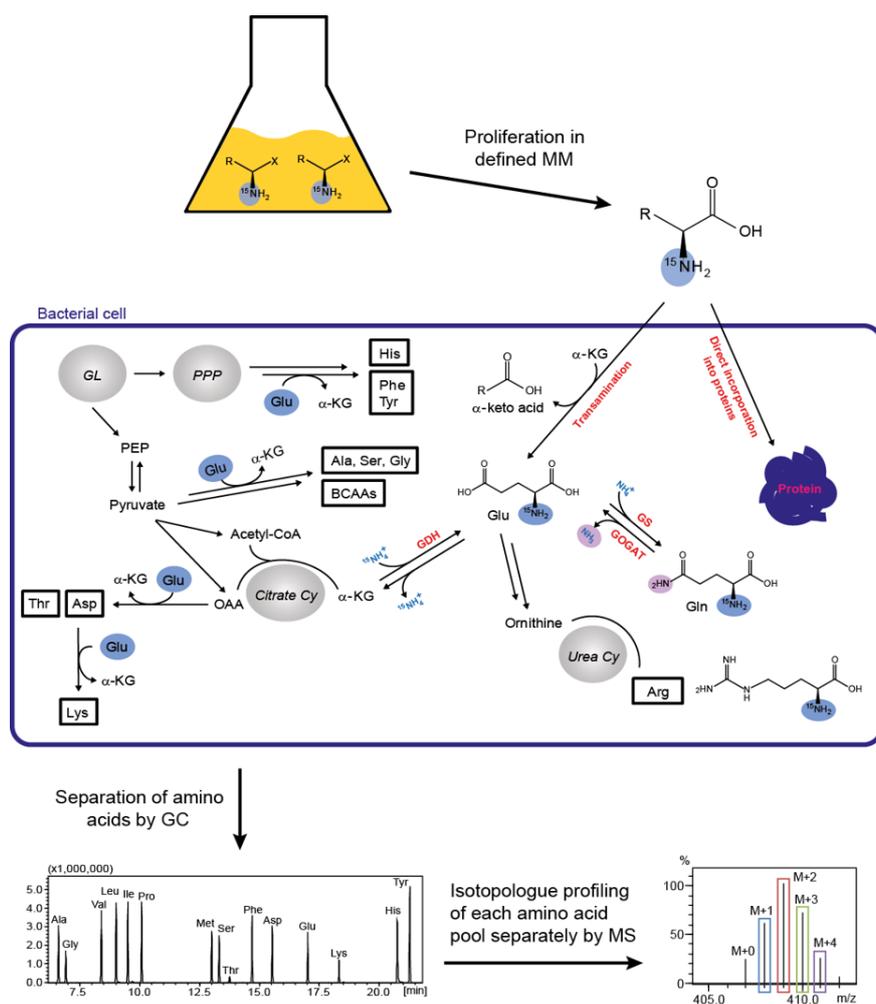
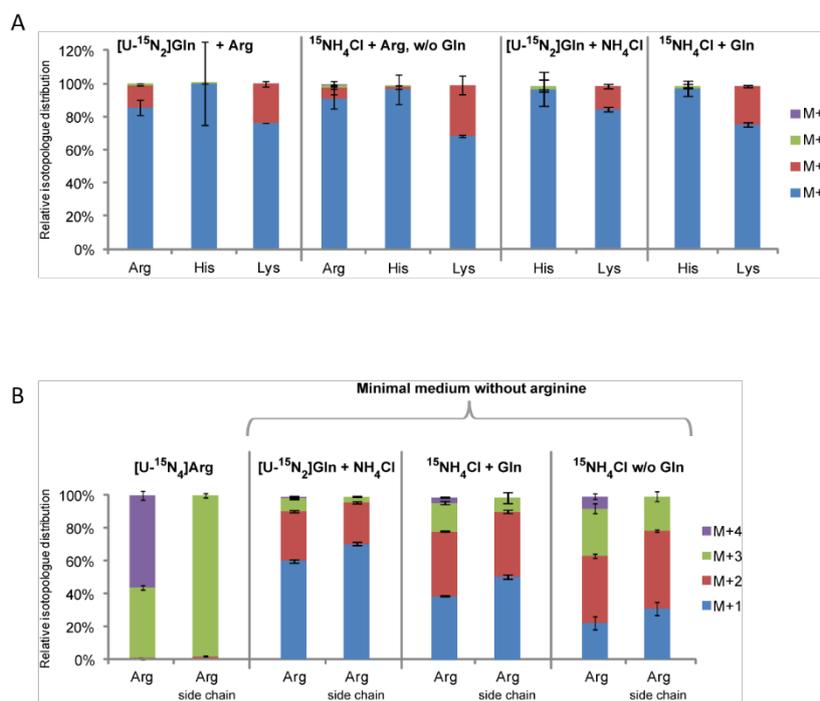


Fig. S2



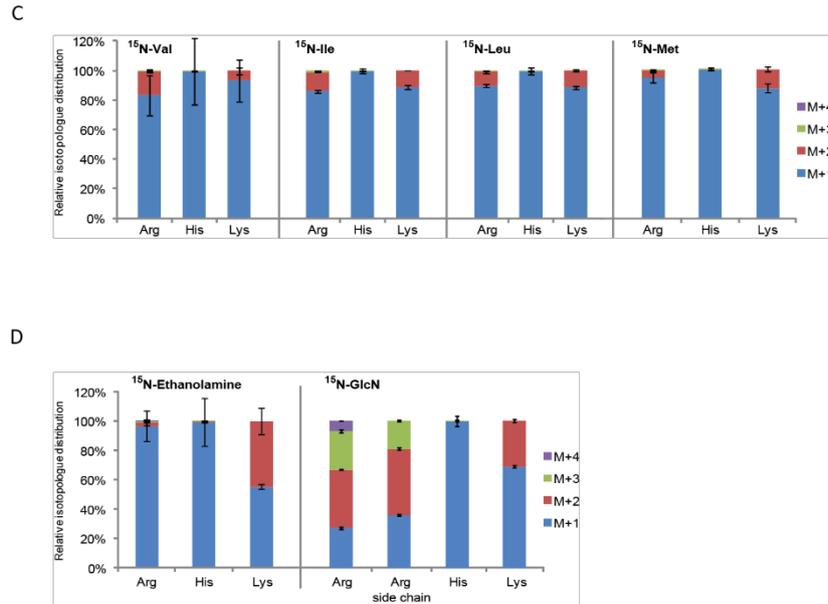


Fig. S3

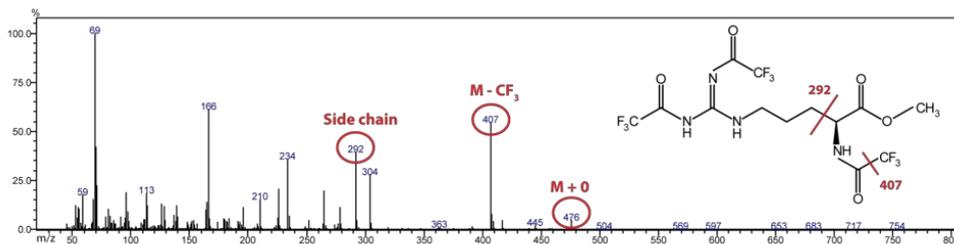


Fig. S1. *Isotopologue profiling* is based on the use of stable isotopes which can be distinguished by mass spectrometry. Natural organic matter comprises all stable isotopes of carbon (^{12}C and ^{13}C), hydrogen (^1H and ^2H), nitrogen (^{14}N and ^{15}N), and oxygen (^{16}O , ^{17}O , and ^{18}O). However, the heavier isotopes are relatively rare in nature, e.g., the heavy isotope ^{15}N accounts for only 0.366%. (A) To perform ^{15}N -isotopologue profiling, *L. monocytogenes* was cultivated in a defined MM containing a precursor enriched with the heavier isotope (e.g. an amino acid consisting of only ^{15}N -atoms). (B) Listerial cells actively metabolize the labeled compound and incorporate the ^{15}N -atoms into multiple biosynthetic products. Their specific isotopologue compositions reflect the metabolic routes and fluxes from the precursor to the amino acids. Abbreviations: α -KG, α -ketoglutarate; P, phosphate; R, residue; PEP, phosphoenolpyruvate; OAA, oxaloacetic acid; CoA, coenzyme A; GS, glutamine synthetase encoded by *glnA*; and GOGAT, glutamine oxoglutarate aminotransferase (glutamate synthase) encoded by *gltD*. (C) After growth, the amino acids are obtained from the pellets of listerial cells by acidic hydrolysis. Under these conditions, Trp, Met and Cys were degraded, and Asn and Gln were hydrolysed to Asp and glutamate (Glu), respectively. Consequently, Trp, Met and Cys could not be analysed by GC-MS, and the reported ^{15}N -enrichments of Asp and Glu represented the averaged values of Asp/Asn and Glu/Gln, respectively. However, solid data was obtained for the other amino acids and some of their fragments from the mass spectra (**Table S3**).

Fig. S2. Isotopologue patterns of the amino acids Arg, His and Lys isolated from *L. monocytogenes* with different ^{15}N -substrates. $M + (1-4)$ represents the portion of all labeled molecules carrying one to four ^{15}N -atom. The ionization process of His and Arg led to fragments consisting of the imidazole and guanidinium side chains only, whereas the ionization of Lys did not yield any fragments with only one N-atom (**Table S4**). These fragments can provide information about the location of a ^{15}N -atom within a molecule and thus about the underlying enzymatic reactions responsible when a ^{15}N -atom is incorporated at a defined position. (A) Cells were grown in MM with Arg and in the presence of $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ or $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$; or in MM without Arg and in the presence of $[\text{U-}^{15}\text{N}_2]\text{Gln}$ and unlabeled NH_4Cl , or in MM without Arg and in the presence of unlabeled Gln and $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$. (B) Isotopologue profiles of Arg and its guanidinium side chain derived from listerial proteins after the cells were grown in MM containing $[\text{U-}^{15}\text{N}_4]\text{Arg}$, or in MM without Arg and with N-sources as indicated. (C) *L. monocytogenes* was grown in MM in which each BCAA and Met were subsequently substituted with its ^{15}N -isotope. (D) Isotopologue patterns of *L. monocytogenes* amino acids after growth with ^{15}N -ethanolamine or with ^{15}N -GlcN. The columns indicate the relative percentage of the ^{15}N -isotopologues carrying up to four labeled N-atoms ($M + 1$ to $M + 4$). The mean values of three biological replicates are shown.

Fig. S3: Mass spectrum of Arg derivatised with methanolic hydrochloric acid and trifluoroacetic acid. Fragments derived from Arg during ionization with m/z 476 (M , no fragmentation of Arg) and 407 comprise all four N-atoms whereas the fragment with m/z 292 comprises only the amino acid side chain harboring the guanidinium group.

Table S1. Amino acid, ammonium and peptide transporters of *Listeria monocytogenes* EGD-e.

Gene no./ accession no.	Gene name	Protein size [AA]	Protein name	Putative Substrate*	Similar to protein/organism/ NCBI Ref. Seq. or GenBank No.
Imo0787 NP_464314.1		458	AA transporter	Ala, Gly, Ser	D-Ala/D-Ser/Gly permease KHS59211.1 (LMO)
Imo2250 NP_465774.1	<i>arpJ</i>	486	AA ABC transporter permease	Arg, His, Glu, Gln	Glu ABC transporter permease WP_010989934.1 (LMO) His/Glu/Gln/Arg/opine ABC transporter permease EFR83728.1 (LMO FSL F2-208)
Imo1740 NP_465265.1	<i>artQ</i>	213	amino acid ABC transporter permease	Arg, polar AAs	polar AA ABC transporter permease WP_031627837.1 (LMO) Arg transport system permease protein ArtQ EFR90430.1 (<i>L. innocua</i> FSL S4-378)
Imo2716 NP_466238.1	<i>cydC</i>	574	ABC transporter	Cys	Cys ABC transporter ATP-binding protein YP_008295288.1 (LMO) ATP-binding/permease CydC WP_031672058.1 (LMO)
Imo2348 NP_465871.1		238	AA ABC transporter permease	Cys	Cys ABC transporter permease Ail68687.1 (LMO)
Imo2347 NP_465870.1		235	AA ABC transporter permease	Cys	Cys ABC transporter permease WP_004564597.1 (LMO)
Imo0448 NP_463977.1		483	AA antiporter	Glu	Glu: γ -aminobutyrate antiporter Ail67743.1 (LMO)
Imo2362 NP_465885.1		507	AA antiporter	Glu	Glu: γ -aminobutyrate antiporter KEV40802.1 (LMO)
Imo0847 NP_464373.1		480	Gln ABC transporter	Gln	
Imo1422 NP_464947.1		504	Gly/betaine ABC transporter permease	Gly	
Imo1425 NP_464950.1	<i>opuC D</i>	223	Gly/betaine ABC transporter permease	Gly, Pro	Gly betaine/L-Pro ABC transporter permease YP_014042 (LMO serotype 4b str. F2365)

Imo1427 NP_464952.1	<i>opuC B</i>	218	Gly/betaine ABC transporter permease	Gly	
Imo2092 NP_465616.1	<i>betL</i>	507	Gly betaine transporter	Gly	
Imo1015 NP_464540.1	<i>gbuB</i>	282	Gly/betaine ABC transporter permease	Gly, Pro	
Imo1390 NP_464915.1		350	ABC transporter permease	Ile, Leu, Val	BCAA ABC transporter permease WP_003723915.1 (LMO)
Imo1442 NP_464967.1		235	transporter	Ile, Leu, Val	BCAA permease WP_003732337.1 (LMO)
Imo0798 NP_464325.1		486	lysine-specific permease	Lys	
Imo0283 NP_463814.1	<i>metI</i>	220	ABC transporter permease	Met	D-Met transport system permease protein MetI EFR85934.1 (LMO FSL F2-208)
Imo2418 NP_465941.1		224	ABC transporter permease	Met	Met ABC transporter permease Ail68621.1 (LMO)
Imo2469 NP_465992.1	<i>yfnA</i>	463	AA transporter	AAs	putative AA permease YfnA EXL27023.1 (LMO Lm_1889)
Imo0645 NP_464172.1		463	AA transporter	AAs	
Imo0037 NP_463570.1		461	AA transporter	AAs	
Imo2130 NP_465654.1		607	hypothetical protein	AAs	AA permease WP_003731925.1 (LMO)
Imo1516 NP_465041.1	<i>nrgA</i>	401	ammonium transporter NrgA	ammonium	
Imo2194 NP_465718.1		344	peptide ABC transporter permease	peptides	
Imo2195 NP_465719.1	<i>oppB</i>	309	peptide ABC transporter permease	peptides	transmembrane protein OppB AAF73091.1 (LMO)

Imo0136 NP_463669.1	<i>appB</i>	316	peptide ABC transporter permease	oligopeptides	oligopeptide ABC transporter, permease protein AppB EFR86155.1 (LMO FSL F2-208)
Imo0137 NP_463670.1		297	peptide ABC transporter permease	oligopeptides	oligopeptide ABC transporter, permease protein AppC EFR89120.1 (<i>L. marthii</i> FSL S4-120)

This table was generated using data from the National Centre for Biotechnology information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Bioinformatic sequence analysis was performed as described in the experimental procedures section. Similarity and query cover of similar proteins was 96 – 100 %. LMO, *L. monocytogenes*; AA, amino acid. *derived from NCBI or protein homology.

Table S2. GC-MS analysis of a standard solution of [U-¹⁵N₄]Arg (98 atom-%; Sigma-Aldrich).

		¹⁵ N-Excess *	S.D.
Isotopologue profiles			
Arg-292	M+0	0.12%	0.02%
	M+1	0.22%	0.01%
	M+2	1.63%	0.00%
	M+3	96.31%	0.02%
Arg-407	M+0	0.09%	0.02%
	M+1	0.01%	0.00%
	M+2	0.05%	0.00%
	M+3	2.38%	0.01%
	M+4	94.19%	0.03%
Arg-476	M+0	0.11%	0.00%
	M+1	0.03%	0.05%
	M+2	0.10%	0.01%
	M+3	2.50%	0.04%
	M+4	95.05%	0.29%
Absolute ¹⁵ N enrichment			
Arg-292		97.46%	0.02%
Arg-407		96.01%	0.02%
Arg-476		97.23%	0.00%

* Mean value of three measurements.

Table S3. List of all identifiable mass fragments for all detectable amino acids.

Amino acid	Retention time [min]	Fragment (m/z) used for analysis	Further mass fragments (m/z)
Ala	6.5	260	158, 232
Gly	6.8	246	218
Val	8.2	288	186, 260, 302
Leu	8.9	274	200, 302, 344
Ile	9.3	274	200, 302, 344
Pro	9.9	286	184, 258
Met	12.8	320	218, 292
Ser	13.2	390	288, 302, 362
Thr	13.6	404	159, 376
Phe	14.5	336	234, 302, 308
Asp (Asp+Asn)	15.4	418	302, 316, 390
Glu (Glu+Gln)	16.9	432	272, 330, 404
Lys	18.2	431	329
His	20.5	440	338
His side chain	20.5	196	
Tyr	21.1	466	302, 364, 438
Arg	17.0	407	476
Arg side chain	17.0	292	

Table S4. GC-MS analysis of an algal amino acid mixture-¹⁵N.

		¹⁵ N-Excess *	S.D.
Absolute ¹⁵N enrichment			
Ala		98.68%	0.61%
Asp		99.00%	0.17%
Glu		97.99%	0.04%
Gly		98.22%	0.23%
Ser		97.04%	0.26%
Val		98.68%	0.10%
Ile		99.02%	0.03%
Leu		99.97%	0.05%
Pro		99.01%	0.06%
Thr		97.92%	0.15%
Phe		98.65%	0.26%
Tyr		97.57%	0.50%
Lys		97.45%	0.31%
His		97.12%	0.29%
Arg		95.73%	0.09%
Isotopologue profiles			
Lys	M+1	1.06 %	0.16 %
	M+2	96.92 %	0.33 %
His	M+1	0.33 %	0.08 %
	M+2	1.79 %	0.03 %
	M+3	95.96 %	0.32 %
His side chain	M+1	6.49 %	0.21 %
	M+2	92.26 %	0.20 %
Arg	M+1	0.01 %	0.01 %
	M+2	0.08 %	0.00 %
	M+3	3.25 %	0.02 %
	M+4	93.26 %	0.08 %
Arg side chain	M+1	0.53 %	0.06 %
	M+2	1.78 %	0.05 %
	M+3	95.64 %	0.17 %

* Mean value of three measurements.

2.2 Untersuchung von N-Flüssen zwischen *L. monocytogenes* und *C. elegans* (Teil 2)

2.2.1 Etablierung von *C. elegans* als Modellorganismus

C. elegans hat eine kurze Generationszeit von zwei bis vier Tagen. Ein einzelner, adulter Hermaphrodit produziert durch Selbstbefruchtung ca. 300 Nachkommen während seiner Lebensspanne von zwei bis drei Wochen (Corsi *et al.*, 2015). Für Untersuchungen an einzelnen Würmern, die sich über mehrere Tage strecken, muss deshalb die Unterscheidung von der nachfolgenden Generation sichergestellt werden. Die Ergebnisse könnten sonst durch Nematoden verfälscht werden, die beispielsweise nicht, wie die Ausgangspopulation, infiziert oder markiert sind. Diese Trennung erfolgt z.B. durch tägliches Umsetzen der einzelnen erwachsenen Nematoden auf frische NGM-Platten (Wachstumsmedium für Nematoden), was jedoch bei Experimenten in größeren Maßstäben nicht mehr durchführbar ist. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die adulten, schwereren Würmer in Flüssigkeit zu sedimentieren und den Nachwuchs mit dem Überstand zu entfernen, was allerdings keine zufriedenstellende, vollständige Trennung lieferte. Um die Produktion der Nachkommen gleich vorab zu unterbinden, ist die Verwendung von 5'-Fluoro-2'-Deoxyuridin (FUDR) möglich. Dieser Antimetabolit inhibiert die DNS-Replikation durch Hemmung der Thymidylat-Synthase, welches wiederum die Vermehrung der Würmer verhindert, hat dabei jedoch keinen Einfluss auf deren Lebensspanne oder Physiologie (Mitchell *et al.*, 1979). FUDR wurde bereits in vielen Arbeiten mit *C. elegans* zur Populationskontrolle eingesetzt (Mitchell *et al.*, 1979; Gandhi *et al.*, 1980; Wu *et al.*, 2009; Yen und Mobbs, 2010). Zur Untersuchung der Eignung dieser Substanz für die nachfolgenden Experimente mit *C. elegans*, wurden Würmer mit *L. monocytogenes* infiziert und anschließend auf NGM-Platten mit dem Futterstamm *E. coli* OP50 transferiert, die 10 µM FUDR enthielten. Nach einer Proliferationsperiode von fünf Tagen wurden die Würmer lysiert und die isolierten Bakterienkolonien ausgezählt. Es stellte sich heraus, dass bei Verwendung von FUDR dreimal weniger Listerien isoliert werden konnten als von Würmern, die auf unbehandelten Platten kultiviert wurden (Abb. S1 in Kern *et al.*, 2016). FUDR scheint somit nicht nur die Proliferation der Nematoden zu beeinflussen, sondern ebenso die von *L. monocytogenes* und eignet sich somit nicht für Pathogenitätsstudien dieser Art. Obwohl die Substanz keinen Effekt auf *C. elegans*-Würmer des Wildtyps N2 zu haben scheint, konnte eine Veränderung der Lebensspanne bei *tub-1* Mutanten beobachtet werden (Aitlhadj und Stürzenbaum, 2010), weswegen FUDR auch für Studien mit *C. elegans*-Mutanten nicht geeignet zu sein scheint.

Für weiterführende Versuche wurde der temperatursensitive Nematodenstamm JK509 ausgewählt (Tab. 1 in Kern *et al.*, 2016). Diese Mutante trägt ein defektes *glp-1* Gen und vermehrt sich nur bei Temperaturen von 15 °C normal. Bei Kultivierung bei 25 °C führt diese Mutation jedoch zur Sterilität der Würmer (Austin und Kimble, 1987), was für die Infektionsversuche, die bei 25 °C durchgeführt werden, ideale Bedingungen darstellt.

2.2.2 *L. monocytogenes* ist nicht pathogen für *C. elegans* aber vermehrt sich in dessen Intestinaltrakt

Aufgrund der kontroversen Datenlage bezüglich der Pathogenität von *L. monocytogenes* gegenüber *C. elegans* wurde die Lebensspanne der Würmer nach Exposition mit *Listeria* untersucht. Hierfür wurden Nematoden im L4-Stadium für vier Stunden mit *L. monocytogenes* EGD-e infiziert und anschließend auf die herkömmliche Futterquelle *E. coli* OP50 zurücktransferiert. Das Überleben wurde im Vergleich zu nicht-infizierten Würmern dokumentiert (Abb. 1 in Kern *et al.*, 2016). Beim wildtypischen Stamm N2 unterschied sich die Lebensspanne der infizierten Würmer ($TD_{50} = 12$ d) nicht signifikant von der in der Kontrollgruppe ($TD_{50} = 11$ d; $P = 0,9032$). Bei der Mutante JK509 konnte ebenso kein Unterschied zwischen der infizierten Gruppe ($TD_{50} = 9$ d) und der Kontrolle ($TD_{50} = 9$ d; $P = 0,1424$) festgestellt werden. *L. monocytogenes* ist somit unter diesen Bedingungen nicht pathogen für *C. elegans*, da keinerlei Auswirkungen auf die Lebensspanne der Würmer zu beobachten war.

Versuche zur Interaktion von Nematoden mit Bakterien wurden bisher überwiegend mit Dauerinfektionen durchgeführt. Dazu werden die Würmer nicht nur über einige Stunden infiziert und dann auf die reguläre Futterquelle zurückgesetzt, sondern über die komplette Lebensspanne hinweg dem zu untersuchenden Stamm ausgesetzt (Tan *et al.*, 1999; Garsin *et al.*, 2001; Couillault und Ewbank, 2002; Oza *et al.*, 2005; Begun *et al.*, 2007). *L. monocytogenes* zeigte jedoch auch bei einer Dauerinfektion keine Pathogenität gegenüber *C. elegans* N2, da sich auch hier die Lebensspanne beider Gruppen nicht voneinander unterschied ($TD_{50} = 10$ d; $P = 0,2109$). Bei diesem Versuch wurde der *L. monocytogenes*-Stamm EGD-e/pHPS9 verwendet, da dieser ein Plasmid mit einer Erythromycin-Resistenz trägt, um das Wachstum von *E. coli* OP50 zu verhindern und die Futterquelle somit auf *L. monocytogenes* zu beschränken. In den Untersuchungen zur Interaktion von *C. elegans* mit planktonischen oder sessilen Listerien nutzten Guha *et al.* (2013) FUDR bei einer Dauerinfektion mit Listerien, bei der sie einen verlängerten Lebenszyklus messen konnten. Dieses Ergebnis ist jedoch in Frage zu stellen, da gezeigt werden konnte, dass FUDR die Vermehrung der Listerien im Nematodendarm negativ beeinflusst (s. Abschnitt 2.2.1, S. 75).

Zum Nachweis der Proliferation von *L. monocytogenes* in *C. elegans* JK509 wurden die Würmer wiederum für vier Stunden infiziert und anschließend auf NGM-Platten mit *E. coli* OP50 transferiert. Über fünf Tage hinweg wurden täglich Nematoden aufgeschlossen und das Lysat auf Selektivagar kultiviert, um die CFU der Listerien zu bestimmen (Abb. 2 in Kern *et al.*, 2016). Nach einem anfänglichen Rückgang der CFU von $5,69 \times 10^4$ auf $9,16 \times 10^2$ nach einem Tag stieg die Bakterienzahl täglich an und erreichte ein Maximum von $2,09 \times 10^5$ CFU/Wurm nach fünf Tagen. Dies zeigt deutlich, dass *L. monocytogenes* sich nach erfolgter Infektion effektiv im Darm von *C. elegans* vermehren kann. Der Versuch wurde zur Kontrolle auch mit dem wildtypischen Stamm *C. elegans* N2 durchgeführt, wobei die Vermehrung im Wurm bestätigt werden konnte (Abbildung 15).

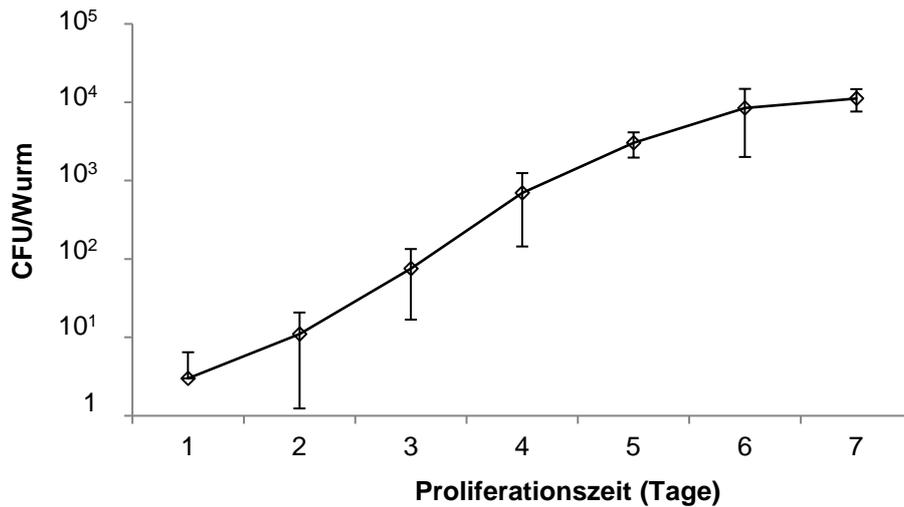


Abbildung 15: Proliferation von *L. monocytogenes* EGD-e in *C. elegans* N2.

Die koloniebildenden Einheiten (CFU) steigen über einen Zeitraum von 7 Tagen auf $1,12 \times 10^4$ an. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei biologischen Replikaten.

Auch durch die Verwendung eines Listerienstammes, der das grün fluoreszierende Protein (GFP) exprimiert, konnte die Proliferation der Bakterien im Wurmarm noch weiter untermauert werden (Abb. 3 in Kern *et al.*, 2016). In den mikroskopischen Bildern zeigte sich, dass sich die Listerien vornehmlich in der Pharynx- und Anusregion im Darm der Würmer konzentrierten und nicht gleichmäßig im Darm verteilt waren, was auch bereits bei anderen Bakterien wie Yersinien beobachtet werden konnte (Spanier *et al.*, 2010). Es befanden sich weiterhin keine Bakterien außerhalb des Intestinaltraktes der Würmer, was die Ergebnisse aus einer vorherigen Studie bestätigt, dass *L. monocytogenes* während einer Infektion von *C. elegans* zu keiner intrazellulären Replikation übergeht (Thomsen *et al.*, 2006).

Internaline wie InlA, InlB, InlC oder InlGHE spielen eine Rolle bei der listeriellen Virulenz in Mausmodellen (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1995; Raffelsbauer *et al.*, 1998; Gouin *et al.*, 2010) und für drei Gene, die solche Internaline codieren (InlA, InlB, InlE), konnte auch eine Expression bei Umwelttemperaturen nachgewiesen werden (Neuhaus *et al.*, 2013). Um einen potentiellen Einfluss der Internaline auf die Proliferation in *C. elegans* zu untersuchen, wurden die Würmer mit mehreren Mutanten infiziert und die Anzahl der daraus isolierten Listerien mit der des Wildtyps EGD-e verglichen (Abb. S3 in Kern *et al.*, 2016). Dabei konnte keine Attenuierung der Mutanten festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass listerielle Internaline bei der Infektion in *C. elegans* keine Rolle zu spielen scheinen. Ein Grund dafür könnte die fehlende intrazelluläre Phase der Listerien sein, jedoch sind Internaline scheinbar nicht rein für die Adhäsion und Zellinvasion wichtig, da beispielsweise Internalin C eine Rolle bei der Immunabwehr zugeschrieben werden konnte (Gouin *et al.*, 2010). Das genaue Zusammenspiel dieser Oberflächenproteine ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Weiterhin ist nicht auszuschließen, dass andere Internaline, als die hier untersuchten, für die Interaktion mit *C. elegans* möglicherweise relevant sein könnten. Bei vielen der anderen bakteriellen Pathogene

mit klinischer Relevanz, die zu intrazellulärer Replikation fähig sind, wie beispielsweise *Yersinia* spp. oder *Salmonella* spp., konnte diese auch bei der Infektion von *C. elegans* nicht nachgewiesen werden (Darby, 2005). Möglicherweise mangelt es den Darmepithelzellen der Würmer an für eine erfolgreiche Invasion der Bakterien wichtigen Faktoren, wie beispielsweise bestimmten Oberflächenantigenen, die für den Zelleintritt der Bakterien notwendig sind. Diese Tatsache beschränkt die Verwendung von *C. elegans* als *in vivo*-Infektionsmodell auf bestimmte Aspekte in der Virulenzforschung. Thomsen *et al.* (2006) etablierten *C. elegans* als ein solches Modell für Listerien und berichteten von einer Akkumulation von *L. monocytogenes* im Wurm nach Infektion und dessen vorzeitigem Tod sowie der Attenuierung von *prfA* und *degU*-Mutanten, woraus sie eine Bedeutung der Virulenzfaktoren für die Infektion in *C. elegans* deuten. Nur wenige Versuchsbedingungen und Daten wurden in dieser Studie beschrieben, weshalb sich ein Vergleich zur Aufklärung der unterschiedlichen Ergebnisse schwierig gestaltet. Forrester *et al.* (2007) konnten im Gegensatz zu den hier gezeigten Ergebnissen keine persistente Infektion im Wurm feststellen, die Überlebensspanne der infizierten Würmer war nicht signifikant kürzer als die der Kontrolle und sie beobachteten keinen Phänotyp bei *prfA*- und σ^B -Mutanten. Diese nicht persistente Infektion könnte damit erklärt werden, dass in dieser Arbeit die Nematoden in einem Puffer mit Gentamycin inkubiert wurden, um Oberflächenbakterien abzutöten. Jedoch wird das Antibiotikum unter diesen Versuchsbedingungen auch von den Nematoden aufgenommen, wodurch es die im Wurmdarm befindlichen Listerien abtöten könnte (Drevets *et al.*, 1994). Guha *et al.* (2013) fütterten *C. elegans* mit verschiedenen Stämmen von *L. monocytogenes* und untersuchten dabei die Lebensspanne der Würmer, wobei sie feststellten, dass manche Stämme diese verlängerten. Daraus ziehen sie den Schluss, dass Listerien für *C. elegans* keine Pathogene darstellen und aufgrund ihrer Vermehrung im Nematodendarm die Würmer vermutlich als Vehikel benutzen, um sich in der Umwelt schneller verbreiten zu können. Die verlängerte Lebensspanne, im Gegensatz zu den hier vorgelegten Ergebnissen, könnte mit den unterschiedlichen Versuchsbedingungen zusammenhängen. Ein verlängertes Überleben der Würmer wurde nicht bei allen Listerien-Stämmen gemessen, und der in der vorliegenden Arbeit verwendete Stamm *L. monocytogenes* EGD-e wurde nicht untersucht. Weiterhin benutzten die Autoren FUDR, von welchem hier gezeigt werden konnte, dass es die listerielle Proliferation beeinflusst, und es wurde lediglich eine Dauerinfektion untersucht. Eine Dauerinfektion mit ausschließlich einem pathogenen Bakterium kommt den natürlichen Umweltbedingungen wenig nahe, da *C. elegans* dort wechselnden Nahrungsbedingungen ausgesetzt ist, bei einer Dauerinfektion stellt *L. monocytogenes* jedoch die einzige Nahrungsquelle für Nematoden dar. Die eigenen Beobachtungen während der Versuche mit *C. elegans* lassen vermuten, dass Listerien im Gegensatz zu *E. coli* keine optimale Nahrungsquelle darstellen, da unter diesen Bedingungen die Eiablage dezimiert war (Thomsen *et al.*, 2006; eigene Beobachtungen), und sich die Würmer somit schlechter vermehren konnten. Eine Limitierung der Nahrung bzw. der Kalorienaufnahme führt bei *C. elegans* zu einer verlängerten Lebensspanne (Lakowski und Hekimi, 1998), was jedoch in dieser Arbeit bei Fütterung der Würmer mit ausschließlich *L. monocytogenes* nicht beobachtet werden konnte. Einen weiteren Grund für das nicht-pathogene Verhalten von *L. monocytogenes* gegenüber *C. elegans* könnte auch die

Umgebungstemperatur darstellen. Die meisten der listeriellen Virulenzfaktoren werden über die Temperatur reguliert und hauptsächlich bei 37 ° exprimiert (Leimeister-Wachter *et al.*, 1992; Hanna und Wang, 2006; McGann *et al.*, 2007), was der durchschnittlichen Körpertemperatur des Menschen und der von Säugetieren entspricht. Nematoden können jedoch nur bei maximal 26 °C kultiviert werden (Riddle *et al.*, 1997). Dies kommt auch den durchschnittlichen Umweltbedingungen nahe, weswegen Experimente bei höheren Temperaturen nicht durchführbar sind. Guha *et al.* (2013) zeigten jedoch auch, dass bei einer Überexpression des zentralen Virulenzregulators PrfA kein vorzeitiges Sterben der Würmer eintrat, was gegen die Rolle von Virulenzfaktoren bei der Pathogenität gegenüber *C. elegans* spricht.

Basierend auf den vorliegenden Daten und bisherigen Studien (v.a. Guha *et al.*, 2013) scheint *L. monocytogenes* kein Pathogen für *C. elegans* darzustellen. *L. monocytogenes* kann sich erfolgreich in den Nematoden vermehren und führt zu keinem vorzeitigen Tod der Würmer, bietet also ideale Voraussetzungen, um Nährstoffflüsse zwischen dem Wurm und Bakterien zu untersuchen. Daher wurde *C. elegans* im weiteren Verlauf als Modell für die Untersuchung von N-Flüssen zwischen *L. monocytogenes* und dem Wurm etabliert.

2.2.3 Markierung von *C. elegans* mit ¹⁵N

In bisherigen *in vivo*-Studien mit ¹³C wurden Zellkultursysteme verwendet, um Stoffflüsse zwischen Pathogenen und der Wirtszelle zu detektieren, und so einen Einblick in die metabolischen Beziehungen zu gewinnen, die diese beiden Partner unterhalten (Eisenreich *et al.*, 2006; Eylert *et al.*, 2008; Heuner und Eisenreich, 2013; Grubmüller *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde *Isotopologue Profiling* auch mit Amöben durchgeführt, die mit *Legionella pneumoniae* infiziert wurden, jedoch bisher nicht mit mehrzelligen Organismen, wie beispielsweise *C. elegans* (Eisenreich und Eylert, 2010; Häuslein *et al.*, 2015).

C. elegans oder auch *Drosophila melanogaster* können vollständig mit stabilen Isotopen wie ¹⁵N markiert werden (Krijgsveld *et al.*, 2003; Spanier *et al.*, 2009). *C. elegans* wurde hier nach einem Protokoll von Gouw *et al.* (2011) mit ¹⁵N vollmarkiert. Dazu wurde zunächst der Futterstamm *E. coli* OP50 durch Anzucht in ¹⁵N-Spectra-9-Medium (Cambridge Isotope Laboratories, USA), welches nur schweren Stickstoff enthält, markiert. Die Bakterien wurden anschließend auf ¹⁵N-NGM Platten kultiviert, welche ebenfalls mit diesem Medium hergestellt wurden. Die auf diese Weise über mehrere Generationen angezüchteten Nematoden nehmen so im Verlauf ihrer Entwicklung Stickstoff nur in Form von ¹⁵N auf, was zu einer nahezu vollständigen Markierung der Würmer führt (Tab. 2 in Kern *et al.*, 2016). Die Differenz ist dabei auf die Messmethodik zurückzuführen. Dabei ließ sich bereits nach einem Tag auf markiertem Futter eine ¹⁵N-Gesamtanreicherung von 64 % (Gly, His) bis 71 % (Ala) in den AS der Würmer messen (Abb. 4 in Kern *et al.*, 2016). Dies spiegelt die hohen metabolischen Umsätze wider, mit denen *C. elegans* die frühen Phasen seiner Entwicklung durchläuft. Nach einem zusätzlichen Tag waren bereits über 80 % ¹⁵N messbar, wobei dieser Wert im weiteren Verlauf des Experimentes bis zum Tag sieben nur noch langsam weiter anstieg. Die hohen metabolischen Umsätze lassen sich durch

die effektive und schnelle Aufnahme und Verwertung der Nahrung durch *C. elegans* erklären, so passieren Marker wie Mineralöl oder Latexkügelchen den Darm eines adulten Wurmes in 3–10 Minuten (Avery und Shtonda, 2003). Vollständig markierte Nematoden verloren den schweren Stickstoff nach Umstellung auf eine unmarkierte Futterquelle mit ähnlicher Geschwindigkeit, nach einem Tag sanken die ^{15}N -Einbauraten bereits auf 56 % (Gly) bis 44 % (Tyr, Ile). Die Dynamik des ^{15}N -Verlustes verhielt sich in den weiteren Tagen des Experimentes ähnlich wie bei der Markierung, ab Tag drei nach der Umstellung sanken die Raten nur noch geringfügig weiter. Diese Markierungs- und Entmarkierungsgeschwindigkeiten hängen vermutlich auch mit dem Alterungsprozess der Würmer zusammen, welcher den Metabolismus stark beeinflusst. Die Expression vieler Gene, die am Metabolismus beteiligt sind, ist bei älteren Nematoden rückläufig (Golden und Melov, 2007). Auch der Sauerstoffverbrauch der Würmer bei der Atmung, welcher mit der Stoffwechselrate zusammenhängt, ist in den jugendlichen Entwicklungsstadien am höchsten und fällt exponentiell mit zunehmendem Alter (Vanfleteren und Vreese, 1996).

Die Isotopologen-Muster von His, Arg und Lys enthielten in beiden Experimenten entweder ausschließlich ^{15}N oder waren unmarkiert, und es konnten keine gemischten Muster detektiert werden (Abb. S4 in Kern *et al.*, 2016). *C. elegans* scheint daher AS und Oligopeptide, welche ^{15}N oder ^{14}N enthalten, aufzunehmen und direkt in metabolische Produkte einzubauen, anstatt aus Vorläufern eigene AS zu synthetisieren. Die AS und Oligopeptide stammen dabei aus dem nährstoffreichen Darminhalt, bestehend aus Zelllysat von *E. coli* OP50. Stickstoff wird bei *C. elegans* zum Großteil über Ammonium, aber auch in Form von AS ausgeschieden (Rothstein, 1963; Rothstein und Rothstein, 1965). Der N-Anteil, welcher in den letzten Tagen der Markierungsexperimente nicht mehr ausgetauscht wurde, könnte zu stabilen Molekülen, wie Strukturproteinen oder Zellmembrankomponenten, gehören. Insgesamt demonstriert dieses Experiment mit den hohen Wertänderungen nach bereits einem Tag der Futterumstellung den enormen metabolischen Durchsatz, mit dem *C. elegans* seinen Stoffwechsel und, wie hier gezeigt werden konnte, auch insbesondere den N-Stoffwechsel, betreibt. Außerdem konnte auch belegt werden, dass über einen Zeitraum von sieben Tagen markierte N-Atome im Wurm vorhanden sind, welche bei der Infektion des Wurmes mit *L. monocytogenes* von diesen aufgenommen werden können.

2.2.4 Entwicklung einer Methode zur Isolation von *L. monocytogenes* aus *C. elegans*

Die Bestimmung des ^{15}N -Gehaltes in bakteriellen AS mit GC-MS erfordert einen hohen Reinheitsgrad der zu messenden Proben. Dies war ein entscheidender und kritischer Schritt, von dem die Eignung der gesamten Methode zur Untersuchung von Stoffflüssen maßgeblich abhing. Nach der Infektion der Würmer mit *L. monocytogenes* und einer ausreichenden Proliferationsphase wurden die Würmer dreimal mit M9-Puffer (0,1 % Triton X-100) gewaschen und anschließend mit Silicakügelchen in einem FastPrep-24 mechanisch aufgeschlossen. Das so erhaltene Homogenisat enthielt somit eine Mischung aus *C. elegans*, *L. monocytogenes* und möglichen Restanteilen von *E. coli* OP50. Zur selektiven Isolation der Listerien aus *C. elegans* wurden daher verschiedene Methoden getestet. Die Dichtegradienten-Zentrifugation mit einem Saccharosegradienten, bei der die Probe in einer geschichteten Saccharoselösung in

Konzentrationen von 35–65 % bei 28.000 rpm für zwei Stunden zentrifugiert wurde, lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Zum einen war die Ausbeute der Bakterien zu gering, um als deutliche Bande im Gradienten erkennbar zu werden, zum anderen kann aufgrund der Natur dieser Methode keine Reinheit der Probe von anderen Bestandteilen garantiert werden. Die Separation über eine Reihe von Filtern immer kleiner werdender Porendurchmesser bis zu einer Größe von 3 μm stellte sich ebenfalls als nicht selektiv genug heraus, da auch hier restliche Nematodenbestandteile nicht ausgeschlossen werden konnten.

Eine weitere Methode zur Isolation von Zellen aus Flüssigkeiten ist die immunomagnetische Separation (IMS). Diese basiert auf der Verwendung von magnetischen Kügelchen, welche mit Antikörpern gekoppelt sind, die gegen die zu isolierenden Zellen gerichtet sind. Nach Inkubation der Flüssigkeiten mit den Kügelchen werden diese anschließend mit Hilfe einer Magnetsäule fixiert und können so vom Rest der Bestandteile getrennt werden. Diese Methode wurde ursprünglich für die Anwendung bei eukaryotischen Zellen im Bereich der Immunologie, den Neurowissenschaften, der Stammzellforschung und Krebsforschung entwickelt. Jedoch konnten damit auch bereits erfolgreich Bakterien der Gattung *E. coli* aus einem Gemisch mit *Stenotrophomonas maltophilia* gewonnen werden (Dai *et al.*, 2011). Das dabei verwendete MACS® MicroBeads System der Firma Milteny Biotech wurde in dieser Arbeit auf die Isolation von *L. monocytogenes* aus *C. elegans*-Lysat adaptiert.

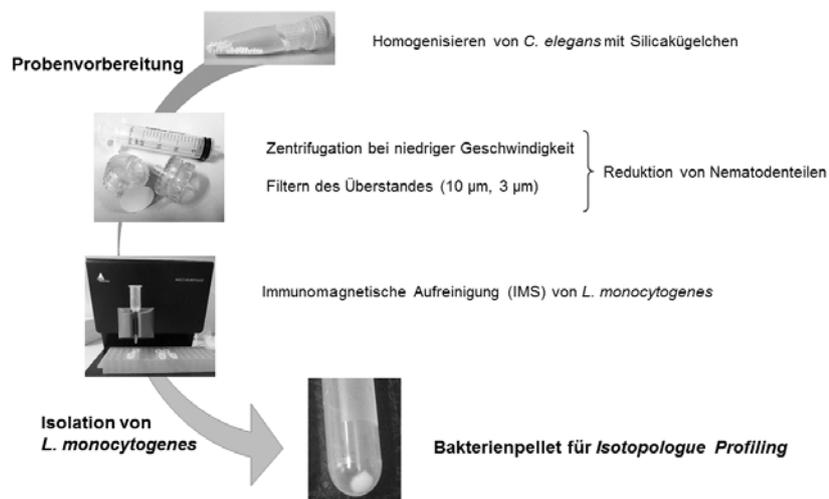


Abbildung 16: Isolation von *L. monocytogenes* aus *C. elegans*.

Die Nematoden werden mit Hilfe von Silicakügelchen in einem FastPrep-24 aufgeschlossen. Anschließend werden durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit und Filtern die Nematodenteile in der Probe reduziert. Aus dem so erhaltenen Lysat werden durch IMS die Listerien aus der Probe selektiv isoliert.

Zu diesem Zweck wurde ein mit Biotin gekoppelter anti-*Listeria* sp. Antikörper (ViroStat, Portland, ME) verwendet, welcher an die Listerien bindet. Das Nematoden-Homogenisat wurde vor Inkubation mit dem Antikörper gefiltert, um ein Verstopfen der Säulen zu verhindern. Die nur 50 nm großen, magnetischen Kügelchen (MACS® Streptavidin MicroBeads) sind mit dem Protein Streptavidin konjugiert, welches an das Biotin der anti-*Listeria* sp. Antikörper bindet und über

diese Wechselwirkung die Bakterienzellen mit den Magnetkügelchen koppelt. Die magnetisierten Zellen werden anschließend durch Aufreinigung über eine Säule, die eine biokompatible, ferromagnetische Oberfläche besitzt, in einem sehr starken Magneten zurückgehalten, und nach Entfernen des Magneten aus der Säule gewaschen. Die Isolation wurde nach dem modifizierten Protokoll von Dai *et al.* (2011) durchgeführt und jede Probe über zwei Säulen aufgereinigt. Das dadurch jeweils erhaltene Pellet wurde zur Optimierung der Reinheit ein zweites Mal über frische Säulen geschickt. Abbildung 16 zeigt eine Übersicht über den Versuchsablauf zur Isolation von *L. monocytogenes* aus *C. elegans*.

Mit Hilfe dieser Methode wurden aus einer Menge von 10 quadratischen Platten (12 cm x 12 cm) mit *C. elegans* bis zu 1×10^8 Listerien isoliert. In einer Kontrolle, bei der der konstitutiv GFP-exprimierende Listerienstamm *L. monocytogenes* EGD-e c-GFP (Balestrino *et al.*, 2010) verwendet wurde, konnte das aufgereinigte Bakterienpellet aufgrund der Fluoreszenz als solches bestätigt werden (Abb. S5A in Kern *et al.*, 2016). Um Verunreinigungen durch *E. coli* OP50 auszuschließen und die Selektivität der Methode zu demonstrieren, wurde das Bakterienpellet direkt nach der Isolation auf Selektivagar kultiviert. Dabei konnte nur ein geringer Anteil an *E. coli* OP50 Bakterien von ca. 10 % festgestellt werden (Abbildung 17).

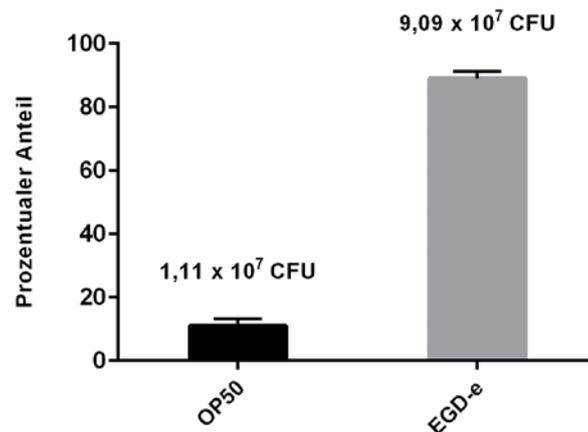


Abbildung 17: Prozentualer Anteil von *E. coli* OP50-Bakterien in einem über IMS isolierten Listerien-Pellet.

Die mit IMS isolierten Bakterienpellets enthalten lediglich einen geringen *E. coli*-Anteil von ca. 10 %. Gezeigt sind die Mittelwerte aus drei biologischen Replikaten sowie deren Standardabweichung.

Aufgrund der geringen Größe der superparamagnetischen Kügelchen und der Tatsache, dass sie biologisch abbaubar sind, müssen sie für weiterführende Untersuchungen nicht entfernt werden. Auch für die Messung über GC-MS für das *Isotopologue Profiling*, bei der die bakteriellen Proteine durch saure Hydrolyse in AS zerlegt werden, konnten die Proben somit ohne weiterführende Modifikationen direkt verwendet werden.

2.2.5 N-Flüsse zwischen *C. elegans* und *L. monocytogenes*

In den vorherigen Kapiteln wurden die Methoden und der Ablauf beschrieben, um den Nematoden *C. elegans* mit ^{15}N zu markieren, und nach einer Infektion mit *L. monocytogenes* mit anschließender Proliferationsphase diese Bakterien selektiv zu isolieren. Mit Hilfe dieses Versuchsaufbaus sollten N-Flüsse zwischen diesen beiden Organismen untersucht werden (s. Abbildung 19). Um herauszufinden, ob, und in welchem Ausmaß *L. monocytogenes* Stickstoff von *C. elegans* bezieht, wurden die Nematoden, wie beschrieben, mit ^{15}N vollmarkiert. Anschließend wurden die so erhaltenen [^{15}N]-*C. elegans* Würmer für zwei Tage mit *L. monocytogenes* infiziert und für drei weitere Tage auf unmarkierten *E. coli* OP50 kultiviert. Nach Aufschluss der Würmer und Isolation der Listerien über IMS wurde die ^{15}N -Anreicherung in *L. monocytogenes* mit GC-MS gemessen. Abbildung 18 (und Abb. 5, Kern *et al.*, 2016) zeigt, dass 8–15 % der listeriellen AS mit ^{15}N markiert waren. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Bakterien während der Kolonisierung und Proliferation im Nematodendarm eine signifikante Menge ^{15}N -haltiger Substrate aufgenommen haben, welche somit von *C. elegans* bezogen worden sein müssen. Diese könnten z.B. von erneuerten Darmepithelzellen des Wurmes stammen, oder auch von Ammonium oder AS, da Stickstoff vom Nematoden in dieser Form ausgeschieden und somit in dessen Darm sekretiert wird (Rothstein, 1963; Rothstein und Rothstein, 1965).

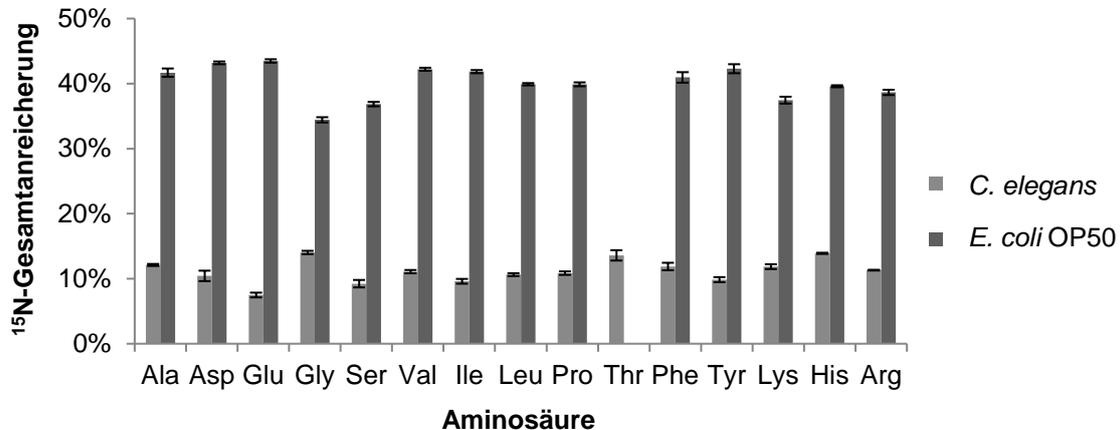


Abbildung 18: ^{15}N -Anreicherung in AS von *L. monocytogenes* nach Isolation aus *C. elegans*.

Ca. 10 % des Stickstoffs in den listeriellen AS stammt von *C. elegans*. Ein großer Anteil an Stickstoff wurde aus dem Darminhalt, bestehend aus markierten *E. coli* OP50, bezogen. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten.

Markierte Lys-, His- und Arg-Moleküle waren fast ausschließlich vollständig markiert, nur äußerst geringe Mengen dieser AS enthielten noch ^{14}N -Atome (Abbildung 20). Dies deutet darauf hin, dass die markierten AS, die von den Nematoden bezogen wurden, primär direkt in neu synthetisierte, listerielle Proteine eingebaut und nicht für den Anabolismus anderer AS degradiert wurden, wie dies bei den *in vitro*-Experimenten mit Gln, Ammonium und weiteren Substraten gezeigt werden konnte.

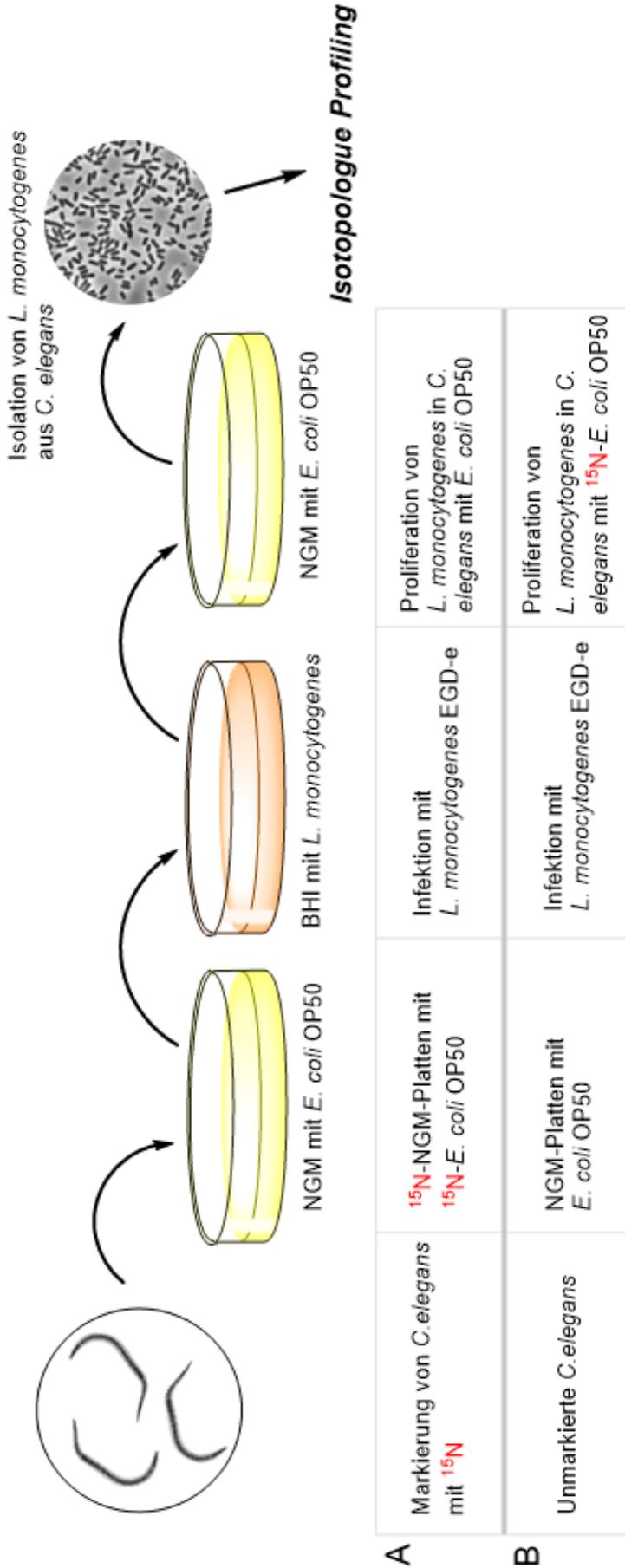


Abbildung 19: Versuchsaufbau für die Untersuchung von Stoffflüssen zwischen *C. elegans* und *L. monocytogenes*.

(A) Vormarkierte Nematoden werden für zwei Tage mit *L. monocytogenes* infiziert. Anschließend werden sie auf eine unmarkierte Futterquelle zurückgesetzt. Nach einer Proliferationsphase von weiteren drei Tagen werden die Würmer aufgeschlossen, die Listerien isoliert und mit GC-MS untersucht. Mit diesem Aufbau sollten N-Flüsse zwischen *C. elegans* und *L. monocytogenes* untersucht werden. (B) Unmarkierte Nematoden werden für zwei Tage mit *L. monocytogenes* infiziert. Anschließend werden die Würmer auf eine markierte Futterquelle umgesetzt. Nach einer Proliferationsphase von weiteren drei Tagen werden die Würmer aufgeschlossen, die Listerien isoliert und mit GC-MS untersucht. Mit diesem Aufbau sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß *L. monocytogenes* Stickstoff aus dem Nematodendarm aufnimmt.

Als Kontrolle wurde ein Infektionsexperiment durchgeführt, bei dem [^{15}N]-*C. elegans* für 24 statt 48 Stunden mit *L. monocytogenes* infiziert wurde. Die Listerien wurden anschließend sofort, ohne weitere Proliferationsphase auf *E. coli* OP50, aufgereinigt. Unter diesen Bedingungen wurden von *C. elegans* kontinuierlich Listerien in den Darm aufgenommen, sodass nur ein geringer Anteil der anschließend aufgereinigten Bakterien 24 Stunden im Darm proliferieren konnte. Dadurch ließen sich, wie erwartet, nur sehr geringe ^{15}N -Einbauraten von 4 % (Glu, Thr) bis 12 % (His) in den AS messen (Abb. S6 in Kern *et al.*, 2016) und somit auch weniger, verglichen mit einer längeren Proliferationsperiode der Bakterien (Abbildung 18). Dies zeigt, dass die durch IMS gewonnenen Proben wenig bis gar keine Kontaminationen durch Proteine aus *C. elegans* aufweisen können, da ansonsten wesentlich höhere ^{15}N -Einbauraten gemessen worden wären und vorab gezeigt werden konnte, dass die AS der Würmer nach einem Tag immer noch 50 % ^{15}N enthielten (Abb. 4B in Kern *et al.*, 2016).

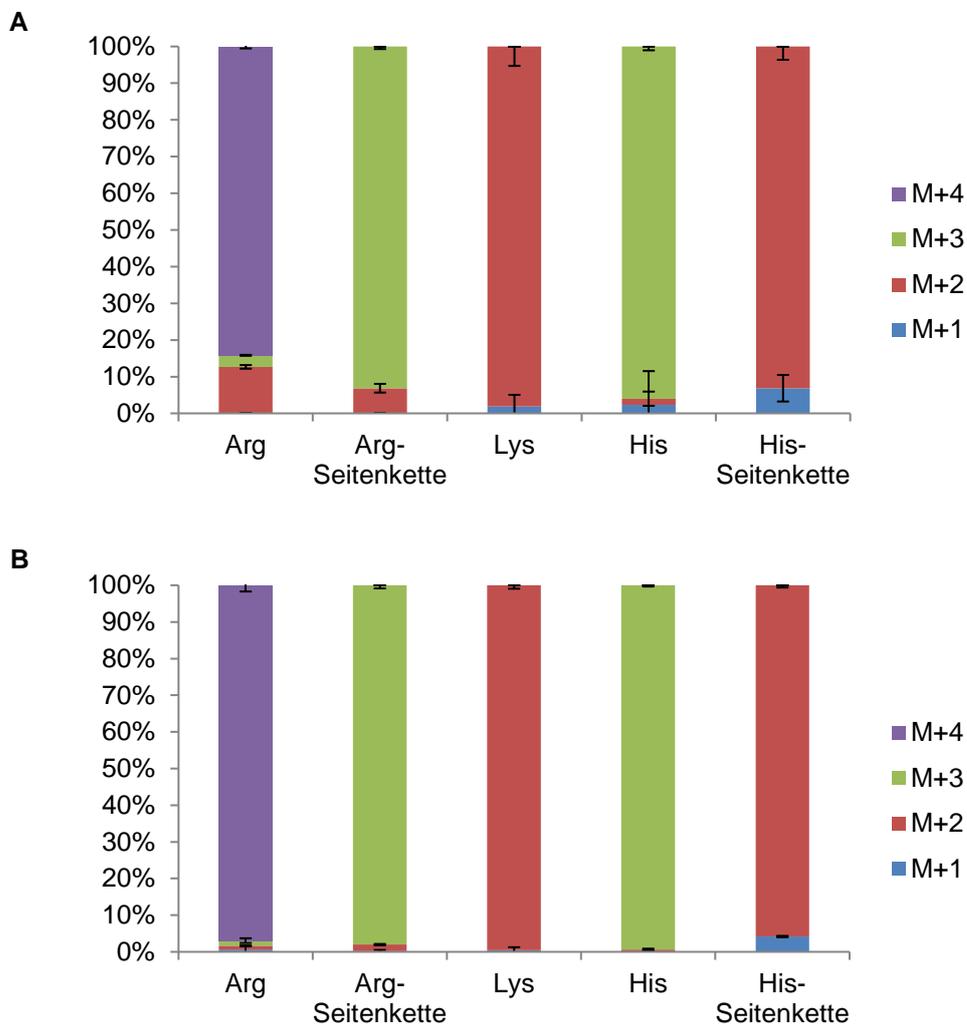


Abbildung 20: Isotopologenmuster von Lys, His und Arg aus *L. monocytogenes* bei der Untersuchung von Stoffflüssen zwischen *L. monocytogenes* und *C. elegans*.

In den Balkendiagrammen sind die Markierungsmuster der AS mit mehr als einem N-Atom nach der Proliferation im Darm von ^{15}N -*C. elegans* (A) bzw. *C. elegans* nach der Fütterung mit ^{15}N -*E. coli* OP50 (B) dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei biologischen Replikaten.

Da nur ein geringer Anteil der listeriellen N-Zufuhr von *C. elegans* bezogen wurde, wurde der Versuchsaufbau variiert um herauszufinden, in welchem Ausmaß *L. monocytogenes* Metabolite aus dem Darm, welche aus der Lyse von *E. coli* OP50 stammen, verwendet (Abbildung 19). Zu diesem Zweck wurden unmarkierte Nematoden für zwei Tage mit *L. monocytogenes* EGD-e infiziert und im Anschluss für drei Tage auf [U-¹⁵N]-*E. coli* OP50 kultiviert. Die GC-MS Messung der listeriellen Proteine resultierte in ¹⁵N-Einbauraten von 32–46 % (Abbildung 18 und Abb. 5 in Kern *et al.*, 2016). Daraus lässt sich schließen, dass *L. monocytogenes* sich beim Wachstum im Nematodendarm hauptsächlich von dessen Inhalt ernährt, welcher aus vom Wurm aufgenommenen, lysierten *E. coli* OP50-Bakterien besteht. Die Isotopologenmuster von Lys-, His- und Arg-Molekülen zeigten, wie im vorherigen Experiment mit [¹⁵N]-*C. elegans*, eine vollständige Markierung dieser AS an (Abbildung 20). Dies demonstriert, dass im Intestinaltrakt der Würmer genügend Nährstoffe für *L. monocytogenes* verfügbar sind, um diese direkt in Biomoleküle einzubauen. Da *C. elegans* kontinuierlich Nahrung aufnimmt, stellen die hier verwendeten Bedingungen für *L. monocytogenes* eine Umgebung mit reichhaltigem Nährstoffangebot in Form lysierter Bakterien dar. Interessant wäre zu sehen, ob sich dieses Verhalten ändert, wenn *C. elegans* die Futterquelle entzogen würde, sodass *L. monocytogenes* gezwungen wäre, sich vermehrt von Nährstoffen aus dem Wurm zu ernähren. Nach einem Tag der Futterumstellung auf unmarkierte *E. coli* OP50 war bereits 50 % des schweren Stickstoffs ausgeschieden (s. Abschnitt 2.2.3, S. 79) und somit kontinuierlich weniger ¹⁵N vorhanden, welcher von den Listerien hätte aufgenommen werden können. Dies könnte ebenfalls ein Grund dafür sein, warum bei diesem Experiment nur ca. 10 % ¹⁵N-Gesamtanreicherung gemessen werden konnte.

Substrate wie Ammonium oder Gln wurden vermutlich nicht von *C. elegans* verwendet, da deren Assimilation zu gemischten Isotopologen-Mustern in den AS mit mehreren N-Atomen geführt hätte. Bei der intrazellulären Replikation scheinen sich Listerien ebenfalls an alternativen N-Quellen, anstelle von Gln, zu bedienen, vermutlich um die Wirtszelle nur minimal zu schädigen (Joseph *et al.*, 2006). Die Aufnahme von Peptiden und AS in diesem Milieu führt auch hier zum direkten Einbau anstelle ihrer Katabolisierung, möglicherweise aufgrund eines Engpasses an essentiellen katabolischen Intermediaten und Cofaktoren, die für die Biosynthese von AS notwendig sind (Grubmüller *et al.*, 2014). Die Nährstoffverfügbarkeit für die Proliferation von Pathogenen ist ein fundamentaler, aber größtenteils unbekannter Aspekt der Interaktion mit dem Wirtsorganismus. Neben Substanzen aus dem Darm konnte hier gezeigt werden, dass auch N-Verbindungen vom Wirt aufgenommen wurden, wenn auch nur ein geringer Anteil, was jedoch auch daran liegen könnte, dass im Verlauf des Experimentes die Menge an Stickstoff rasant abnimmt, da der Wurm aufgrund seiner hohen metabolischen Umsatzraten schnell demarkiert wird (s. Abschnitt 2.2.3, S. 79). Solch eine Nutzung von Stoffen aus dem Wirt konnte auch bereits in einem Experiment mit Mäusen gezeigt werden, bei dem ¹⁵N-markiertes Thr verwendet wurde, und bei dem interessanterweise die Darmmikrobiota eine entscheidende Rolle spielte für den Abbau und das Verfügbarmachen von Stoffen (Berry *et al.*, 2013). Die hier gezeigten Ergebnisse unterstreichen abermals die Rolle von Peptiden, AS und den zugehörigen Transportern bei

L. monocytogenes bei der Akquirierung von Stickstoff, während einer Infektion von Invertebraten oder Säugetieren.

2.2.6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde *C. elegans* für die Untersuchung von Stoffflüssen im Darm zwischen dem Wurm und *L. monocytogenes* eingeführt. Zur Kontrolle der Nachkommen wurde dazu der temperatursensitive Stamm *C. elegans* JK509 ausgewählt. Pathogenitätsstudien ergaben, dass *L. monocytogenes* EGD-e zu keinem vorzeitigen Tod der Nematoden führt und somit für diese nicht pathogen ist, sich jedoch effektiv im Nematodendarm vermehrt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die Methode des *Isotopologue Profiling* auf dieses Modell adaptiert, wozu *C. elegans* vollständig mit ^{15}N markiert wurde. Dabei konnten sehr hohe, metabolische Umsatzraten der Würmer gezeigt werden. Die Isotopologen-Muster deuten außerdem darauf hin, dass die Würmer Oligopeptide und AS aus ihrer Nahrung überwiegend direkt in neu synthetisierte Proteine einbauen. Als entscheidender und kritischer Schritt wurde in dieser Arbeit außerdem eine Methode zur Isolation von *L. monocytogenes* aus *C. elegans* etabliert, welche als zentralen Schritt eine immunomagnetische Aufreinigung (IMS) beinhaltet. Auf diese Weise konnten N-Flüsse zwischen *C. elegans* und den im Darm der Würmer proliferierenden *L. monocytogenes*-Bakterien gemessen und gezeigt werden, dass diese ca. 10 % ihrer N-Versorgung vom Wurm beziehen. Der Großteil des Stickstoffs stammte allerdings vom Darminhalt, welcher aus *E. coli* bestand, was in einem variierten Versuchsaufbau gezeigt werden konnte. Auf diese Weise konnten Stoffflüsse, bzw. N-Flüsse im Speziellen, zwischen einem Wirt und einem Bakterium in einem *in vivo*-Modell nachgewiesen werden. Die gemessenen Isotopologen-Muster legen außerdem die Vermutung nahe, dass *L. monocytogenes* Oligopeptide und AS aus dem Darm oder dem Wurm hauptsächlich für den direkten Einbau in bakterielle Proteine verwendet, was die Bedeutung dieser Substrate bei der Proliferation *in vivo* unterstreicht. Die Daten lassen vermuten, dass die Kolonisierung von *C. elegans* durch *L. monocytogenes* eine Strategie darstellt, um sich in einer geschützten Umgebung, wie dessen Darm, mit einfachem Zugang zu Nährstoffen wie beispielsweise Stickstoff, effektiv vermehren und des Weiteren auch in der Umwelt verbreiten zu können.

2.2.7 **Publikation 2:** Pathogen-nematode interaction: Nitrogen supply of *Listeria monocytogenes* during growth in *Caenorhabditis elegans*

Die im vorhergehenden Abschnitt 2.2 beschriebenen Ergebnisse basieren auf der im Folgenden eingebundenen Publikation Kern *et al.* (2016).

Pathogen–nematode interaction: Nitrogen supply of *Listeria monocytogenes* during growth in *Caenorhabditis elegans*

Tanja Kern,¹ Erika Kutzner,² Wolfgang Eisenreich² and Thilo M. Fuchs^{1*}

¹Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung (ZIEL), Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 3, 85354 Freising, Germany.

²Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München, D-85747 Garching, Germany.

Summary

Listeria monocytogenes is a Gram-positive facultatively intracellular human pathogen. Due to its saprophytic lifestyle, *L. monocytogenes* is assumed to infect and proliferate within soil organisms such as *Caenorhabditis elegans*. However, little is known about the nutrient usages and metabolite fluxes in this bacterium–nematode interaction. Here, we established a nematode colonization model for *L. monocytogenes* and a method for the efficient separation of the pathogen from the nematodal gut. Following ¹⁵N labelling of *C. elegans* and gas chromatography–mass spectrometry-based ¹⁵N isotopologue analysis, we detected a high basal metabolic rate of the nematode, and observed a significant metabolic flux from nitrogenous compounds of the nematode to listerial proteins during proliferation of the pathogen in the worm's intestine. For comparison, we also measured the N fluxes from the gut content into listerial proteins using completely ¹⁵N-labelled *Escherichia coli* OP50 as food for *C. elegans*. In both settings, *L. monocytogenes* prefers the direct incorporation of histidine, arginine and lysine over their *de novo* biosynthesis. Our data suggest that colonization of nematodes is a strategy of *L. monocytogenes* to increase its access to N-rich nutrients.

Introduction

Listeria monocytogenes is a Gram-positive pathogen that mainly affects immunocompromised individuals, pregnant

women and newborns. The most common vehicles of infection by listeriae are dairy products, eggs, seafood and vegetables. A hallmark of this facultative intracellular pathogen is its capability to escape from the intracellular vacuole by disrupting the phagosomal membrane and to replicate within the cytoplasm of host cells (Vazquez-Boland *et al.*, 2001). A successful infection by *L. monocytogenes* requires not only the expression of virulence genes, but also metabolic capacities that allow proliferation in an environment characterized by limited nutrient availability. In a pioneer study, ¹³C-isotopologue profiling was established for direct identification of the major carbon sources of *L. monocytogenes* replicating within macrophages (Eylert *et al.*, 2008). Factors responsible for nutrient uptake such as oligopeptide permeases and the hexose phosphate transporter have also been shown to be a prerequisite for proliferation of pathogenic *L. monocytogenes* (Borezee *et al.*, 2000; Schauer *et al.*, 2010); (Chico-Calero *et al.*, 2002).

Listeria monocytogenes has been isolated from soil, silage, groundwater, sewage and vegetation (Gray and Killinger, 1966; Lang Halter *et al.*, 2013). It can be assumed that during its saprophytic lifestyle, *L. monocytogenes* often encounters fungi, protists and nematodes (Freitag *et al.*, 2009). The relevance of the interaction with lower eukaryotic hosts for the persistence, transmission and evolution of pathogenic listeriae still awaits disclosure. For example, it is largely unknown whether listeriae are killed by these predators, or survive possible uptake and then even profit from a close association with these organisms. The later hypothesis is in line with the finding that listeriae produce factors associated with mechanisms of resistance to low pH and osmotic stress. Thus, it may be speculated that the nematode provides an environmental niche being rich in nutrients, particularly nitrogen sources that may be less available in the soil.

Little is known about the *in vivo* N metabolism of *L. monocytogenes*. It is believed that the pathogen replaces glutamine, which is one of the optimal nitrogen sources of *L. monocytogenes in vitro* (Fisher, 1999), with ammonium, arginine and/or ethanolamine as nitrogen sources during replication in the host (Buchrieser *et al.*, 2003; Joseph *et al.*, 2006; Joseph and Goebel, 2007;

Received 2 October, 2015; accepted 8 October, 2015. *For correspondence. E-mail thilo.fuchs@wzw.tum.de; Tel. 0049-(0)-8161-713518; Fax 0049-(0)-8161-714492.

Ryan *et al.*, 2009; Fuchs *et al.*, 2012; Staib and Fuchs, 2014; Kern *et al.*, 2015). An analysis of specific metabolic traits during infection of hosts with *L. monocytogenes* by ^{15}N isotopologue profiling has not yet been performed, as *in vivo* approaches have long been hampered by the lack of technology to study metabolic fluxes in an appropriate biological system. To determine and quantify possible nitrogen fluxes from a natural host to *L. monocytogenes*, we established *Caenorhabditis elegans* as an infection organism and followed the proliferation of the pathogen in the nematodes' gut. To apply isotopologue profiling, we either ^{15}N labelled the nematode before infection or exposed the worms to labelled *Escherichia coli* OP50 after infection. We then established a method for separating listerial cells from the worm as well as from the feeding bacteria. The fraction containing *L. monocytogenes* was hydrolysed under acidic conditions, and the resulting amino acids were silylated and analysed by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS), revealing ^{15}N enrichments and isotopomeric compositions. The unique ^{15}N -labelling patterns revealed unprecedented insights into the N metabolism of *L. monocytogenes in vivo*.

Results and discussion

Establishing *C. elegans* as a host model for *L. monocytogenes* infection

Caenorhabditis elegans has a short generation time of 2–4 days. To control *C. elegans* progeny during infection experiments lasting up to 1 week, we tested the effect of the antimetabolite 5'-fluoro-2'-deoxyuridine (FUDR) on the growth of *L. monocytogenes* EGD-e in the *C. elegans* strain N2. FUDR inhibits DNA replication by blocking thymidylate synthetase and, as a result, nematodal prolif-

eration. However, it does not change the general physiology or lifespan of the worm (Mitchell *et al.*, 1979). Following infection with *L. monocytogenes*, worms grown to larval stage 4 (L4 stage) were transferred to nematode growth medium (NGM) plates with or without 10 μM FUDR. Five days after infection, the worms were lysed, and the lysates were plated on selective agar. The number of listerial cells isolated from worms maintained on FUDR plates was three orders of magnitude lower than the number of colony-forming units (cfu) from worms cultivated without FUDR (Fig. S1). We concluded that FUDR not only prevents nematodal proliferation, but also growth of *L. monocytogenes* and is accordingly unsuitable for infection experiments with EGD-e. This explains the outcome of a study in which the authors had used FUDR and erroneously stated that *L. monocytogenes* does not kill *C. elegans*, but even extends the worm's lifespan (Guha *et al.*, 2013). To avoid nematode proliferation, we instead selected a temperature-sensitive nematode mutant strain JK509. This strain carries the mutated gene *glp-1*, which confers sterility at 25°C, but allows proliferation of the worm at lower temperatures (Austin and Kimble, 1987) (Table 1).

Listeria monocytogenes EGD-e is not pathogenic towards *C. elegans*

The nematode *C. elegans* has been used successfully as a model host for studying Gram-positive and Gram-negative pathogens including *Salmonella enterica*, *Staphylococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis* and *Yersinia spp.* [Darby *et al.*, 1999; Aballay *et al.*, 2000; Labrousse *et al.*, 2000; Garsin *et al.*, 2001; Styer *et al.*, 2005; Begun *et al.*, 2007; Maadani *et al.*, 2007; Spanier *et al.*, 2010; (reviewed by Sifri *et al.*, 2005)]. All these pathogens, but not *Bacillus subtilis*

Table 1. Bacterial and nematode strains used in this study.

Strains	Description/antibiotic resistance	Source
Bacteria		
<i>E. coli</i> OP50	Uracil auxotroph	CGC
<i>E. coli</i> OP50/pGFP	OP50 expressing GFP	CGC
EGD-e	<i>L. monocytogenes</i> Sv 1/2a, wild type, derivative of EGD	(Glaser <i>et al.</i> , 2001)
EGD-e/pHPS9	Em ^R (5 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	This study
EGD-e cGFP	pAD1-cGFP chromosomally integrated in EGD-e; Cm ^R (7 $\mu\text{g ml}^{-1}$)	(Balestrino <i>et al.</i> , 2010)
EGD Δ inlAB	In-frame deletion of <i>inlAB</i>	(Greiffenberg <i>et al.</i> , 1997)
EGD Δ inlC	In-frame deletion of <i>inlC</i>	(Engelbrecht <i>et al.</i> , 1996)
EGD Δ inlGHE	In-frame deletion of <i>inlGHE</i>	(Raffelsbauer <i>et al.</i> , 1998)
EGD Δ inlAB Δ inlGHE	In-frame deletion of <i>inlAB</i> and <i>inlGHE</i>	(Bergmann <i>et al.</i> , 2002)
Nematodes		
<i>C. elegans</i> N2	<i>C. elegans</i> var Bristol; grown at RT	CGC
<i>C. elegans</i> JK509	<i>glp-1</i> (q231) III. Temperature sensitive, fertile at 15°C, sterile at 25°C.	CGC (Austin and Kimble, 1987)

CGC, *Caenorhabditis* Genetics Centre.

Escherichia coli was grown in lysogeny broth (Sambrook and Russell, 2001) and *L. monocytogenes* was grown in BHI medium (Merck, Darmstadt, Germany) at 37°C with shaking. The worms were maintained by standard procedures, and synchronization of the worms was obtained by hypochlorite treatment (Stiermagle, 1999).

22 T. Kern, E. Kutzner, W. Eisenreich and T. M. Fuchs

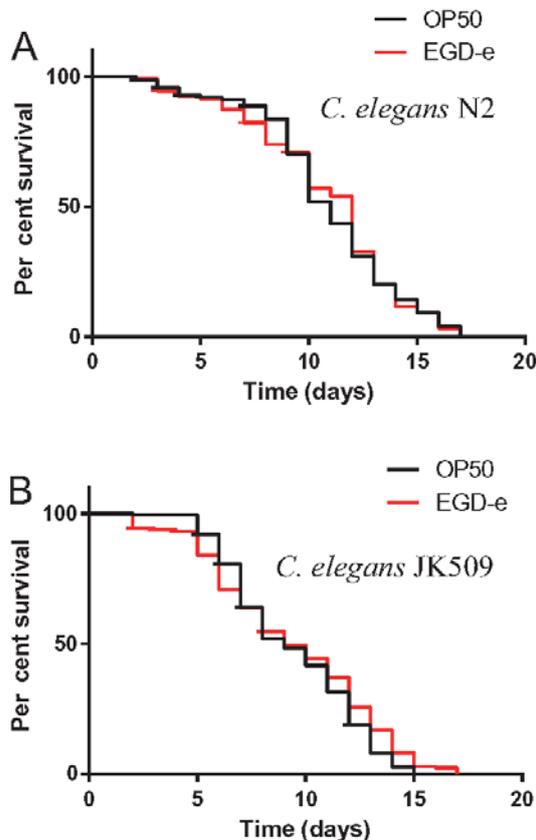


Fig. 1. Survival curves of *C. elegans* strains infected with *L. monocytogenes* EGD-e. Fifty microlitres of an overnight bacterial culture was spread on 8.5 cm diameter NGM plates (*E. coli*) or BHI plates (*L. monocytogenes*). The plates were incubated for 1 day (*L. monocytogenes*) or 2 days (*E. coli*) at room temperature (RT) and stored at 4°C. Before use, the plates were equilibrated to RT. Fifty L4 larvae were infected with *L. monocytogenes* EGD-e on BHI plates (or permanently exposed to *E. coli* OP50 on NGM plates in the control group) for 4 h at 25°C and then transferred back to NGM plates with an *E. coli* OP50 lawn. The worms were incubated at 25°C and transferred individually to fresh feeding plates every day to separate them from their progeny. Experiments with *C. elegans* JK509 were performed without daily transfer of worms that were sterile at 25°C.

A. Lifespan of *C. elegans* N2 after exposure to *L. monocytogenes* EGD-e. The average TD_{50} was 11 days for the control group and 12 days for the infected nematodes. The curves were not significantly different ($P = 0.9032$).

B. Survival assay performed with the *C. elegans* strain JK509. No significant differences were detected between the TD_{50} values of uninfected and infected JK509 nematodes ($TD_{50} = 9$ days for both, $P = 0.1424$). The number of dead and viable worms was monitored daily. Lifespan curves were plotted using Kaplan–Meier survival analysis with GraphPad Software (San Diego, CA, USA). Curves were compared in this analysis by log-rank (Mantel–Cox). The plots are based on one experiment with three replicates with $n \geq 150$ animals per curve for strain N2 and $n \geq 120$ animals per curve for strain JK509.

(Marroquin *et al.*, 2000), infect and kill the nematode. To determine the pathogenicity of *L. monocytogenes* EGD-e towards *C. elegans*, we performed survival assays with L4 larvae of the *C. elegans* strain JK509 and, for comparison, of the wild-type strain N2 as described recently (Spanier *et al.*, 2010). After infection with *L. monocytogenes* EGD-e for 4 h, the worms were transferred back to plates with *E. coli* OP50. The plates were monitored until all worms were dead. For strain N2, we calculated an average time for 50% of the nematodes to die [50% time to death (TD_{50})] to be 11 days for the control group and 12 days for the infected nematodes. The curves were not significantly different ($P = 0.9032$, Fig. 1A). In comparison with strain N2, the lifespan of JK509 worms was 2 days shorter, possibly due to its pre-growth at 15°C. Again, no significant differences in the TD_{50} values between uninfected and infected JK509 nematodes ($TD_{50} = 9$ days for both, $P = 0.1424$) were detected (Fig. 1B).

To test whether *L. monocytogenes* EGD-e is pathogenic to the nematode under permanent exposure to EGD-e, a modified lifespan assay was performed. Because NGM is not appropriate for the cultivation of listeriae that require a nutrient-rich medium, L4 larvae of the *C. elegans* strain N2 were transferred to brain-heart infusion (BHI) plates with a lawn of EGD-e/pHPS9. The plates contained $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ erythromycin to prevent the growth of *E. coli* OP50. Worms feeding on OP50 served as the control group. Again, the TD_{50} values of the control group feeding on OP50 and of the worms that had been permanently exposed to *L. monocytogenes* did not differ significantly ($TD_{50} = 10$ days for both, $P = 0.2109$). Taken together, *L. monocytogenes* did not kill the worms under the conditions applied here and is thus not pathogenic to *C. elegans*. Accordingly, we previously demonstrated that acid-shocked *L. monocytogenes* kills *C. elegans* and concluded that the nematode is a natural host of listeriae (Neuhaus *et al.*, 2013). This conclusion is in line with the observation that worm populations persisted for 7 days when continually exposed to several strains of *L. monocytogenes*, followed by shedding of the bacteria into the environment (Caldwell *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2006). All these data challenge a study that reports a nematocidal activity of *L. monocytogenes* depending on virulence factors (Thomsen *et al.*, 2006).

Listeria monocytogenes replicates in the gut of *C. elegans*

To investigate the survival capability and growth behaviour of *L. monocytogenes* in the worm's gut, the *C. elegans* strain JK509 was infected with *L. monocytogenes* for 4 h, transferred back to plates with *E. coli* OP50 and cultivated for 5 days. Each day, the

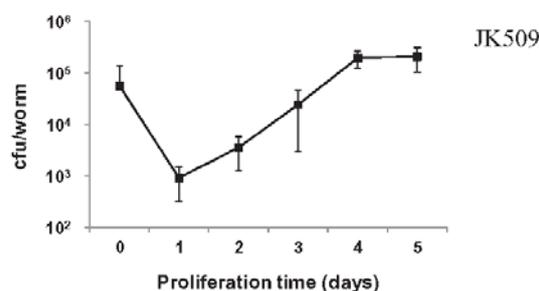


Fig. 2. Proliferation of *L. monocytogenes* EGD-e in *C. elegans* JK509. The worms were infected for 4 h, washed with M9 buffer containing 0.1% Triton X-100, and then transferred back to NGM plates with *E. coli* OP50. The worms were further incubated at 25°C. At each time point, aliquots of 10 worms were washed three times, lysed with 1 mm silica beads in a FastPrep-24 (MP Biomedicals, Solon, OH), 45 s at 6.5 m s⁻¹, three times and plated on selective BD Palcam *Listeria* agar (Oxoid, Thermo Scientific) to count living bacteria after incubation at 37°C for 48 h. T = 0 indicates the bacterial cfu directly after infection when the worms had been fed *L. monocytogenes* for 4 h. Each experiment was performed in triplicate. The mean values and their standard deviations are indicated.

number of viable EGD-e cells was determined (Fig. 2). After 1 day of feeding on *E. coli* OP50, the number of listerial cells isolated from the worms dropped from 5.69×10^4 to 9.16×10^2 . The bacterial counts then steadily increased until 5 days post infection to a maximum of 2.09×10^5 cfu/worm, suggesting that EGD-e replicates in the gut of JK509. A comparable proliferation was observed for EGD-e in strain N2 (Fig. S2).

To confirm the growth of *L. monocytogenes* in the nematode's gut, we infected the *C. elegans* strain JK509 for 4 h with *L. monocytogenes* EGD-e cGFP, a strain that constitutively expresses the green fluorescent protein (GFP). Directly after infection and washing, bacteria were visible throughout the intestinal tract of the worms (Fig. 3A). One day after infection, no listeriae were visible in the worms by microscopic survey. From day 2 onward, fluorescent bacterial cells were detected in the pharynx and in the intestinal region of the gut proximal to the nematode's anus. Four days after infection, the number of listerial cells had increased, as manifested by a higher fluorescence in the pharynx and the region proximal to the anus (Fig. 3B). In most worms, listeriae were not spread evenly throughout the intestine with few or no bacteria visible between the pharynx and the anus regions. Five days after infection, the pharynx of the worms (Fig. 3C) and the posterior part of the intestine were densely colonized with *L. monocytogenes*. We observed bacteria only in the pharyngeal and intestinal lumen of the worms, with no bacteria detected outside the digestive tract of the worms at any time of infection, supporting the suggestion that there is no intracellular stage of *L. monocytogenes* in nematodes (Thomsen *et al.*, 2006).

All data confirm the capability of *L. monocytogenes* to colonize and replicate in the nematode's gut. For this reason, and given that premature killing of the worms after exposure to listeriae was not observed under our conditions, we considered *C. elegans* to be an appropriate model host for investigation of metabolic fluxes during infection by *L. monocytogenes*. Notably, the worm's intestine shares many morphological properties with human colon cells, including microvilli, making it also an attractive model for the study of pathogen–intestine interactions.

Internalins such as InIA, InIB, InIC and InIGHE have been shown to play a role in listerial virulence mouse models (Gaillard *et al.*, 1991; Dramsi *et al.*, 1995; Raffelsbauer *et al.*, 1998; Gouin *et al.*, 2010), and the genes encoding three of them (InIA, InIB and InIE) are expressed even at environmental temperature (Neuhaus *et al.*, 2013). To test their potential role for colonization of the nematode's gut epithelium, the *C. elegans* strain N2 was infected for 4 h with the mutants EGD Δ InIA, EGD Δ InIC, EGD Δ InIGHE, and EGD Δ InIA Δ InIGHE, and then transferred to NGM agar plates with *E. coli* OP50. None of the mutants showed proliferation in *C. elegans* in comparison with the control strain EGD-e (Fig. S3). However, it cannot be excluded that other internalins encoded by *L. monocytogenes* are relevant to the interaction with *C. elegans*.

Labelling and delabelling: dynamics of ¹⁵N enrichments in *C. elegans*

Caenorhabditis elegans can be efficiently labelled with stable isotopes by feeding on ¹⁵N-labelled *E. coli* OP50 for applications such as isotopologue profiling analysis (Krijgsveld *et al.*, 2003; Spanier *et al.*, 2009). To characterize nematode labelling and delabelling, we first ¹⁵N-labelled *E. coli* OP50 by growth in liquid ¹⁵N-spectra-9 medium according to the protocol of Gouw and colleagues (2011). Then, cell preparation, protein hydrolysis, amino acid derivatization and GC–MS measurements were performed as described recently (Grubmüller *et al.*, 2014). The amino acids of strain OP50 were almost exclusively composed of ¹⁵N atoms as expected (Table 2). For labelling of *C. elegans*, worms of strain JK509 were fed these fully ¹⁵N-labelled *E. coli* ([U-¹⁵N]-OP50) on ¹⁵N NGM agar plates for at least three generations. Nematodal proteins were then subjected to acidic hydrolysis, and ¹⁵N enrichments of amino acids were determined (Table 2). Quantitative labelling of the amino acids isolated from *C. elegans* was confirmed, albeit to a slightly lower extent than expected from the ¹⁵N excess measured in proteins of [U-¹⁵N]-OP50.

To investigate how quickly worms replace their ¹⁴N atoms with ¹⁵N, unlabelled L4 larvae of strain JK509 were transferred to ¹⁵N NGM agar plates colonized with ¹⁵N-

24 T. Kern, E. Kutzner, W. Eisenreich and T. M. Fuchs

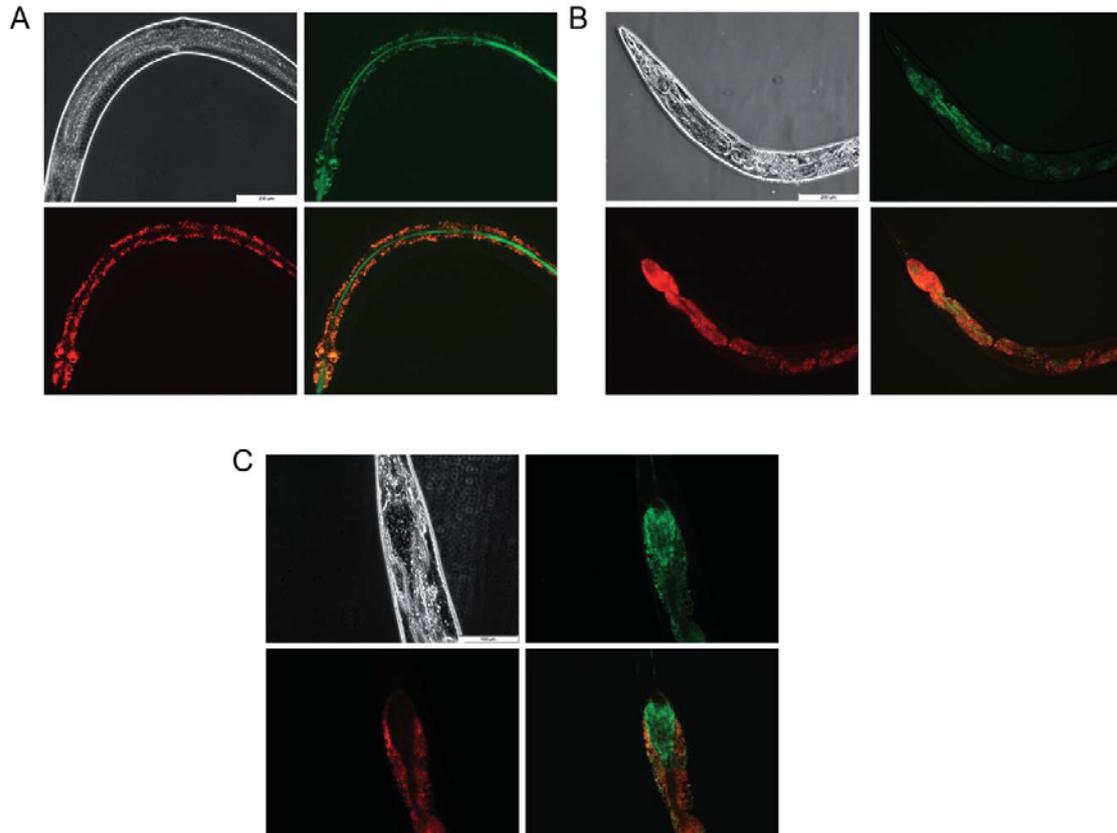


Fig. 3. *Caenorhabditis elegans* JK509 infected with *L. monocytogenes* EGD-e cGFP. For microscopic surveillance, the infected worms were washed in M9 buffer containing 0.1% Triton X-100, and placed on glass slides in a 10 μ l drop of M9 buffer containing 5 mM levamisole to stop nematode movement.

A. *Listeria monocytogenes* EGD-e in *C. elegans* directly after infection. After washing, the bacteria were visible throughout the intestinal tract of the worm; 200 \times magnification with an Olympus BX51 microscope.

B. Four days after infection, listeriae were found in the mouth and pharyngeal region and in the intestine; 200 \times magnification.

C. Five days after infection, many bacterial cells were identified in the worm's pharyngeal region; 400 \times magnification. From top left clockwise, brightfield, GFP (green), autofluorescence images of the worm (red) and an overlay of both fluorescence images are shown.

labelled *E. coli*. For a 1-week period, nematodes were harvested daily using M9 buffer with 0.1% Triton X-100. After only 1 day on labelled food, 64% (Gly, His) to 71% (Ala) of the ^{14}N atoms in the nematode's amino acids were replaced with labelled N atoms (Fig. 4A), indicating a high metabolic rate of the worm. High ^{15}N enrichments ranging from 90% (Gly, Arg) to 95% (Leu, Val) were detected when the worms had been exposed to $[\text{U-}^{15}\text{N}]$ -OP50 for 1 week.

We then followed the dynamics of nematode's delabelling by transferring fully labelled JK509 L4 larvae onto NGM plates with unlabelled OP50. The nematodes were harvested each day and their amino acids were analysed via GC-MS (Fig. 4B). We observed a strong decrease in ^{15}N enrichment of 44% (Tyr, Ile) to 56% (Gly) in the worm's amino acids after 1 day. At day 5

Table 2. ^{15}N enrichment in the amino acids of *E. coli* OP50 and *C. elegans* N2 after labelling.

Amino acid	<i>E. coli</i> OP50 (%)	<i>C. elegans</i> N2 (%)
Ala	99.75	97.82
Gly	99.54	98.92
Val	99.43	98.98
Leu	99.54	99.25
Ile	99.48	98.98
Pro	99.14	98.40
Ser	99.48	98.82
Phe	99.33	98.93
Tyr	99.02	97.66
Asp	99.10	98.71
Glu	99.15	98.44
Lys	98.03	96.06
His	95.27	95.32

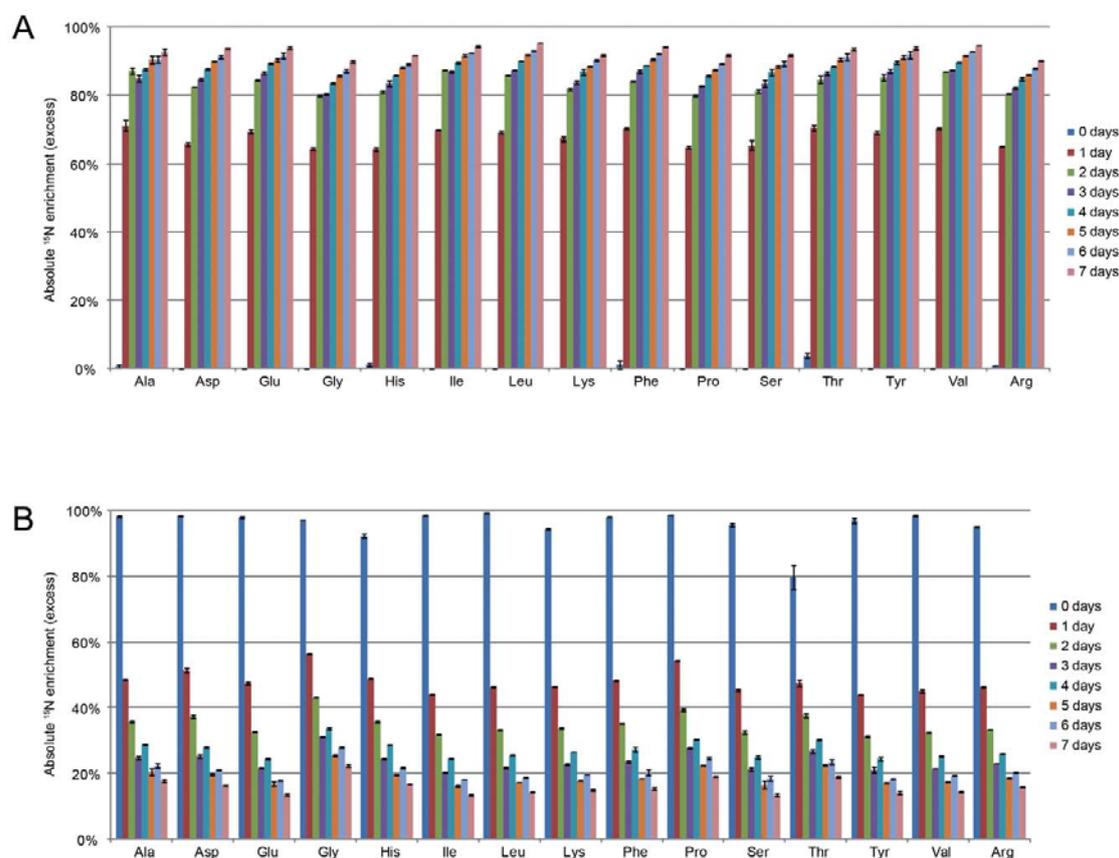


Fig. 4. Labelling and delabelling of the *C. elegans* strain JK509.

A. Unlabelled L4 larvae were transferred to ¹⁵N-labelled plates. After 1 day of feeding on [U-¹⁵N]-OP50, more than 60% of the ¹⁴N atoms in the nematode's amino acids were already replaced with ¹⁵N atoms. After 7 days of contact with labelled OP50, the ¹⁵N enrichment increased to 95%. The mean values of three technical replicates are shown. As the yield of tertbutyldimethylsilyl (TBDMS)-Arg was low, another aliquot of 500 μ l of the eluate was dried and treated with 200 μ l of 3 M methanolic hydrochloric acid for 30 min at 70°C. After removal of the methanolic hydrochloric acid in a stream of nitrogen, 50 μ l of trifluoroacetamide (anhydrous) was added to the dry sample, followed by incubation at 140°C for 10 min. The sample was dried, redissolved in 200 μ l of ethyl acetate and subjected to GC-MS.

B. The L4 larvae of labelled *C. elegans* that had been fed [U-¹⁵N]-OP50 for at least three generations were transferred to NGM plates with unlabelled *E. coli* OP50 as the food source. The initial enrichment of ¹⁵N atoms in the amino acids of the nematode gradually decreased over a period of 7 days. The mean values of three technical replicates are shown.

corresponding to the end of the proliferation period when listeriae are separated from the worms (see next section), the nematodal amino acids still exhibited an overall ¹⁵N enrichment of 16% (Ser, Ile) to 25% (Gly). During a further 2 days of feeding on unlabelled bacteria, the ¹⁵N excess in the worm's amino acids decreased only slightly, ranging from 14% (Ile, Ser, Glu) to 22% (Gly). The isotopologue patterns of His, Arg and Lys showed that these amino acids were either fully labelled or did not carry an ¹⁵N atom (Fig. S4), and no turnover of the initially labelled amino acids was observed. This result suggests that the worm's basic requirement of these essential amino acids for

protein synthesis during the 7-day period was fulfilled by permanent uptake and direct incorporation of unlabelled amino acids or oligopeptides derived from the feeding strain OP50. It can also be concluded that a predominant fraction of ¹⁵N atoms was excreted in the form of amino acids and ammonia (Rothstein, 1963; 1965). The ¹⁵N atoms that were retained in the nematode may belong to relatively stable *C. elegans* molecules such as structural proteins and cell membrane components. In summary, a majority of the nematode's N atoms were exchanged during labelling and delabelling within 1 day when lysed OP50 cells were used as food.

26 T. Kern, E. Kutzner, W. Eisenreich and T. M. Fuchs

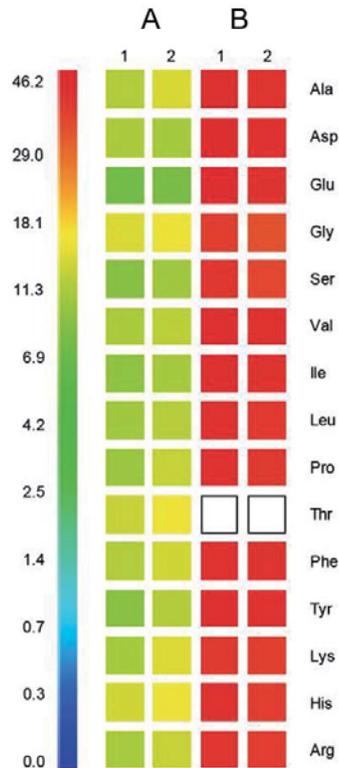


Fig. 5. ^{15}N fluxes into listerial amino acids during infection of the nematode.

A. The nematode as the N source. [^{15}N]-*C. elegans* was labelled with [^{15}N]-OP50 as described, washed and infected with *L. monocytogenes* strain EGD-e for 2 days. After washing, the infected nematodes were transferred to OP50 plates and incubated for 3 days. The colour map in the quasi-logarithmic form indicates ^{15}N excesses ranging from 1% to 15%. The mean values of three technical replicates are shown. The amount of methionine (Met) was too low for measurement.

B. ^{15}N flux from the nematode's gut. *Caenorhabditis elegans* was infected with the *L. monocytogenes* strain EGD-e for 2 days. After washing, the infected nematodes were transferred to [^{15}N]-OP50 plates and incubated for 3 days. ^{15}N was found in all listerial amino acids in proportions of 32% to 79% (mean values of three technical replicates). Amounts of methionine (Met) and threonine (Thr) were not detectable in this experiment.

Separation of listeriae from *C. elegans* and *E. coli*

As a prerequisite to analysis of metabolic fluxes *in vivo*, we established a method to separate *L. monocytogenes* cells from the nematode. Fully ^{15}N -labelled nematodes ([^{15}N]-*C. elegans*) were infected with *L. monocytogenes* EGD-e. To obtain higher listerial counts in the worms, infection was performed for 2 days instead of 4 h. *Caenorhabditis elegans* was grown on unlabelled *E. coli* OP50 for a further 3 days to allow proliferation of *L. monocytogenes* in the worm's intestine. The worms

were homogenized as described in the legend of Fig. 2. Nematodal debris was removed from the beads by repeated washing with 500 μl of M9 buffer containing 0.1% Triton X-100. The debris was pelleted by centrifugation at $10^4 \times g$, and the supernatant was filtered (pore size 10 μm and 3 μm) to remove nematodal cells. The filtrate was pelleted (6 min, $6654 \times g$), resuspended in 2 ml of PBS containing 0.5% biotin-free albumin fraction V (Carl Roth, Karlsruhe, Germany), and used for subsequent immunomagnetic separation with the MACS cell separation system (Miltenyi Biotech, Auburn, CA) according to Dai and colleagues (2011) using biotin-conjugated anti-*Listeria* sp. antibody (ViroStat, Portland, ME).

As a control for this step, worms were infected with strain EGD-e cGFP, which constitutively expresses GFP. The bacterial pellet isolated from *C. elegans* after 2 days of infection and 3 days of proliferation on plates with OP50 was analysed by fluorescence microscopy, confirming that the pellet was composed of fluorescent *L. monocytogenes* cells (Fig. S5A). To confirm that *E. coli* OP50 was quantitatively removed, we performed a further control experiment in which the worms were fed with *E. coli* OP50 expressing GFP. No fluorescent bacteria were visible in the microscopic pictures predominantly in the pharynx or afterregion of the worms (Fig. S5B).

Listeriae take up host-derived amino acids while proliferating in *C. elegans*

[^{15}N]-*C. elegans* was infected for 2 days with *L. monocytogenes* EGD-e and fed OP50 for 3 days. Listerial cells were separated from the lysed worms to allow analysis of their amino acids. Labelled ^{15}N atoms were found in all amino acids of *L. monocytogenes* EGD-e in excess rates of 8% to 15% (Fig. 5A). These data indicate that the bacteria took up significant amounts of ^{15}N -containing substrates from the nematode's gut during colonization, in forms such as of oligopeptides or amino acids secreted into the gut lumen or derived from shed epithelial cells. The isotopologue patterns of Lys, His and Arg showed no negligible amounts of these amino acids bearing both ^{14}N and ^{15}N atoms (data not shown), suggesting that the labelled amino acids taken up by the bacteria were incorporated directly into newly synthesized proteins rather than being degraded and used for anabolism of other amino acids.

As a further control, we performed an infection experiment with the following modifications: 24 h instead of 48 h infection with *L. monocytogenes* EGD-e and subsequent separation of bacteria from the worms directly after feeding on listerial lawns. Under these conditions, *C. elegans* continuously took up *L. monocytogenes* in excess of the amounts of listeriae colonizing the nematode's gut. As expected, we measured very low ^{15}N

enrichments in amino acids of EGD-e of 4% (Glu, Thr) to 12% (His) (Fig. S6) resembling those obtained after 2 days of infection and 3 days of proliferation on *E. coli*. This excludes pellet contamination with nematodal proteins that would have resulted in much higher ^{15}N enrichment rates (50% after 1 day, Fig. 4B) in the amino acids measured.

Bacterial amino acids are the main N source of EGD-e during growth in nematodes

Given that only a minority of N atoms in the listerial proteins was derived from the host, we varied the experimental setup and investigated the extent to which *L. monocytogenes* makes use of the nematodal gut metabolites derived from the lysis of *E. coli* OP50. Unlabelled *C. elegans* worms were infected with *L. monocytogenes* EGD-e for 2 days and then exposed to [^{15}N]-OP50 for 3 days. Listerial cells were isolated and their amino acids were measured with GC-MS. ^{15}N enrichment in bacterial proteins resulted in values of approximately 32% to 46% (Fig. 5B). The isotopologue patterns of Lys, His and Arg revealed complete labelling (M+2, M+3 and M+4, respectively) of these amino acids, thus resembling the pattern observed in the experiment with infected [^{15}N]-*C. elegans* (data not shown). We conclude that the intestinal contents of *C. elegans* are the main nitrogen source of *L. monocytogenes* while it proliferates in the worm's intestine.

Conclusion

Our results show that during infection of a nematode, *L. monocytogenes* predominately uses nutrients derived from *E. coli*, which are continuously taken up and lysed by the worm, thus providing a nitrogen-rich and readily available food source during proliferation in the nematode's gut. An intriguing observation, however, is that listeriae also use nutrients from the host that are released into the worm's gut or are more directly transferred from the host to the bacterium, which closely interacts with epithelial cells during colonization. Such an acquisition of host compounds resembles that of members of the mice microbiota as demonstrated recently in a study using ^{15}N threonine (Berry *et al.*, 2013). Listeriae do not appear to use nitrogen sources from *C. elegans* such as ammonium (and thus of ethanolamine and glucosamine) or glutamine, because their assimilation would have resulted in mixed isotopologue patterns of the listerial amino acids that was not detected in our study. Instead, *L. monocytogenes* utilizes amino acids by direct incorporation into proteins. This nutrition strategy based on the uptake of peptides and amino acids is also observed with intracellularly replicating listeriae, which preferentially incorporate amino

acids into proteins instead of catabolizing them, possibly due to a shortage of essential catabolic intermediates and/or cofactors required for the biosynthesis of amino acids (Grubmüller *et al.*, 2014). This finding again stresses the role of peptides, amino acids and their transporters in nitrogen acquisition by listeriae during infection of either an invertebrate or a mammal.

Acknowledgements

We thank Angela Felsl for excellent technical assistance; Britta Spanier and members of the worm community forum (<http://forums.wormbase.org/>) for helpful discussions, Pascale Cossart for providing strain EGD-e cGFP; the Caenorhabditis Genetics Center, Minneapolis, Minnesota, USA, for nematode strains; and the German Research Foundation (Deutsche Forschungsgemeinschaft, DFG) for financial support of this study (FU375/7-1, FU375/7-2, EI384/6-1 and EI384/6-2).

References

- Aballay, A., Yorgey, P., and Ausubel, F.M. (2000) *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **10**: 1539–1542.
- Anderson, G.L., Kenney, S.J., Millner, P.D., Beuchat, L.R., and Williams, P.L. (2006) Shedding of foodborne pathogens by *Caenorhabditis elegans* in compost-amended and unamended soil. *Food Microbiol* **23**: 146–153.
- Austin, J., and Kimble, J. (1987) *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**: 589–599.
- Balestrino, D., Hamon, M.A., Dortet, L., Nahori, M.A., Pizarro-Cerda, J., Alignani, D., *et al.* (2010) Single-cell techniques using chromosomally tagged fluorescent bacteria to study *Listeria monocytogenes* infection processes. *Appl Environ Microbiol* **76**: 3625–3636.
- Begun, J., Gaiani, J.M., Rohde, H., Mack, D., Calderwood, S.B., Ausubel, F.M., and Sifri, C.D. (2007) Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* **3**: e57.
- Bergmann, B., Raffelsbauer, D., Kuhn, M., Goetz, M., Hom, S., and Goebel, W. (2002) InlA- but not InlB-mediated internalization of *Listeria monocytogenes* by non-phagocytic mammalian cells needs the support of other internalins. *Mol Microbiol* **43**: 557–570.
- Berry, D., Stecher, B., Schintlmeister, A., and other authors (2013) Host-compound foraging by intestinal microbiota revealed by single-cell stable isotope probing. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 4720–4725.
- Borezee, E., Pellegrini, E., and Berche, P. (2000) OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect Immun* **68**: 7069–7077.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., and Glaser, P. (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for

28 T. Kern, E. Kutzner, W. Eisenreich and T. M. Fuchs

- evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**: 207–213.
- Caldwell, K.N., Adler, B.B., Anderson, G.L., Williams, P.L., and Beuchat, L.R. (2003) Ingestion of *Salmonella enterica* serotype Poona by a free-living nematode, *Caenorhabditis elegans*, and protection against inactivation by produce sanitizers. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4103–4110.
- Chico-Calero, I., Suarez, M., Gonzalez-Zorn, B., Scortti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., and Vazquez-Boland, J.A. (2002) Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 431–436.
- Dai, D., Holder, D., Raskin, L., and Xi, C. (2011) Separation of the bacterial species, *Escherichia coli*, from mixed-species microbial communities for transcriptome analysis. *BMC Microbiol* **11**: 59.
- Darby, C., Cosma, C.L., Thomas, J.H., and Manoel, C. (1999) Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 15202–15207.
- Dramsai, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P., and Cossart, P. (1995) Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of *inlB*, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**: 251–261.
- Engelbrecht, F., Chun, S.K., Ochs, C., Hess, J., Lottspeich, F., Goebel, W., and Sokolovic, Z. (1996) A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. *Mol Microbiol* **21**: 823–837.
- Eylert, E., Schar, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W. (2008) Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol* **69**: 1008–1017.
- Fisher, S.H. (1999) Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Mol Microbiol* **32**: 223–232.
- Freitag, N.E., Port, G.C., and Miner, M.D. (2009) *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat Rev Microbiol* **7**: 623–628.
- Fuchs, T.M., Eisenreich, W., Kern, T., and Dandekar, T. (2012) Towards a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection. *Front Microbiol* **3**: 137–143.
- Gaillard, J.L., Berche, P., Frehel, C., Gouin, E., and Cossart, P. (1991) Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**: 1127–1141.
- Garsin, D.A., Sifri, C.D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K.V., Murray, B.E., et al. (2001) A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10892–10897.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., and other authors (2001) Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**: 849–852.
- Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahori, M.A., Villiers, V., Colland, F., et al. (2010) The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I κ B kinase subunit IKK α . *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 17333–17338.
- Gouw, J.W., Tops, B.B., and Krijgsveld, J. (2011) Metabolic labeling of model organisms using heavy nitrogen (15 N). *Methods Mol Biol* **753**: 29–42.
- Gray, M.L., and Killinger, A.H. (1966) *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* **30**: 309–382.
- Greiffenberg, L., Sokolovic, Z., Schnittler, H.J., Spory, A., Bockmann, R., Goebel, W., and Kuhn, M. (1997) *Listeria monocytogenes*-infected human umbilical vein endothelial cells: internalin-independent invasion, intracellular growth, movement, and host cell responses. *FEMS Microbiol Lett* **157**: 163–170.
- Grubmüller, S., Schauer, K., Goebel, W., Fuchs, T.M., and Eisenreich, W. (2014) Analysis of carbon substrates used by *Listeria monocytogenes* during growth in J774A.1 macrophages suggests a bipartite intracellular metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 1–24.
- Guha, S., Klees, M., Wang, X., Li, J., Dong, Y., and Cao, M. (2013) Influence of planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* on *Caenorhabditis elegans*. *Arch Microbiol* **195**: 19–26.
- Joseph, B., and Goebel, W. (2007) Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* **9**: 1188–1195.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stuhler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T.M., and Goebel, W. (2006) Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* **188**: 556–568.
- Kern, T., Kutzner, E., Eisenreich, W., and Fuchs, T.M. (2015) Usage of multiple nitrogen substrates by *Listeria monocytogenes*. Resubmission to *Mol Microbiol* in preparation.
- Krijgsveld, J., Ketting, R.F., Mahmoudi, T., Johansen, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C.P., et al. (2003) Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nature Biotech* **21**: 927–931.
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillaud, C., Kurz, C.L., and Ewbank, J.J. (2000) *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol* **10**: 1543–1545.
- Lang Halter, E., Neuhaus, K., and Scherer, S. (2013) *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**: 641–647.
- Maadani, A., Fox, K.A., Mylonakis, E., and Garsin, D.A. (2007) *Enterococcus faecalis* mutations affecting virulence in the *Caenorhabditis elegans* model host. *Infect Immun* **75**: 2634–2637.
- Marroquin, L.D., Elyassnia, D., Griffiths, J.S., Feitelson, J.S., and Aroian, R.V. (2000) *Bacillus thuringiensis* (Bt) toxin susceptibility and isolation of resistance mutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **155**: 1693–1699.
- Mitchell, D.H., Stiles, J.W., Santelli, J., and Sanadi, D.R. (1979) Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J Gerontol* **34**: 28–36.
- Neuhaus, K., Satorhelyi, P., Schauer, K., Scherer, S., and Fuchs, T.M. (2013) Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces prfA, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **14**: 285.

- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., *et al.* (1998) The gene cluster *inC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* **260**: 144–158.
- Rothstein, M. (1963) Nematode biochemistry. III. Excretion products *Comp Biochem Physiol* **9B**: 51–59.
- Rothstein, M. (1965) Nematode biochemistry. V. Intermediary metabolism and amino acid interconversions in *Caenorhabditis briggsae*. *Comp Biochem Physiol* **14B**: 541–552.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C.G., and Hill, C. (2009) Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ Microbiol* **11**: 432–445.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schauer, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T., and Fuchs, T.M. (2010) Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* **11**: 573.
- Sifri, C.D., Begun, J., and Ausubel, F.M. (2005) The worm has turned – microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol* **13**: 119–127.
- Spanier, B., Lasch, K., Marsch, S., Benner, J., Liao, W., Hu, H., *et al.* (2009) How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* **4**: e6279.
- Spanier, B., Starke, M., Higel, F., Scherer, S., and Fuchs, T.M. (2010) *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6277–6285.
- Staib, L., and Fuchs, T.M. (2014) From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology* **160**: 1020–1039.
- Stiernagle, T. (1999) Maintenance of *C. elegans*. In *C. elegans. A Practical Approach*. Hope, I.A. (ed.). Oxford, UK: Oxford University Press, pp. 51–67.
- Styer, K.L., Hopkins, G.W., Bartra, S.S., Plano, G.V., Frothingham, R., and Aballay, A. (2005) *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO Rep* **6**: 992–997.
- Thomsen, L.E., Slutz, S.S., Tan, M.W., and Ingmer, H. (2006) *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 1700–1701.
- Vazquez-Boland, J.A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., *et al.* (2001) *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**: 584–640.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

Fig. S1. FUDR prevents bacterial proliferation in *C. elegans*. The cfu of *L. monocytogenes* EGD-e after 4 h of infection and 5 days of proliferation in *C. elegans* on OP50 NGM plates with or without the addition of 10 μ M FUDR. The mean values of three biological replicates are shown; $P = 0.0016$.

Fig. S2. Proliferation of *L. monocytogenes* EGD-e in *C. elegans* N2. The worms were infected for 4 h, washed and then transferred back to the plates with *E. coli* OP50. The worms were transferred to new OP50 NGM plates daily for separation from their progeny. At each time point, the aliquots of 10 worms were washed, lysed and plated on selective agar to count living bacteria. Each experiment was performed in triplicate. The mean values and their standard deviations are indicated.

Fig. S3. Internalins are not important for the colonization of the worm. The cfu of *L. monocytogenes* EGD-e and different mutant strains after 4 h of infection and 5 days of proliferation in *C. elegans* on OP50 NGM plates. The mean values of three biological replicates are shown. Differences are not significant ($P = 0.7481$ by one-way analysis of variance).

Fig. S4. Isotopologue pattern during delabelling of the worm. Relative isotopologue distribution of ^{15}N -labelled *C. elegans* amino acids His, Lys and Arg after the indicating days of feeding on unlabelled *E. coli* OP50. The mean values of three technical replicates are indicated.

Fig. S5. Microscopic surveillance of the separation procedure.

A. Image of a pellet isolated via immunomagnetic separation from *C. elegans* infected with *L. monocytogenes* EGD-e cGFP. From top to bottom, brightfield and green fluorescence images, and an overlay of both, are shown; 1000 \times magnification.

B. As a control, nematodes were not infected but fed on *E. coli* OP50/pGFP. Shown is a brightfield (left) and an overlay (right) of autofluorescence (red) of the worms; 200 \times magnification.

Fig. S6. ^{15}N enrichment in listerial amino acids after 1 day of infection. The nematodes were incubated on BHI plates with lawns of EGD-e cells for 24 h. The worms were then washed and lysed, and listerial cells were isolated. GC-MS measurement resulted in low ^{15}N enrichment rates of 4% to 12%.

Fig. S1

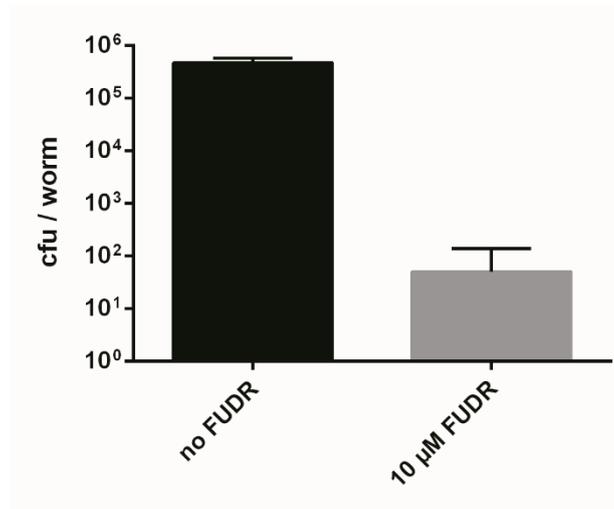


Fig. S2

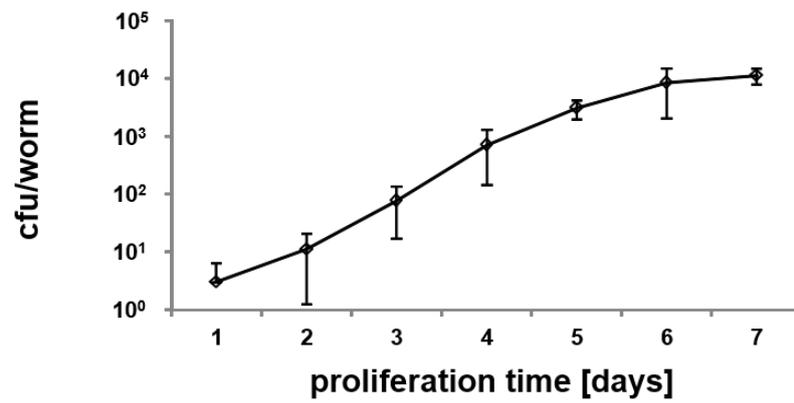


Fig. S3

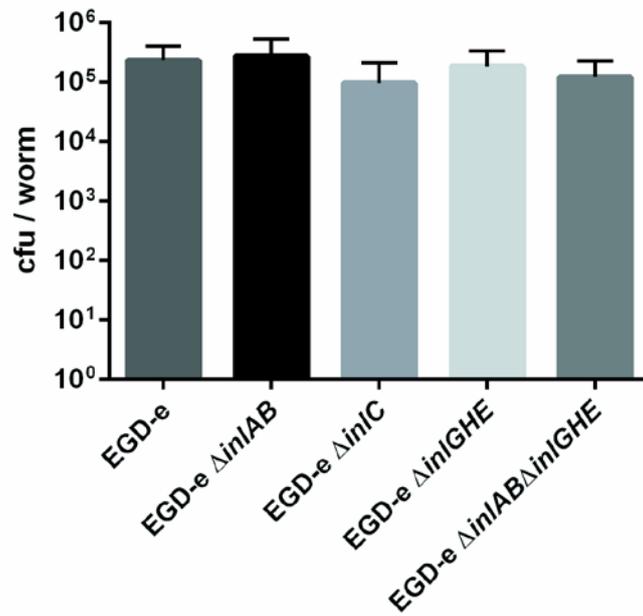


Fig. S4

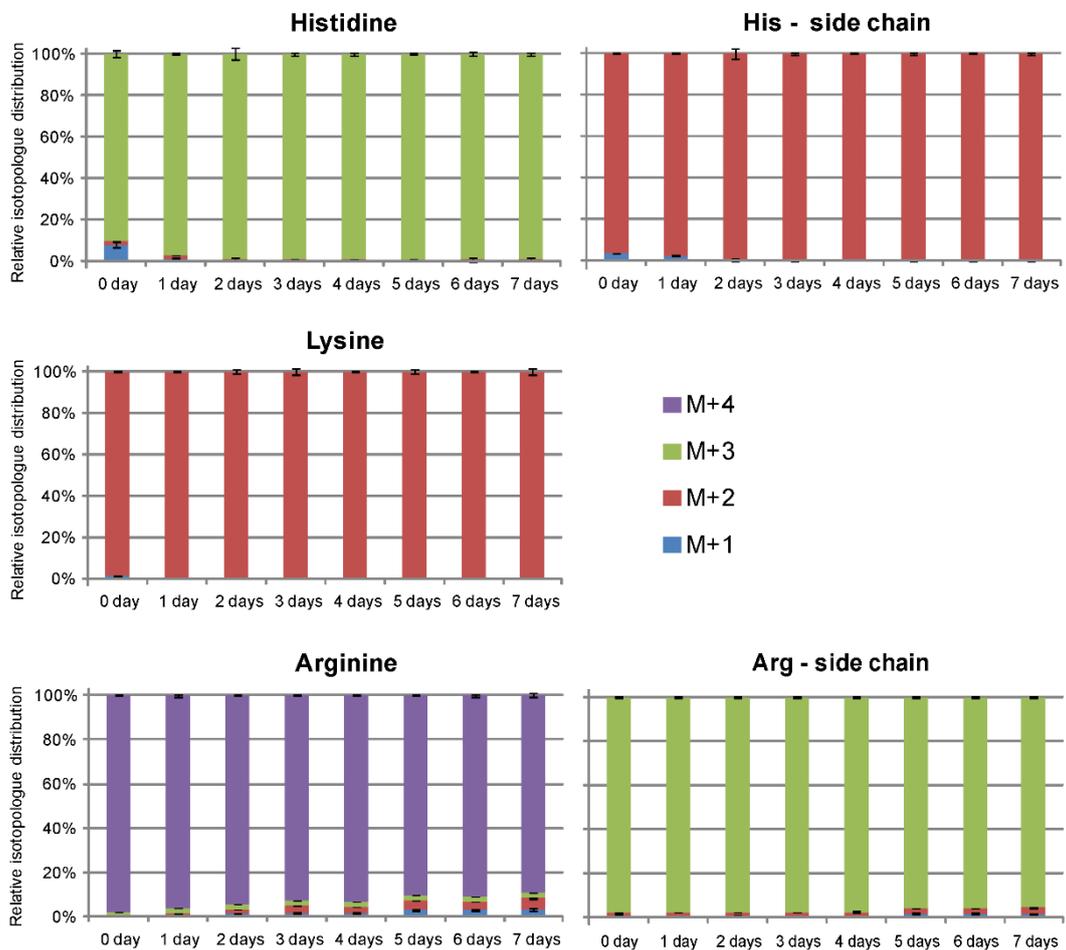


Fig. S5

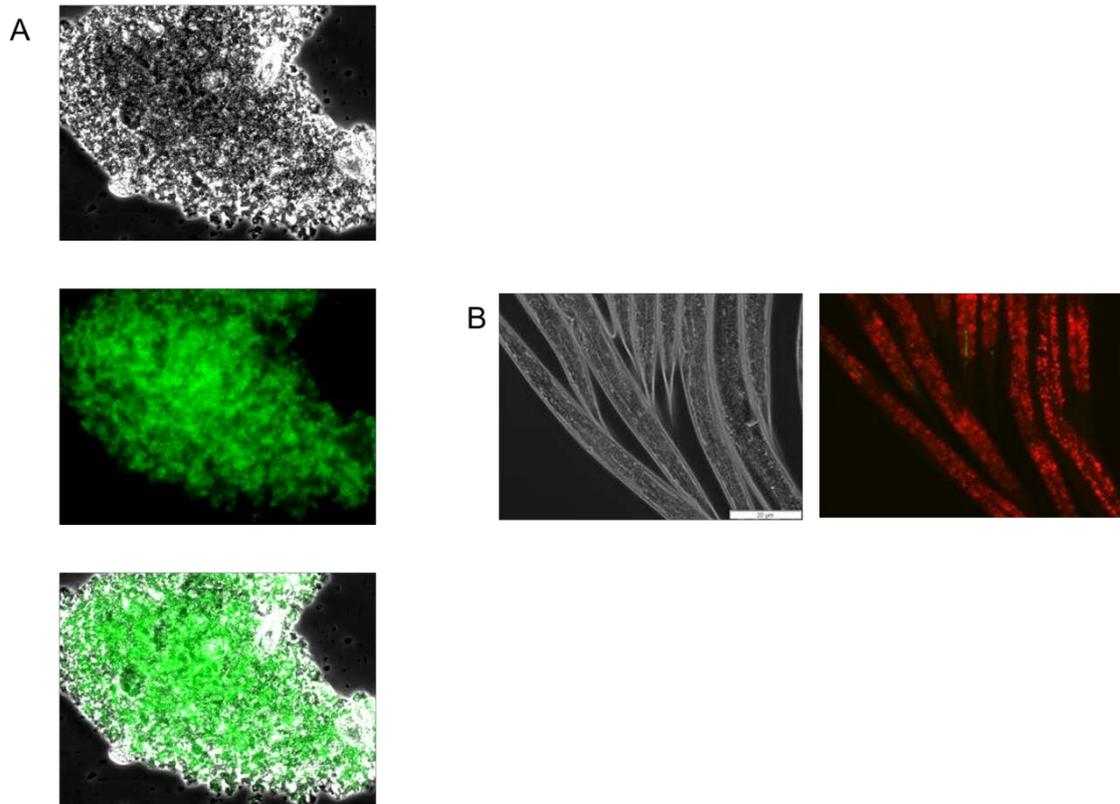
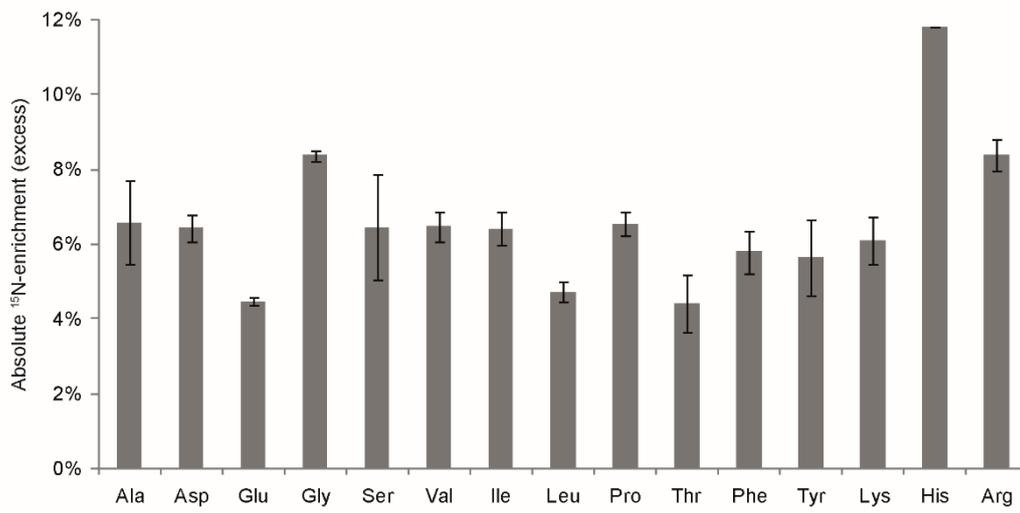


Fig S6



2.3 **Publikation 3:** Toward a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection

Der in der gesamten Arbeit beschriebene und diskutierte Stand der Forschung basiert teilweise auf dem im Folgenden eingebundenen Übersichtsartikel Fuchs *et al.* (2012).



Toward a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection

Thilo M. Fuchs^{1,2*}, Wolfgang Eisenreich³, Tanja Kern¹ and Thomas Dandekar⁴

¹ Abteilung Mikrobiologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Technische Universität München, Freising, Germany

² Lehrstuhl für Mikrobielle Ökologie, Department Biowissenschaften, Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Technische Universität München, Freising, Germany

³ Lehrstuhl für Biochemie, Technische Universität München, Garching, Germany

⁴ Abteilung Bioinformatik, Theodor-Boveri-Institut (Biozentrum), Universität Würzburg, Würzburg, Germany

Edited by:

Reinhard Guthke, Leibniz-Institute for Natural Product Research and Infection Biology – Hans-Knoell-Institute, Germany

Reviewed by:

Guoku Hu, Creighton University, USA
Conor P. O'Byrne, NUI Galway, Ireland

*Correspondence:

Thilo M. Fuchs, Abteilung Mikrobiologie, Zentralinstitut für Ernährungs- und Lebensmittelforschung, Technische Universität München, Weihenstephaner Berg 3, 85350 Freising, Germany.
e-mail: thilo.fuchs@wzw.tum.de

Listeria monocytogenes is a foodborne human pathogen that can cause invasive infection in susceptible animals and humans. For proliferation within hosts, this facultative intracellular pathogen uses a reservoir of specific metabolic pathways, transporter, and enzymatic functions whose expression requires the coordinated activity of a complex regulatory network. The highly adapted metabolism of *L. monocytogenes* strongly depends on the nutrient composition of various milieus encountered during infection. Transcriptomic and proteomic studies revealed the spatial-temporal dynamic of gene expression of this pathogen during replication within cultured cells or *in vivo*. Metabolic clues are the utilization of unusual C₂- and C₃-bodies, the metabolism of pyruvate, thiamine availability, the uptake of peptides, the acquisition or biosynthesis of certain amino acids, and the degradation of glucose-phosphate via the pentose phosphate pathway. These examples illustrate the interference of *in vivo* conditions with energy, carbon, and nitrogen metabolism, thus affecting listerial growth. The exploitation, analysis, and modeling of the available data sets served as a first attempt to a systemic understanding of listerial metabolism during infection. *L. monocytogenes* might serve as a model organism for systems biology of a Gram-positive, facultative intracellular bacterium.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, infection, metabolism, systems biology, modeling, intracellular

INTRODUCTION

A successful infection by bacterial pathogens requires multiple adaptation processes including adhesion to host tissues, modulation of the immune response, or toxic activity toward the host defense system. Some pathogens enter epithelial cells or are internalized by professional phagocytes, and these steps are often followed by bacterial manipulation of the host cell actin skeleton and the manipulation of the endocytic route. Most of these processes, which often require specific virulence factors that enable the microbes to overcome the various physical and biochemical barriers of the infected host, have been characterized in detail.

In contrast, little attention has been given to the metabolic requirements and the metabolic flexibility of bacteria during infection, in parts due to limitation of analytical tools, and because the bacterial metabolism *in vivo* and *in vitro* has erroneously been assumed to be similar (Muñoz-Ellás and McKinney, 2006). Therefore, our knowledge about the substrates used by pathogens during infection, and, equally important, the effect of a bacterial infection on the metabolism of the host cell is still fragmentary (Joseph and Goebel, 2007; Fuchs et al., 2011; Rohmer et al., 2011). Furthermore, the structural conservation of metabolic enzymes was considered

to prevent the identification of microbe-specific inhibitors. Key metabolic enzymes, however, that are specifically required during growth within host cells could constitute a promising new set of possible targets for antibacterial compounds urgently needed or be used for the development of food formulas that suppress growth of pathogenic bacteria (Boigegrain et al., 2005; Becker et al., 2006; Liautard et al., 2006). Recent progress has been made in determining the major carbon sources used by intracellularly replicating pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, and pathogenic *Escherichia coli* (Lucchini et al., 2005; Eylert et al., 2008; Götz and Goebel, 2010; Götz et al., 2010). These data suggest that pathogens, in order to efficiently replicate within a host or its cells, have to coordinate their metabolism with the availability of nutrients during their life cycle (for review, see Eisenreich et al., 2010).

Listeria monocytogenes is a Gram-positive pathogen that mainly affects immunocompromised individuals, pregnant women, and newborns. Severe infections are characterized by bacteremia, meningoenzephalitis, abortion, or neonatal sepsis. The most common vehicles of transmission of this saprophytic bacterium to humans are dairy products and other foods including eggs, seafood, and vegetables. Three hundred eighty-six documented cases of listeriosis were reported for 2010 in Germany (Robert Koch-Institut, 2011), and about 1600 in the USA (Centers for Disease Control and Prevention, 2011). The high lethality rate of up to 20–30% despite early antibiotic treatment resulted in

Abbreviations: σ^E , sigma factor; BCCAAs, branched-chain amino acids; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; Hly, listeriolysin; IPA, isotopolog profiling analysis; Pdh, pyruvate dehydrogenase; PlcA/PlcB, phospholipase A/B; PPP, pentose phosphate pathway; PrfA, positive regulatory factor A.

increasing efforts to understand listerial pathogenicity and to find tools against this pathogen (Vázquez-Boland et al., 2001).

Upon uptake by contaminated food, *L. monocytogenes* enter non-phagocytic cells such as epithelial cells, hepatocytes, or fibroblasts by the activity of the surface-associated internalins A and B. In contrast to other facultative intracellular pathogens like *Salmonella*, a hallmark of *L. monocytogenes* is that it is capable to escape from the phagocytic vacuole by disrupting the phagosomal membrane via the expression of listeriolysin (Hly) and phospholipase A (PlcA). Listerial cells thus access the host cell cytoplasm where they are not only able to replicate, but also to actively move by actin polymerization mediated by ActA. Cell-to-cell spreading and subsequent disruption of the vacuolar double-membrane by Hly and PlcB has also been observed. Having passed the gut epithelium, *L. monocytogenes* is capable to resist killing by professional phagocytes. It might disseminate via the lymph and the blood to the liver and the spleen and even cross the blood-brain or the blood-placenta barrier. All main virulence factors are under control of the positive regulatory factor A (PrfA; for more details, see reviews such as Vázquez-Boland et al., 2001; Dussurget et al., 2004; Hamon et al., 2006; Cossart and Toledo-Arana, 2008; Camejo et al., 2011).

Here, we will summarize recent omic-studies relevant for the topic of listerial metabolism during infection, and introduce isotopolog profiling analysis (IPA) as a technique that allows novel insights in metabolic fluxes during infection. Then, metabolic adaptations and requirement of *L. monocytogenes* in cultured cells and *in vivo*, as well as the underlying regulatory factors, will be resumed. Modeling approaches as further tools that pave the way toward a systems level understanding of listerial metabolism during infection will be presented, followed by challenges and future perspectives in this research field.

OMIC-APPROACHES TO DELINEATE METABOLIC TRAITS RELEVANT FOR INFECTION

So far, mainly two strategies have been followed to improve our systemic understanding of metabolic adaptations by listeriae within host compartments: firstly, the differences between the transcriptomes and the proteomes of apathogenic and pathogenic strains, and secondly the analysis of differential gene expression upon the transition from one physiologically relevant condition to another.

COMPARATIVE APPROACHES

Comparative genomics is important to identify factors and pathways contributing to virulence properties, both on the genus level with insights into host specificities and on the species level regarding the biodiversity of certain bacterial lineages (Zhao et al., 2011). Detection of differences between the genomes of *L. monocytogenes* and the apathogenic species *L. innocua* gave first insights into the reasons that cause a *Listeria* species to be pathogenic (Buchrieser et al., 2003). In a triple analysis involving the whole genome sequences of *L. monocytogenes*, *L. welshimeri*, and *L. innocua*, it was shown that genome reduction led to the apathogenic *L. welshimeri*, the latter being derived from early evolutionary events. This finding points to an ancestor more compact than *L. monocytogenes* (Hain et al., 2006).

However, the genetic equipment itself does not sufficiently describe differences of more closely related strains with respect

to their virulence properties. Several proteomic approaches have been performed in the context of listerial adaption to the host environment, thus contributing to the systemic understanding of metabolism during infection (Cabanes et al., 2011). A comparative *in vitro* proteomic approach investigated the protein expression profiles of *L. monocytogenes* and *L. innocua* with a focus on the secretome of both species (Trost et al., 2005). *In vitro* comparative transcriptome analysis of *L. monocytogenes* strains revealed differences of the two major lineages/serovar 1/2a, and serovars 4b and 1/2b including stress-related sigma factor B (see below) and virulence factors (Severino et al., 2007). Related studies analyzed the secreted proteomes of *L. monocytogenes* strains belonging to serovars 4b, 1/2b, and 1/2a (Dumas et al., 2008, 2009a,b). Due to the identification of factors possibly involved in substrate degradation, those studies might reveal novel insight into the listerial metabolism *in vivo*. Donaldson et al. (2011) focused on proteome differences between an avirulent and two virulent *L. monocytogenes* strains representing the two lineages mentioned above. Their data revealed that most proteins of the intermediary metabolism are stronger expressed in pathogenic strains in comparison to apathogenic strains. Comparison between the two virulent serovars also revealed metabolic differences in their intramacrophagic proteome, possibly reflecting unequal proliferation rates (Donaldson et al., 2009).

TRANSITION STUDIES

Two pilot studies had investigated the transcriptome of *L. monocytogenes* infecting human epithelial (Caco-2) cells and the murine macrophage cell line P388D1. Both studies revealed that up to 19% of the listerial genes are differentially expressed in comparison to their level of transcription in BHI medium (Chatterjee et al., 2006; Joseph et al., 2006). Differences in the results point to cell-specific metabolic adaptations during the intracellular replication of *L. monocytogenes*, whereas common findings support the assumption that several metabolic traits play a central role for listerial replication *in vivo* (see below). The analysis of the proteome of *L. monocytogenes* strain EGDe replicating in macrophages demonstrated the upregulation of specific metabolic pathways (van de Velde et al., 2009). An *in vitro* proteomic study revealed global changes in gene expression when *L. monocytogenes* enters stationary phase, a growth condition also relevant *in vivo* (Weeks et al., 2004). These data clearly indicate that specific metabolic adaptations significantly contribute to the capability of pathogens to replicate within macrophages.

The analysis of the bacterial response to changing conditions *in vitro* also elucidates the dynamic of metabolism *in vivo*. Wen et al. (2011) investigated the reversible transition from the bacilli-like to the cocci-morphology in the long-term-survival (LTS) phase of *L. monocytogenes* serotype 4b strain F2365 at different growth stages in tryptic soy broth with yeast extract (TSBYE). Transcriptome analysis identified 225 differentially expressed genes (≥ 4 -fold; $P < 0.05$) with the upregulation of metabolic genes including those involved in the synthesis of branched-chain amino acids (BCAAs). Combined treatment with potassium lactate and sodium diacetate led to altered metabolism, including a shift toward fermentative production of acetoin (Stasiewicz et al., 2011).

POWER OF ISOTOPOLOG PERTURBATION STUDIES FOR SYSTEMS BIOLOGY OF INFECTION

The study of biosynthetic pathways and fluxes under *in vivo* conditions is crucial to understand the metabolism and physiology of microorganisms on a systems level (Winder et al., 2011). While many important features on metabolism can be deduced on the basis of genome sequences, RNA transcripts, protein and metabolite profiles, and numeric modeling, the direct observation of metabolic pathways and fluxes during listerial growth in eukaryotic host cells has long been hampered by the lack of an adequate technology. One of the recent methods for the quantitative analysis of metabolite fluxes throughout biological systems is based on growing infected host cells in medium containing stable isotope labeled nutrients (Eylert et al., 2008). For heterotrophic organisms including pathogenic bacteria such as *L. monocytogenes* and their eukaryotic host cells, simple carbohydrates, amino acids, and glycerol are among the typical carbon sources and, therefore, serve as suitable tracers in these labeling studies.

Any perturbation of the natural isotope equilibrium by the supply of such an isotope enriched compound will naturally spread in the experimental system via a large number of enzyme catalyzed reactions. In other words, a broad spectrum of biosynthetic pathways (if not all) is covered by this experimental approach. As a consequence, comprehensive information about the nature and the dynamics of the metabolic network can be obtained. Analytical methods to monitor the distribution of the stable isotope (e.g., ^{13}C) in biosynthetic products are NMR spectroscopy and/or mass spectrometry typically coupled with gas chromatography (GC/MS). Both methods have their specific advantages and disadvantages. Mass spectrometry is a well-established tool to determine isotopolog patterns in amino acids at adequate sensitivity (Zamboni et al., 2009). Signals with high signal-to-noise ratio can be obtained even with small sample amounts, i.e., 10^8 bacterial cells or 1 mg of dry cell pellet is sufficient for the measurement of protein bound amino acids (Eisenreich et al., 2010).

After protein hydrolysis, the resulting amino acids are converted into *tert*-butyldimethylsilyl-derivatives (TBDMS amino acids). On the basis of the mass patterns, the relative fractions of isotopomers (i.e., molecular ions or fragments thereof comprising a defined number of ^{13}C -atoms) can be determined for approximately 50 mass fragments of 15 TBDMS amino acids under realistic conditions. However, from these analytes only 29 fragments of 12 different TBDMS amino acids (glycine, alanine, serine, aspartate, threonine, glutamate, valine, leucine, isoleucine, methionine, tyrosine, and phenylalanine) meet the demands for a reliable isotopomer quantification (Antoniewicz et al., 2007). Only 13 fragments comprise all carbon atoms of the original amino acids (i.e., for glycine, alanine, serine, aspartate, threonine, glutamate, proline, methionine, valine, lysine, histidine, phenylalanine, and tyrosine), whereas all other fragments are observed after loss of one or more carbon atoms from the original amino acid. For most TBDMS amino acids, fragments are detected where C-1 (the carboxylic atom) has been lost during the ionization. Provided that the labeling strategy had generated specific profiles in all of these fragments, the biosynthetic pathways leading to the analyzed amino acids can be identified in typical studies. Moreover, the same data can be used to predict the patterns in the precursors for

the respective amino acids as a basis to elucidate the fluxes in the central intermediary metabolisms. For accurate data, the overall ^{13}C -enrichment should be at least 0.2%; better results are obtained with enrichments >1%.

Notably, the measurements can be done in a high throughput manner by automated systems, albeit data processing, and interpretation still need considerable efforts by expert users even when supported by the available software to deconvolute isotopolog enrichments from the original data. Considering the isotope fractions in the molecular masses of the original metabolites and one or more fragments thereof, some limited information can be gleaned about the positional distribution of the ^{13}C -label. However, the positional resolution is still low in comparison with isotopolog profiling by NMR spectroscopy that, in turn, is worse in sensitivity (Eisenreich and Bacher, 2007). Nevertheless, the isotopomer patterns in amino acids detected by GC/MS already reveal considerable information about the carbon fluxes in the bacterial cells and their hosts (see below).

When more than 10^{12} bacterial cells are available (>10 mg of dry cell pellet), one- and two-dimensional NMR spectroscopy can be used in addition to GC/MS. Indeed, high-resolution ^{13}C -NMR spectroscopy is capable to assess ^{13}C -enrichment for each non-equivalent carbon atom of a metabolite under study. Isotopomers carrying one ^{13}C -atom at different positions display completely different ^{13}C -NMR spectra with singlet signals at the chemical shifts for the respective labeled carbon atoms. Notably, this is in sharp contrast to mass spectrometry, where each of these isotopomers gives rise to identical signals due to the identical molecular masses. The same holds true for multiply ^{13}C -labeled isotopologs. Whereas the mass spectra only show the sum of all isotopologs comprising two or more ^{13}C -atoms, respectively, these isotopologs can be better distinguished by NMR spectroscopy. Due to scalar ^{13}C - ^{13}C couplings, the ^{13}C -NMR signals of a multiply ^{13}C -labeled metabolite appear as specific multiplets in the spectra.

On the basis of the ^{13}C -NMR coupling signatures observed for every single (non-equivalent) carbon atom in a ^{13}C -labeled compound, information on the abundance of ^{12}C and ^{13}C at the respective neighbored carbon atoms is obtained (i.e., in a framework comprising not more than three to four bonds around the index atom). As a result, a set of isotopolog groups can be identified for each ^{13}C -NMR signal. On the basis of the signal intensities (i.e., by deconvolution of the complex coupling patterns providing integral values for each component in the ^{13}C -NMR multiplets), these sets are quantified. For most very small non-symmetrical molecules (i.e., comprising not more than three carbon atoms), all isotopomers/isotopologs display specific NMR signal patterns and can be clearly assigned and quantified on this basis (Eisenreich and Bacher, 2007).

Due to the fact that many of the potential long-range ^{13}C -couplings cannot be completely resolved in the ^{13}C -NMR spectrum of a more complex metabolite (comprising more than three carbon atoms), the observables are typically not sufficient for the direct observation of all individual isotopologs. However, in combination with GC/MS analysis, a sufficient number of constraints can be determined for amino acids to clearly assign molecules with single and multiple labels at adjacent carbon positions. As described below, isotopolog profiling studies have

indeed contributed important and novel insights into the listerial metabolism during infection.

THE INTRACELLULAR NICHE

A hallmark of *L. monocytogenes* is its capability to replicate within host cells. Thus, auxotrophic mutants indicate possible nutrient limitations within a host cell. For example, listerial strains defective in the biosynthesis of aromatic compounds as precursors for menaquinone show a strong attenuation in cell culture and mice infection assays, and a more slightly *in vivo* attenuation was observed for mutants requiring the three aromatic amino acids, threonine, and adenine (Alexander et al., 1993; Marquis et al., 1993; Stritzker et al., 2004). These studies indicate that hosts provide sufficient organic and inorganic compounds to overcome selected auxotrophies. In addition, proteins involved in nucleotide synthesis (PyrD, PyrE, PyrF, and PyrAB) are expressed at a lower level during replication of *L. monocytogenes* within human THP-1 monocytes or macrophages, indicating a sufficient supply of nucleotides from the host cell (Klarsfeld et al., 1994; van de Velde et al., 2009). The reduced replication rate of a *pyrE* mutant in macrophages (Schauer et al., 2010) again might point to specificities of host cell lines with respect to their metabolic status.

The cytosol serves as a compartment that protects pathogens from killing by the host's immune system. Its composition with respect to metabolites is largely unknown, as well as the intracytosolic availability of nutrients. Typically, the cytosol exhibits low concentrations of magnesium, sodium, iron, and calcium ions at neutral pH (reviewed in Ray et al., 2009). In total, up to 100 suitable carbon as well as nitrogen, phosphorus, and sulfur sources are present within eukaryotic cells (Brown et al., 2008). The intracellular milieu is a reducing environment that contains 10 mM reduced glutathione and only 0.5 mM oxidized glutathione (Hwang et al., 1992), a fact important for growth of *L. monocytogenes* that depends on the availability of reduced nitrogen and sulfur sources (Joseph and Goebel, 2007).

It was assumed that facultative intracellular bacteria have developed a balanced strategy to exploit just enough nutrients from the host cell to maintain survival and proliferation in the intracellular niche (Joseph and Goebel, 2007). A prerequisite for such a strategy, however, is that the intracellular compartment is rich in nutrients, a hypothesis for which the following pros and cons might be stated:

Pros: Strikingly, non-pathogenic bacteria such as *Bacillus subtilis* or *E. coli* expressing Hly are able to replicate within the cytosol following phagocytic uptake and escape from the vacuole (Bielecki et al., 1990; Monack and Theriot, 2001). The vacuolar passage, for example by a low pH, might prime the bacterium for intracellular replication since microinjected non-pathogenic *L. innocua*, *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, or *B. subtilis* failed to proliferate within the cytosol (Goetz et al., 2001; Slaghuys et al., 2004; Hain et al., 2008). **Cons:** In case cells are a habitat providing easy access to substrates, much more pathogens beside *L. monocytogenes*, *S. flexneri*, *Burkholderia pseudomallei*, and *Francisella tularensis* would exploit this niche (Ray et al., 2009). Furthermore, all intracellular pathogens exhibit a preference for certain cell types that might depend on differences in the cytosolic nutrient composition. For example, the pathogenic strains EGDe

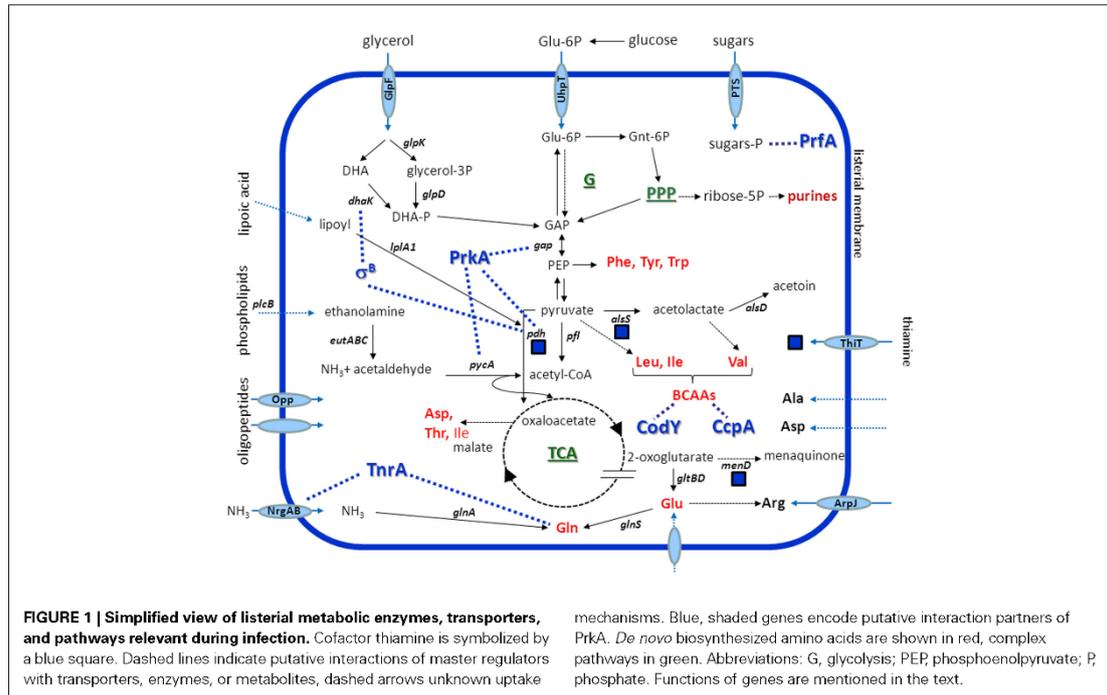
and F2365 could be more metabolically active in J774.1 than in P388D1 macrophages (Chatterjee et al., 2006).

LISTERIAL METABOLISM WITHIN CELLS

Occupation of the intracellular niche plays a pivotal role for *L. monocytogenes* virulence, allowing the pathogen to temporarily escape from the immune system of the host and to initiate systemic infection. The host cell cytosol with cell-specific and dynamic nutrient composition is a complex environment that this intracellular pathogen actively adapts to (Eisenreich et al., 2010). Here, we will resume what is known about the listerial mechanisms of substrate acquisition, and the specific metabolic adaptations of *L. monocytogenes* that allow its successful transition from the extra- to the intracellular milieu (Figure 1).

CARBON SOURCES

The intracellular utilization of glucose or glucose-6-phosphate, but also of non-carbohydrate nutrients such as glycerol and amino acids has been demonstrated by IPA studies (Eylert et al., 2008). A multiple mutant unable to take up and catabolize glycerol due to a lack of GlpF, glycerol kinase (GlpK), glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GlpD), and DhaK is also attenuated in intracellular growth (own unpublished data). This is in line with the upregulation of these genes within the cytoplasm of host cells (Chatterjee et al., 2006; Joseph et al., 2006) and within the intestine of mice (Toledo-Arana et al., 2009). *In vitro*, genes encoding glycolysis enzymes and genes involved in the metabolism and the biosynthesis of BCAA are downregulated, and those required for gluconeogenesis are upregulated in the presence of glycerol. All PrfA-dependent genes show a higher level of transcription under these conditions (Joseph et al., 2008). On the other hand, a strain lacking Hpt, a transporter involved in the exploitation of hexose phosphate from the host cell, is attenuated *in vivo* and within cells, and its gene, *uhpT*, revealed to be highly upregulated during growth in intracellular strains (Chatterjee et al., 2006; Joseph et al., 2006). In addition, the decreased transcription of *hpr* encoding the phosphocarrier protein of a phosphoenolpyruvate (PEP)-dependent phosphotransferase system (PTS) during intraepithelial replication reflects the lower amount of Hpr in the absence of glucose (Asanuma and Hino, 2003). These data support the assumption that glucose-6-phosphate rather than glucose is used for bacterial metabolism within hosts (Chico-Calero et al., 2002). This was confirmed by the observation of carbon catabolite derepression during intracellular growth (Joseph et al., 2006), and the finding that a mutant unable to uptake glucose does not show replication attenuation in macrophages or epithelial cells (Stoll and Goebel, 2010). Instead of glycolysis, the oxidative pentose phosphate pathway (PPP) is assumed to be the predominant pathway of sugar metabolism within host cells, since the genes required for glycolysis are down- and those for PPP are upregulated (Chatterjee et al., 2006; Joseph et al., 2006). The non-oxidative branch of PPP is also upregulated in epithelial cells and results in the production of xylulose- and ribose-5-phosphate as precursors of nucleotide biosynthesis (Chatterjee et al., 2006). This was not supported by proteomic analysis that revealed a decreased abundance of two enzymes of this pathway, namely the transaldolase Imo2743 and ribose-5-phosphate epimerase during listerial replication in



human THP-1 monocytes (van de Velde et al., 2009). This contradiction might be due to cell-type specific metabolite compositions. Another possible explanation was only recently provided by a proteomic comparison between two pathogenic strains EGDe and F2365 of *L. monocytogenes* with the non-pathogenic strain HCC23. The pattern of intermediary metabolism proteins suggests that an initial period of reduced glycolysis during intracellular replication is followed by a resumption of glycolysis (Donaldson et al., 2011).

NITROGEN METABOLISM

Glutamine, convertible to glutamate, is the optimal nitrogen source for *L. monocytogenes in vitro* (Fisher, 1999). Little is known about the *in vivo* nitrogen metabolism of *L. monocytogenes* that is assumed to use ammonium, arginine, and/or ethanolamine as nitrogen sources during intracellular replication (Buchrieser et al., 2003; Joseph et al., 2006; Joseph and Goebel, 2007). NrgAB that is activated by TnrA at low concentrations of nitrogen sources is responsible for the uptake of ammonium ions. Gene *nrgAB* is strongly downregulated within murine macrophages (Chatterjee et al., 2006), but upregulated in human epithelial cells (Joseph et al., 2006). These data again suggest a cell-type dependent availability of nitrogen sources and/or cell-type specific metabolic adaptations of *L. monocytogenes*.

Ethanolamine lyase EutABC has been demonstrated to be required for wildtype-like intracellular replication of *L. monocytogenes* (Joseph et al., 2006). Ethanolamine might be derived from phosphatidylethanolamine by the activity of listerial phospholipases. Thus, phospholipids ubiquitous in host environments

such as the gut might serve as important nitrogen, carbon, and energy source during infection. This hypothesis is in line with the finding that ethanolamine can be utilized under anaerobic conditions only (Price-Carter et al., 2001; Winter et al., 2010; Srikumar and Fuchs, 2011). The role of host peptides in nitrogen metabolism (see below) remains to be investigated in more detail.

AMINO ACID UPTAKE AND *DE NOVO* BIOSYNTHESIS

At least six listerial transporters possibly involved in the uptake of amino acids and oligopeptides were recently identified to contribute to intramacrophagic survival and replication (Joseph et al., 2006; Schauer et al., 2010). Induced expression of the oligopeptide transporter lmo0135–0137 associated with cysteine transport has been demonstrated to contribute to proliferation in Caco-2 cells and *in vivo* (Chatterjee et al., 2006; Schauer et al., 2010). In addition, the oligopeptide permease OppABCD is not only a prerequisite for intramacrophagic growth, but also for full virulence of *L. monocytogenes* in mice (Borezee et al., 2000; Port and Freitag, 2007). These findings support the assumption that *L. monocytogenes* uses intracellular peptides as a source of amino acids (Marquis et al., 1993).

Transcriptomic data showed that genes involved in the biosynthesis of glutamate, glutamine, and arginine belonging to the glutamate family are upregulated during intraepithelial replication of *L. monocytogenes* (Joseph et al., 2006). Similar findings were made for tryptophan and the BCAAs valine, leucine, and isoleucine. BCAAs are among the most abundant amino acids in proteins, and maintaining their pools is a prerequisite for high-level synthesis of

proteins (Sonenshein, 2007). The downregulation of aminoacyl tRNA synthase genes *glyS*, *serS*, *cysS*, *alaS*, *hisS*, *valS*, *thrS*, *ileS*, *leuS*, *tyrS*, and *trpS* suggests that the respective amino acids are available for *L. monocytogenes* within macrophages (Chatterjee et al., 2006). In a pilot study, this hypothesis was at least partially confirmed by ^{13}C -isotopolog profiling experiments, demonstrating that up to 50% of the amino acids alanine, aspartate, and glutamate are recruited from the host cells during intracellular replication of *L. monocytogenes* (Eylert et al., 2008). Results of the same study indicate a restricted anabolism under these conditions since only 7 of 14 amino acids investigated, namely alanine, aspartate, glutamate, serine, threonine, valine, and glycine ordered by decreased ^{13}C -incorporation, were identified to be *de novo* biosynthesized (Eylert et al., 2008).

CENTRAL METABOLISM

A hallmark of the central metabolism of *L. monocytogenes* is the incomplete tricarboxylic acid (TCA) cycle due to a lack of 2-oxoglutarate dehydrogenase as demonstrated by genome analysis and ^{13}C -labeling studies (Glaser et al., 2001; Eisenreich et al., 2006). 2-Oxoglutarate as a substrate of glutamate synthase links carbon and nitrogen metabolism. Vice versa, amino acids such as arginine, proline, and histidine can be converted to 2-oxoglutarate.

It could be demonstrated that oxaloacetate, the direct or indirect precursor of aspartate and threonine, is generated by an anaplerotic reaction afforded by pyruvate carboxylation (Eylert et al., 2008). This reaction is catalyzed by the ATP-dependent pyruvate carboxylase PycA (Schär et al., 2010). The critical role for PycA for proliferation of *L. monocytogenes in vivo* and within epithelial cells or macrophages makes it an interesting candidate for antilisterial compound search (Schindler and Zähner, 1972). It is worth to note that pyruvate is also the precursor for the synthesis of BCAAs that, as demonstrated by several studies cited here, play a pivotal role during intracellular replication of listeriae. Thus, the biosynthesis of BCAAs that is mainly regulated by catabolite control protein A (CcpA) and CodY in an opposite manner also balances the distribution of pyruvate and 2-oxoglutarate (Sonenshein, 2007).

Oxidative decarboxylation of pyruvate results in acetyl-coenzyme A used for the synthesis of valine and leucine, whereas isoleucine is more indirectly derived via pyruvate carboxylation to oxaloacetate as a precursor for aspartate and threonine synthesis. These data suggest a competition of two metabolic pathways important for intracellular replication, namely the biosynthesis of BCAA and the replenishing of the TCA cycle. This metabolic sink might partially be compensated by the increased and decreased expression of several enzymes involved in amino acid metabolism, among them D-alanyl-D-alanine ligase and D-alanine transaminase, an enzyme essential for virulence (Johnson et al., 2004; van de Velde et al., 2009).

COFACTORS

The cofactors riboflavin, thiamine, biotin, and lipoate are supplements of defined growth media for *L. monocytogenes*. The vitamin thiamine is required by enzymes of the central metabolism including Pdh, and the need of its *de novo* biosynthesis by *L. monocytogenes* suggests its intracellular limitation (Schauer

et al., 2009). Its precursors might be derived from glutamine or from 2-oxoglutarate by overexpressed glutamate dehydrogenase (van de Velde et al., 2009). The same authors also argued that the unexpected induced expression of PurQ and PurM results in the formation of 1-(5'-phosphoribosyl)-5-amino-imidazole that might predominantly be used as a thiamine precursor. Indeed, insertional knockout of *purQ* attenuated listerial replication inside macrophages (Schauer et al., 2010). Interestingly, Madeo and coworkers recently identified thiamine to play a yet unknown role in listerial tolerance toward low pH as encountered within host compartments. This was explained by the fact that the thiamine-dependent conversion of pyruvate to acetolactate and further to acetoin comprises two proton-consuming steps (Madeo et al., 2012). The first step is catalyzed by the product of *alsS* induced under acidic conditions (Stasiewicz et al., 2011). The use of host-derived lipoic acid is also relevant for *L. monocytogenes* infection. Lipoyl modification of Pdh subunit E2 by lipoate protein ligase LplA1 was demonstrated to contribute to intracellular replication and virulence of this pathogen (O'Riordan et al., 2003).

METABOLISM OF *L. MONOCYTOGENES IN VIVO*

Fundamental shifts in the expression pattern of genes are involved in the adaptation of listerial metabolism to several host compartments. A comprehensive approach was recently performed using tiling arrays to describe the listerial RNome during transition of *L. monocytogenes* from saprophytism to virulence. To this end, the authors not only studied three physiologically relevant conditions, namely stationary phase, hypoxia, and temperature shifts, but also investigated sigma B (σ^B)- and PrfA-negative mutants (Toledo-Arana et al., 2009). Two PTS required for mannitol and mannose uptake, and ribose-5-phosphate isomerase as part of the non-oxidative PPP are also upregulated in intestine and stationary phase. A remarkable metabolic adaptation to the intestine and the blood is the increased transcription of the gene cluster involved in ethanolamine and 1,2-propanediol utilization including the cofactor cobalamine (see above), of PTS systems for galactitol, fructose, and cellobiose uptake, and of DhaKs involved in glycerol utilization. Interestingly, the gene clusters lmo0315–lmo0318 responsible for thiamine biosynthesis, and lmo1983–1991 involved in the biosynthesis of BCAAs are also upregulated during listerial replication in blood (Toledo-Arana et al., 2009). This resembles previous findings that these metabolic traits are required for intracellular replication (Joseph et al., 2006). In the host intestinal lumen, the authors observed a σ^B -mediated activation of genes, whereas in blood, gene transcription was mainly controlled by PrfA.

Listeria monocytogenes also actively replicates within the spleen of infected mice. Following intravenous application of strain EGDe, 30% of all genes differentially regulated in mice spleen were found to be involved in metabolism (Camejo et al., 2009). Upregulated genes include *uhpT* and, in contrast to epithelial cells and macrophages, genes involved in glycolysis (*gap*, *pgi*, *fbaA*, *pgm*), whereas those involved in the non-oxidative phase of the PPP appeared to be downregulated. Genes involved in the expression of the Pdh complex including its activator, lipoate protein ligase, were induced *in vivo*. The upregulation of genes encoding pyruvate-formate lyase indicates an anoxic degradation of pyruvate to formate and acetyl-CoA in the spleen. The upregulation of

genes responsible for the biosynthesis of aromatic amino acids (*aroA*, *pheA*), of BCAAs and of amino acids of the aspartate and glutamate families is in line with the transcription pattern in epithelial cells and macrophages. An increased expression of mannose-, maltose-, and cellobiose-specific PTS and a decreased expression of PTS responsible for fructose, galactitol, and mannitol uptake was observed. The induction of *glnA* encoding glutamine synthetase might hint to an inactivation of TnrA within the spleen. Remarkably, listerial genes involved in thiamine synthesis are also upregulated during proliferation in mice spleen.

The human intestine is a yet underinvestigated compartment with respect to its impact on bacterial metabolism. Here, *L. monocytogenes* not only encounters predominantly anaerobic conditions as a prerequisite for ethanolamine utilization, but also a higher concentration of carbon dioxide known to act as a signal for bacterial metabolism (Neidhardt et al., 1974; Kröger et al., 2011). It has been hypothesized that the biosynthesis of threonine via oxaloacetate and overexpression of threonine synthase is favored by the high concentration of carbon dioxide (van de Velde et al., 2009). Carbon dioxide is also required for oxidative carboxylation of glucose-6-phosphate, the first reaction in the PPP.

Some of the data on the listerial metabolism in cell culture on the one hand and *in vivo* on the other hand, for example the role of glycolysis, the non-oxidative PPP or the uptake of sugars, are inconsistent. These discrepancies not only indicate to a more active multiplication status in mouse organs compared to cell culture studies using immortal cells (Camejo et al., 2009), but also point to compartment-specific metabolic needs.

REGULATION OF LISTERIAL METABOLISM DURING INFECTION

During invasive infection, *L. monocytogenes* not only proliferates within epithelial cells and macrophages, but encounters a frequent change of the surrounding milieu. Therefore, *in vivo* growth is assumed to require the concerted activity of the following regulators:

CodY, TnrA, AND CcpA

Three global regulators of *L. monocytogenes*, CcpA, TnrA, and CodY sense key metabolites generated in carbon- and nitrogen metabolism (Fisher, 1999; Sonenshein, 2007). CodY, a global transcriptional regulator, seems to play a critical role in the intracellular adaptation of *L. monocytogenes*. CodY is known to lose its repressing activity when intracellular levels of GTP and BCAAs decrease. As shown by Bennett et al. (2007), the CodY regulon comprises genes involved in amino acid metabolism, nitrogen assimilation, and sugar uptake. Derepression of the CodY operon revealed to be essential for listerial replication in various cell culture models and in mice. The authors therefore hypothesized that CodY senses the metabolic state of the host cell cytoplasm and triggers an adaptive listerial response, which is characterized by the induction of genes involved in the *de novo* biosynthesis of amino acids such as glutamate, arginine, histidine, tryptophan, and serine, in the intermediary carbon metabolism, in the uptake of sugars or in peptide, and ammonium transport. The induction and requirement of *argD* encoding *N*-acetylornithine aminotransferase during intracellular replication simultaneously with the induced expression of

the arginine transporter ArpJ might reflect a limited availability of this amino acid under intracellular conditions (Klarsfeld et al., 1994; Joseph et al., 2006). Listerial TnrA, probably encoded by lmo1298, is known as the principal global regulator of nitrogen metabolism in *B. subtilis* and represses the synthesis of glutamate synthase (Glt) and glutamine synthetase (GlnA). TnrA expression revealed to be downregulated within epithelial cells (Chatterjee et al., 2006), a finding that links to the inactivation of TnrA in the presence of glutamine (Wray et al., 2001). Less is known about the role of the listerial catabolite CcpA. Repression of sugar utilization pathways by glucose is independent of CcpA (Gopal et al., 2010), and CcpA is not involved in carbon source regulation of virulence genes (Behari and Youngman, 1998).

ALTERNATIVE SIGMA FACTOR B (σ^B)

The transition of *L. monocytogenes* from the saprophytic to the pathogenic lifestyle requires an adequate response to environmental conditions such as low pH, bile stress, carbon starvation, and the presence of reactive oxygen species on the level of transcription and expression (Abram et al., 2008a; Hain et al., 2008; O'Byrne and Karatzas, 2008; Ryan et al., 2008; Soni et al., 2011; Zhang et al., 2011). The regulon controlled by σ^B plays a major role in this adaptation process. Moreover, σ^B has been demonstrated to contribute to invasion of epithelial cells and to gastrointestinal infection (Kim et al., 2004; Garner et al., 2006; McGann et al., 2007; Ollinger et al., 2009). Interestingly, the two most highly represented categories of σ^B -dependent factors were transport and metabolism proteins, among them pyruvate dehydrogenase Pdh, a dihydroxyacetone kinase DhaK, the glycerol transporter GlpF, and a mannose-specific PTS (Kazmierczak et al., 2003). Accordingly, a *L. monocytogenes* σ^B mutant lacking σ^B less efficiently used glycerol as a carbon and energy source (Abram et al., 2008b). An intensive transcriptional reorganization was observed in an *in vivo* study based on tiling microarrays in which a σ^B mutant was used for infection (Toledo-Arana et al., 2009).

POSITIVE REGULATORY FACTOR A

The main virulence regulator of *L. monocytogenes*, PrfA, belongs to the family of cAMP receptor protein (Crp)/fumarate nitrate reductase regulators (de las Heras et al., 2011). PrfA not only activates nine key virulence factors including Hpt, but also controls the expression of further 136 factors including those involved in the metabolic activity of this pathogen during infection (Milošević et al., 2003). The direct or indirect regulatory PrfA function requires an interplay with σ^B that controls the general stress response of *L. monocytogenes* (Ollinger et al., 2008, 2009). Interestingly, there is a close link between metabolism and virulence in *L. monocytogenes* since the carbon sources utilized by the pathogen affect the expression of virulence genes. Especially, glucose, fructose, mannose, or cellobiose transported by PTS downregulated PrfA-dependent genes (Freitag et al., 2009), a finding that points to a low concentration of these sugars within cells. Vice versa, overproduction of PrfA resulted in growth inhibition in glucose-containing media and in an increased *de novo* biosynthesis of BCAA (Eisenreich et al., 2006; Marr et al., 2006). This sugar-mediated gene repression of PrfA-dependent genes depends rather on inhibition of PrfA than on changes of the PrfA concentration

(Renzoni et al., 1997). Taken together, the intracellular availability of carbon sources might act as a key signal for virulence gene expression in *L. monocytogenes* (de las Heras et al., 2011).

ADDITIONAL REGULATORY MECHANISMS

Another mechanism that regulates the metabolic adaptation of pathogens to their hosts is the phosphorylation status of proteins. In *L. monocytogenes*, a eukaryotic-type serine/threonine-kinase (PrkA, lmo1820) and a serine/threonine-phosphatase (Stp, lmo1821) have been identified that play a role during intracellular replication and *in vivo*, respectively (Archambaud et al., 2005; Zemansky et al., 2009). In a proteomic approach, 62 proteins were identified as interacting partners of PrkA including 19 involved in carbohydrate and amino acid metabolism (Lima et al., 2011). PrkA directly influences important metabolic enzymes such as Pdh, glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) dehydrogenase, pyruvate carboxylase PycA, an aminotransferase involved in BCAA synthesis, and the acetate kinase Acs. The role of universal stress proteins (Usps), which support the adaptation to energy deficiencies, in listerial stress resistance and in virulence has only recently been demonstrated (Seifart Gomes et al., 2011). In *E. coli*, the activation of *tspA* is regulated by fructose-6-phosphate (Persson et al., 2007), but a similar mechanism in Gram-positive pathogens remains to be elucidated.

MODELING *L. MONOCYTOGENES* METABOLISM UNDER INFECTION CONDITIONS

Systems biology approaches of listerial infection use a combination of genome-based bioinformatics tools including sequence and domain analysis, function and structure prediction for proteins, and phylogenetic comparisons. The focus of modeling has been on (intracellular) metabolism, pathogenicity factors, host-pathogen interaction, and the immune response of the host (Schauer et al., 2010; Sauer et al., 2011).

To model listerial metabolism *in vitro* and within cells, elementary mode analysis was applied (Eisenreich et al., 2006). This method allows to enumerate all possible enzyme combinations or independent pathways within the bacterial cell. Each pathway balances all internal metabolites involved. Furthermore, the metabolic flux models allow to fill in gaps of knowledge from the retrobiosynthetic analysis of the isotopolog compositions, for instance areas where no labeled metabolites were transported by the metabolic flux.

In a more recent study, quantitative literature data on intracellular replication of defined mutants was combined with the replication rates derived from a genome-scale screening for mutants showing reduced intraepithelial survival of *L. monocytogenes* (Schauer et al., 2010). The application of extreme pathway and elementary mode analysis revealed a critical role of glycerol and purine metabolism, of fucose utilization, and of the synthesis of glutathione, aspartate semialdehyde, serine, and BCAAs during intracellular replication of *L. monocytogenes*. Thus, new targets for antibiotic intervention became visible by this approach. Furthermore, the modeling demonstrated that degradation of glucose indeed occurs to a large extent via the PPP. To achieve those insights in metabolic traits relevant for listerial infection, numerous all-against-all protein sequence

comparisons were performed to establish specific and general protein families.

The number of metabolic pathways to consider in such genome-scale models reaches several thousand and more. Two criteria helped here to zoom in on the key pathways involved: Firstly, only those mutants of *L. monocytogenes* were considered that showed wildtype-like replication in rich medium, but impaired growth in macrophages.

Secondly, the pathways critical for survival in the macrophage were analyzed to particularly identify enzymes with a role in at least two of these pathways. The list of key enzymes reoccurring in the affected elementary modes by the different affected mutants could then be calculated and ranked. By this procedure, it was possible to quickly identify the most important listerial pathways required for intracellular survival.

Modeling metabolic pathways often results in combinatorial explosion, i.e., an intractable high number of potential flux modes. However, recent advances have the potential to overcome this disadvantage. For instance, flux distributions were decomposed into elementary flux modes in genome-scale metabolic networks of *E. coli* grown in rich medium containing various carbon sources (Chan and Ji, 2011). Furthermore, software such as EMILIO increases the scope of strain design to include reactions with individually optimized fluxes. Unlike existing approaches experiencing an explosion in complexity to solve this problem, this allowed to generate diverse strain designs regarding production of succinate, L-glutamate, and L-serine (Yang et al., 2011). A third possibility is the application of metabolic flux patterns. These are sets of reactions representing the basic routes through a particular subsystem that are compatible with admissible fluxes in a (possibly) much larger metabolic network (Schuster et al., 2010). The subsystem can be made up by reactions one is interested in, for example production of a certain metabolite. Furthermore, growth, growth boundary, and inactivation models of *L. monocytogenes* have extensively been developed in food research. Validated approaches exploited available experimental data and combined all three aspects using on different food sources as a medium (Coroller et al., 2012). Stochastic-based examples are multiplicative heteroscedastic models taking into account differing growth variance for heterogeneous populations (Cao et al., 2010), or the dependence of successful growth on inoculum and cell counts (Vermeulen et al., 2009).

PERSPECTIVES

Each of the approaches reviewed above has obvious limitations. Interfacing the transcriptome analysis with a mutant library screening underscored that the up- or downregulation of a gene or an operon not necessarily coincides with a phenotype under the same conditions (Joseph et al., 2006), a general drawback of these approaches. On the other hand, a proteomic analysis does not reveal the whole proteome under given conditions. Mutant analysis and IPA, on the other hand, focus on the role of single genes and metabolic traits, thus providing parts of the metabolic puzzle only. Contradictory results derived from different approaches posed the relevance of single metabolic pathways of *L. monocytogenes* for infection in question. Examples are the overexpression

of glutamate dehydrogenase during listerial replication in human THP-1 monocytes in contrast to its decreased expression in strain F2365 (van de Velde et al., 2009; Donaldson et al., 2011), or the induction or repression of the non-oxidative branch of the PPP (see above). These contradictions not only point to host cell-specific or temporary metabolic adaptations of *L. monocytogenes*, but also to the need of more standardized experimental conditions in omic-approaches.

Another prerequisite for systems biology of listerial metabolism is to quantify and qualify the metabolic state of the bacterial and the host cells during different stages of infection (Zamboni and Sauer, 2009). So far, data sets on metabolites have been derived only from *in vitro* approaches under non-physiological conditions. For example, *L. monocytogenes* 10403S cells grown at 37 and 8°C were analyzed (Singh et al., 2011). At low temperature, an increase of solute concentrations such as amino acids, sugars, organic acids, urea cycle intermediates, polyamines, and different compatible solutes was observed in the listerial cytoplasm, thus lowering the freezing point of intracellular water and decreasing ice crystal formation. A statistical analysis (PCA) was instrumental to reveal this system response. Mathematical modeling can consider such effects by adjusting metabolite concentrations and by thermodynamic considerations. Furthermore, compartment models are soon expected to improve such studies (Cheng et al., 2008) including pools and fluxes of the mammalian cell (Lopes et al., 2010). Future research should also consider microcompartments and organelles that both are used to optimize metabolic processes. Compartmentalization is common also in *L. monocytogenes* including carboxysomes responsible for cobalamin-dependent 1,2-propanediol degradation, thus contributing to functional diversity.

To reveal an even more comprehensive picture of listerial metabolism during infection, cells such as primary macrophages and fibroblasts should be considered for future cell culture experiments. It is also of interest to determine whether and to what extent the host metabolism is modulated during infection, for instance by *L. monocytogenes* secreting c-di-AMP (Woodward et al., 2010). In addition to *in vivo* studies using mice and guinea pigs (Cabanes et al., 2008), small animals such as *Caenorhabditis elegans* or *Galieria mellonella* might be established as new model organisms. *C. elegans* is a facile and proven model host for the study of microbial pathogenesis and metabolism (Sifri et al., 2005; Thomson et al., 2006; Srikumar and Fuchs, 2011). Because both host and pathogen are easily amenable to genetic manipulations, the effect of metabolic perturbations upon infection, changing culture

conditions, or gene knockouts can be investigated in this infection model. Notably, the model also reduces costs and ethical constraints in comparison to infection experiments with higher animals. A further advantage of the model is that metabolic fluxes from cells or tissues of an infected host animal to *L. monocytogenes* and vice versa might be followed, an approach that has long been hampered by the lack of technology to identify and quantify metabolism throughout an appropriate biological system (Spanier et al., 2009). *G. mellonella*, the greater wax moth, is another relatively simple, non-mammalian host model system that can be used to assess not only the virulence of listerial strains, but also the contribution of metabolic capacities to larvae killing as exemplified by the attenuated phenotype of an EGDe $\Delta uhpT$ mutant (Mukherjee et al., 2010). A major disadvantage in contrast to nematodes, however, is the need of subcutaneous instead of oral application of the pathogen.

SUMMARY

Listeria monocytogenes is highly adapted to the cytoplasm of mammalian host cells where it is able to multiply with a generation time comparable to that in rich medium. A comprehensive analysis of its metabolism is a prerequisite for a systemic understanding of *L. monocytogenes* infection. Taking into account all omic-studies and mutant data, certain metabolic enzymes and pathways of *L. monocytogenes* revealed to have a critical role during infection and might serve as new targets for the development of antilisterial compounds (Figure 1). Metabolic clues for intracellular and *in vivo* replication are the degradation of phosphorylated glucose via the PPP, the utilization of C₃-bodies as alternative carbon- and energy source, pyruvate as a sink for central metabolism including downstream reactions such as pyruvate decarboxylation, biosynthesis of BCAAs, the availability of thiamine, and the acquisition of host cell derived nitrogen sources including ethanolamine. The regulation of these metabolic capabilities involves the activity of factors such as PrfA and σ^B , resulting in a fine-tuned balance of metabolic flows with the host cell and *in vivo*. For a deeper understanding especially of host-pathogen interdependencies with respect to metabolism, new technologies such as isotopolog profiling, additional animal models including invertebrates, and novel systems biological approaches have to be combined in future research.

ACKNOWLEDGMENTS

Work in the authors' laboratories is supported by grants of the German Research Foundation (DFG), including the priority program SPP1316 (DA 208/13-1, EI-384/6, and FU-375/5).

REFERENCES

- Abram, F., Starr, E., Karatzas, K. A., Matlawka-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, K. J., Connolly, D., and O'Byrne, C. P. (2008a). Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 6848–6858.
- Abram, F., Su, W.-L., Wiedmann, M., Boor, K. J., Coote, P., Botting, C., Karatzas, K. A. G., and O'Byrne, C. P. (2008b). Proteomic analyses of a *Listeria monocytogenes* mutant lacking sigma B identify new components of the sigma B regulon and highlight a role for sigma B in the utilization of glycerol. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 594–604.
- Alexander, J. E., Andrew, P. W., Jones, D., and Roberts, I. S. (1993). Characterization of an aromatic amino acid-dependent *Listeria monocytogenes* mutant: attenuation, persistence, and ability to induce protective immunity in mice. *Infect. Immun.* 61, 2245–2248.
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K., and Stephanopoulos, G. (2007). Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis. *Anal. Chem.* 79, 7554–7559.
- Archambaud, C., Gouin, E., Pizarro-Cerda, I., Cossart, P., and Dussurget, O. (2005). Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 56, 383–396.
- Asanuma, N., and Hino, T. (2003). Molecular characterization of HPr and related enzymes, and regulation of HPr phosphorylation in the ruminal bacterium *Streptococcus bovis*. *Arch. Microbiol.* 179, 205–213.

- Becker, D., Selbach, M., Rollenhagen, C., Ballmaier, M., Meyer, T. F., Mann, M., and Bumam, D. (2006). Robust *Salmonella* metabolism limits its possibilities for new antimicrobials. *Nature* 440, 303–307.
- Behari, J., and Youngman, P. (1998). A homolog of CcpA mediates catabolite control in *Listeria monocytogenes* but not carbon source regulation of virulence genes. *J. Bacteriol.* 180, 6316–6324.
- Bennett, H. J., Pearce, D. M., Glenn, S., Taylor, C. M., Kuhn, M., Sonenshein, A. L., Andrew, P. W., and Roberts, I. S. (2007). Characterization of *relA* and *codY* mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence. *Mol. Microbiol.* 63, 1453–1467.
- Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., and Portnoy, D. A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345, 175–176.
- Boigegein, R.-A., Liautard, J.-P., and Kohler, S. (2005). Targeting of the virulence factor acetohydroxyacid synthase by sulfonamides results in inhibition of intramacrophagic multiplication of *Brucella suis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 3922–3925.
- Borezee, E., Pellegrini, E., and Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect. Immun.* 68, 7069–7077.
- Brown, S. A., Palmer, K. L., and Whiteley, M. (2008). Revisiting the host as a growth medium. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 657–666.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P., and Glaser, P. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 35, 207–213.
- Cabanes, D., Lecuit, M., and Cossart, P. (2008). Animal models of *Listeria* infection. *Curr. Protoc. Microbiol.* 9, 9B.1.1–9B.1.17.
- Cabanes, D., Sousa, S., and Cossart, P. (2011). “*Listeria* genomics,” in *Genomics of Foodborne Bacterial Pathogens*, eds M. Wiedmann and W. Zhang (New York: Springer), 141–70.
- Camejo, A., Buchrieser, C., Couvé, E., Carvalho, F., Reis, O., Ferreira, P., Sousa, S., Cossart, P., and Cabanes, D. (2009). In vivo transcriptional profiling of *Listeria monocytogenes* and mutagenesis identify new virulence factors involved in infection. *PLoS Pathog.* 5, e1000449. doi:10.1371/journal.ppat.1000449
- Camejo, A., Carvalho, F., Reis, O., Leitao, E., Sousa, S., and Cabanes, D. (2011). The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2, 379–394.
- Cao, R., Francisco-Fernández, M., and Quinto, E. J. (2010). A random effect multiplicative heteroscedastic model for bacterial growth. *BMC Bioinformatics* 11, 77. doi:10.1186/1471-2105-11-77
- Centers for Disease Control and Prevention. (2011). *Statistics of Listeriosis*. Atlanta. Available at: <http://www.cdc.gov/listeria/statistics.html>
- Chan, S. H. J., and Ji, P. (2011). Decomposing flux distributions into elementary flux modes in genome-scale metabolic networks. *Bioinformatics* 27, 2256–2262.
- Chatterjee, S. S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T., and Hain, T. (2006). Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 74, 1323–1338.
- Cheng, S., Liu, Y., Crowley, C. S., Yeates, T. O., and Bobik, T. A. (2008). Bacterial microcompartments: their properties and paradoxes. *Bioessays* 30, 1084–1095.
- Chico-Calero, I., Suárez, M., González-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W., and Vázquez-Boland, J. A. (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucosyl-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 431–436.
- Coroller, L., Kan-King-Yu, D., Leguerinel, I., Mafart, P., and Membré, J.-M. (2012). Modelling of growth, growth/no-growth interface and nonthermal inactivation areas of *Listeria* in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 152, 139–152.
- Cossart, P., and Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect.* 10, 1041–1050.
- de las Heras, A., Cain, R. J., Bielecka, M. K., and Vázquez-Boland, J. A. (2011). Regulation of *Listeria* virulence: PrfA master and commander. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 118–127.
- Donaldson, J. R., Nanduri, B., Burgess, S. C., and Lawrence, M. L. (2009). Comparative proteomic analysis of *Listeria monocytogenes* strains F2365 and EGD. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 366–373.
- Donaldson, J. R., Nanduri, B., Pittman, J. R., Givaruangawat, S., Burgess, S. C., and Lawrence, M. L. (2011). Proteomic expression profiles of virulent and avirulent strains of *Listeria monocytogenes* isolated from macrophages. *J. Proteomics* 74, 1906–1917.
- Dumas, E., Desvaux, M., Chambon, C., and Hébraud, M. (2009a). Insight into the core and variant exoproteomes of *Listeria monocytogenes* species by comparative subproteomic analysis. *Proteomics* 9, 3136–3155.
- Dumas, E., Meunier, B., Berdagüé, J.-L., Chambon, C., Desvaux, M., and Hébraud, M. (2009b). The origin of *Listeria monocytogenes* 4b isolates is signified by subproteomic profiling. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 1530–1536.
- Dumas, E., Meunier, B., Berdagüé, J.-L., Chambon, C., Desvaux, M., and Hébraud, M. (2008). Comparative analysis of extracellular and intracellular proteomes of *Listeria monocytogenes* strains reveals a correlation between protein expression and serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7399–7409.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J., and Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 587–610.
- Eisenreich, W., and Bacher, A. (2007). Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry* 68, 2799–2815.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J., and Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 401–412.
- Eisenreich, W., Slaghuis, J., Laupitz, R., Bussemer, J., Stritzker, J., Schwarz, C., Schwarz, R., Dandekar, T., Goebel, W., and Bacher, A. (2006). ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2040–2045.
- Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W., and Eisenreich, W. (2008). Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol. Microbiol.* 69, 1008–1017.
- Fisher, S. H. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol. Microbiol.* 32, 223–232.
- Freitag, N. E., Port, G. C., and Miner, M. D. (2009). *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 623–628.
- Fuchs, T. M., Eisenreich, W., Heesemann, J., and Goebel, W. (2011). Metabolic adaptation of human pathogenic and related non-pathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00301.x. [Epub ahead of print].
- Garner, M. R., Njaa, B. L., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2006). Signa B contributes to *Listeria monocytogenes* gastrointestinal infection but not to systemic spread in the guinea pig infection model. *Infect. Immun.* 74, 876–886.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloeker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., de Daruvar, A., Dehoux, P., Domann, E., Dominguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., Garcia-del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Krefz, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kunrath, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., de Pablos, B., Pérez-Díaz, J. C., Purcell, R., Remmel, B., Rose, M., Schlüter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J., and Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* 294, 849–852.
- Goetz, M., Bubert, A., Wang, G., Chico-Calero, I., Vázquez-Boland, J. A., Beck, M., Slaghuis, J., Szalay, A. A., and Goebel, W. (2001). Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12221–12226.
- Gopal, S., Berg, D., Hagen, N., Schriever, E.-M., Stoll, R., Goebel, W., and Krefz, J. (2010). Maltose and maltodextrin utilization by *Listeria monocytogenes* depend on an inducible ABC transporter which is repressed by glucose. *PLoS ONE* 5, e10349. doi:10.1371/journal.pone.0010349
- Gotz, A., Eylert, E., Eisenreich, W., and Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma

- (Caco-2) cells. *PLoS ONE* 5, e10586. doi:10.1371/journal.pone.0010586
- Götz, A., and Goebel, W. (2010). Glucose and glucose 6-phosphate as carbon sources in extra- and intracellular growth of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Microbiology* 156, 1176–1187.
- Hain, T., Hossain, H., Chatterjee, S. S., Machata, S., Volk, U., Wagner, S., Brors, B., Haas, S., Kuenne, C. T., Billion, A., Otten, S., Pane-Farre, J., Engelmann, S., and Chakraborty, T. (2008). Temporal transcriptomic analysis of the *Listeria monocytogenes* EGD-e σ B regulon. *BMC Microbiol.* 8, 20. doi:10.1186/1471-2180-8-20
- Hain, T., Steinweg, C., Kuenne, C. T., Billion, A., Ghai, R., Chatterjee, S. S., Domann, E., Kärst, U., Goemann, A., Bekel, T., Bartels, D., Kaiser, O., Meyer, F., Pthler, A., Weishaar, B., Wehland, J., Liang, C., Dandekar, T., Lampidis, R., Kreft, J., Goebel, W., and Chakraborty, T. (2006). Whole-genome sequence of *Listeria welshimeri* reveals common steps in genome reduction with *Listeria innocua* as compared to *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 188, 7405–7415.
- Hamon, M., Bierne, H., and Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 423–434.
- Hwang, C., Sinskey, A. J., and Lodish, H. F. (1992). Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. *Science* 257, 1496–1502.
- Johnson, J., Jinneman, K., Stelma, G., Smith, B. G., Iye, D., Messer, J., Ulaszek, J., Evsen, L., Gendel, S., Bennett, R. W., Swaminathan, B., Pruckler, J., Steigerwalt, A., Kathariou, S., Yildirim, S., Volokhov, D., Rasooly, A., Chizhikov, V., Wiedmann, M., Fortes, E., Duvall, R. E., and Hitchins, A. D. (2004). Natural atypical *Listeria innocua* strains with *Listeria monocytogenes* pathogenicity island 1 genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4256–4266.
- Joseph, B., and Goebel, W. (2007). Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect.* 9, 1188–1195.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schar, J., Umeha, K. R., Luo, Q., Müller-Altröck, S., and Goebel, W. (2008). Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 190, 5412–5430.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stühler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T. M., and Goebel, W. (2006). Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J. Bacteriol.* 188, 556–568.
- Kazmierczak, M. J., Mithoe, S. C., Boor, K. J., and Wiedmann, M. (2003). *Listeria monocytogenes* sigma B regulates stress response and virulence functions. *J. Bacteriol.* 185, 5722–5734.
- Kim, H., Boor, K. J., and Marquis, H. (2004). *Listeria monocytogenes* sigma B contributes to invasion of human intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* 72, 7374–7378.
- Klarsfeld, A. D., Goossens, P. L., and Cossart, P. (1994). Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol. Microbiol.* 13, 585–597.
- Kröger, C., Srikumar, S., Ellwart, J., and Fuchs, T. M. (2011). Bistability in myo-inositol utilization by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 193, 1427–1435.
- Liautard, J.-P., Jubier-Maurin, V., Boegegrain, R.-A., and Kohler, S. (2006). Antimicrobials: targeting virulence genes necessary for intracellular multiplication. *Trends Microbiol.* 14, 109–113.
- Lima, A., Duran, R., Schujman, G. E., Marchisio, M. J., Portela, M. M., Obal, G., Pritsch, O., de, M. D., and Cervenansky, C. (2011). Serine/threonine protein kinase PrkA of the human pathogen *Listeria monocytogenes*: biochemical characterization and identification of interacting partners through proteomic approaches. *J. Proteomics* 74, 1720–1734.
- Lopes, T. J. S., Luganskaja, T., Vujic Spasic, M., Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Schtjmann, K., and Reich, J. G. (2010). Systems analysis of iron metabolism: the network of iron pools and fluxes. *BMC Syst. Biol.* 4, 112. doi:10.1186/1752-0509-4-112
- Lucchini, S., Liu, H., Jin, Q., Hinton, J. C. D., and Yu, J. (2005). Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect. Immun.* 73, 88–102.
- Madeo, M., O'Riordan, N., Fuchs, T. M., Utratna, M., Karatzas, K. A. G., and O'Byrne, C. P. (2012). Thiamine plays a critical role in the acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 326, 137–143.
- Marquis, H., Bouwer, H. G., Hinrichs, D. J., and Portnoy, D. A. (1993). Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect. Immun.* 61, 3756–3760.
- Marr, A. K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Müller-Altröck, S., and Goebel, W. (2006). Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J. Bacteriol.* 188, 3887–3901.
- McGann, P., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2007). The alternative sigma factor sigma B and the virulence gene regulator PrfA both regulate transcription of *Listeria monocytogenes* internalins. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 2919–2930.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J.-Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P., and Buchrieser, C. (2003). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol. Microbiol.* 47, 1613–1625.
- Monack, D. M., and Theriot, J. A. (2001). Actin-based motility is sufficient for bacterial membrane protrusion formation and host cell uptake. *Cell Microbiol.* 3, 633–647.
- Mukherjee, K., Altincicek, B., Hain, T., Domann, E., Vilcinskas, A., and Chakraborty, T. (2010). *Galleria mellonella* as a model system for studying *Listeria* pathogenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 310–317.
- Munoz-Elias, E. J., and McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell. Microbiol.* 8, 10–22.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L., and Smith, D. F. (1974). Culture medium for enterobacteria. *J. Bacteriol.* 119, 736–747.
- O'Byrne, C. P., and Karatzas, K. A. G. (2008). The role of sigma B (sigma B) in the stress adaptations of *Listeria monocytogenes*: overlaps between stress adaptation and virulence. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 115–140.
- Ollinger, J., Bowen, B., Wiedmann, M., Boor, K. J., and Bergholz, T. M. (2009). *Listeria monocytogenes* sigma B modulates PrfA-mediated virulence factor expression. *Infect. Immun.* 77, 2113–2124.
- Ollinger, J., Wiedmann, M., and Boor, K. J. (2008). Sigma B- and PrfA-dependent transcription of genes previously classified as putative constituents of the *Listeria monocytogenes* PrfA regulon. *Foodborne Pathog. Dis.* 5, 281–293.
- O'Riordan, M., Moors, M. A., and Portnoy, D. A. (2003). *Listeria* intracellular growth and virulence require host-derived lipoic acid. *Science* 302, 462–464.
- Persson, C., Valadi, A., Nyström, T., and Farewell, A. (2007). Metabolic control of the *Escherichia coli* universal stress protein response through fructose-6-phosphate. *Mol. Microbiol.* 65, 968–978.
- Port, G. C., and Freitag, N. E. (2007). Identification of novel *Listeria monocytogenes* secreted virulence factors following mutational activation of the central virulence regulator, PrfA. *Infect. Immun.* 75, 5886–5897.
- Price-Carter, M., Tingey, J., Bobik, T. A., and Roth, J. R. (2001). The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J. Bacteriol.* 183, 2463–2475.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J., and Tang, C. M. (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 333–340.
- Renzone, A., Klarsfeld, A., Dramsi, S., and Cossart, P. (1997). Evidence that PrfA, the pleiotropic activator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, can be present but inactive. *Infect. Immun.* 65, 1515–1518.
- Robert Koch-Institut. (2011). *Epidemiologisches Bulletin*. Berlin: Robert Koch-Institut.
- Rohmer, L., Hocquet, D., and Miller, S. I. (2011). Are pathogenic bacteria just looking for food? Metabolism and microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 19, 341–348.
- Ryan, S., Hill, C., and Gahan, C. G. M. (2008). Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv. Appl. Microbiol.* 65, 67–91.
- Sauer, J.-D., Pereyre, S., Archer, K. A., Burke, T. P., Hanson, B., Lauer, P., and Portnoy, D. A. (2011). *Listeria monocytogenes* engineered to activate the NlrC4 inflammasome are severely attenuated and are poor inducers of protective immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 12419–12424.
- Schar, J., Stoll, R., Schauer, K., Loeffler, D. I. M., Eylert, E., Joseph, B., Eisenreich, W., Fuchs, T. M., and Goebel, W. (2010). Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 192, 1774–1784.
- Schauer, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T., and Fuchs, T. M. (2010). Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening

- and modelling. *BMC Genomics* 11, 573. doi:10.1186/1471-2164-11-573
- Schauer, K., Stolz, J., Scherer, S., and Fuchs, T. M. (2009). Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 191, 2218–2227.
- Schindler, P. W., and Zahner, H. (1972). Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. *Arch. Mikrobiol.* 82, 66–75.
- Schuster, S., de Figueiredo, L. F., and Kaleta, C. (2010). Predicting novel pathways in genome-scale metabolic networks. *Biochem. Soc. Trans.* 38, 1202–1205.
- Seifart Gomes, C., Izar, B., Pazan, F., Mohamed, W., Mraheil, M. A., Mukherjee, K., Billion, A., Aharonowitz, Y., Chakraborty, T., and Hain, T. (2011). Universal stress proteins are important for oxidative and acid stress resistance and growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e in vitro and in vivo. *PLoS ONE* 6, e24965. doi:10.1371/journal.pone.0024965
- Severino, P., Dussurget, O., Vêncio, R. Z. N., Dumas, E., Garrido, P., Padilla, G., Piveteau, P., Lemaitre, J.-P., Kunst, F., Glaser, P., and Buchrieser, C. (2007). Comparative transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* strains of the two major lineages reveals differences in virulence, cell wall, and stress response. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6078–6088.
- Sifri, C. D., Begun, J., and Ansel, F. M. (2005). The worm has turned - microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol.* 13, 119–127.
- Singh, A. K., Ulanov, A. V., Li, Z., Jayaswal, R. K., and Wilkinson, B. J. (2011). Metabolomes of the psychrotolerant bacterium *Listeria monocytogenes* 104035 grown at 37°C and 8°C. *Int. J. Food Microbiol.* 148, 107–114.
- Slaghuis, J., Goetz, M., Engelbrecht, F., and Goebel, W. (2004). Inefficient replication of *Listeria innocua* in the cytosol of mammalian cells. *J. Infect. Dis.* 189, 393–401.
- Sonenshein, A. L. (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 5, 917–927.
- Soni, K. A., Nannapaneni, R., and Tasara, T. (2011). The contribution of transcriptomic and proteomic analysis in elucidating stress adaptation responses of *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathog. Dis.* 8, 843–852.
- Spanier, B., Lasch, K., Marsch, S., Benner, J., Liao, W., Hu, H., Kienberger, H., Eisenreich, W., and Daniel, H. (2009). How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE* 4, e6279. doi:10.1371/journal.pone.0006279
- Srikumar, S., and Fuchs, T. M. (2011). Ethanolamine utilization contributes to proliferation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in food and in nematodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 281–290.
- Stasiewicz, M. J., Wiedmann, M., and Bergholz, T. M. (2011). The transcriptional response of *Listeria monocytogenes* during adaptation to growth on lactate and diacetate includes synergistic changes that increase fermentative acetoin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5294–5306.
- Stoll, R., and Goebel, W. (2010). The major PEP-phosphotransferase systems (PTSs) for glucose, mannose and cellobiose of *Listeria monocytogenes*, and their significance for extra- and intracellular growth. *Microbiology* 156, 1069–1083.
- Stritzker, J., Janda, J., Schoen, C., Taupp, M., Pilgrim, S., Gentschev, I., Schreier, P., Geginat, G., and Goebel, W. (2004). Growth, virulence, and immunogenicity of *Listeria monocytogenes* aro mutants. *Infect. Immun.* 72, 5622–5629.
- Thomsen, L. E., Slutz, S. S., Tan, M.-W., and Ingmer, H. (2006). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1700–1701.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergasola, M., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Rénault, B., Coppée, J.-Y., Lecuit, M., Johansson, J., and Cosart, P. (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* 459, 950–956.
- Trost, M., Wehmhoner, D., Kärst, U., Dieterich, G., Wehland, J., and Jansch, L. (2005). Comparative proteome analysis of secretory proteins from pathogenic and nonpathogenic *Listeria* species. *Proteomics* 5, 1544–1557.
- van de Velde, S., Delaive, E., Dieu, M., Carryn, S., van Bambeke, F., Devreese, B., Raes, M., and Tulkens, P. M. (2009). Isolation and 2-D-DIGE proteomic analysis of intracellular and extracellular forms of *Listeria monocytogenes*. *Proteomics* 9, 5484–5496.
- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J., and Kreft, J. (2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 584–640.
- Vermeulen, A., Gysemans, K. P. M., Bernaerts, K., Geeraerd, A. H., Debevere, J., Devlieghere, F., and van Impe, J. F. (2009). Modelling the influence of the inoculation level on the growth/no growth interface of *Listeria monocytogenes* as a function of pH, aw and acetic acid. *Int. J. Food Microbiol.* 135, 83–89.
- Weeks, M. E., James, D. C., Robinson, G. K., and Smales, C. M. (2004). Global changes in gene expression observed at the transition from growth to stationary phase in *Listeria monocytogenes* ScottA batch culture. *Proteomics* 4, 123–135.
- Wen, J., Deng, X., Li, Z., Dudley, E. G., Anantheswaran, R. C., Knabel, S. J., and Zhang, W. (2011). Transcriptomic response of *Listeria monocytogenes* during the transition to the long-term-survival phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5966–5972.
- Winder, C. L., Dunn, W. B., and Goodacre, R. (2011). TARDIS-based microbial metabolomics: time and relative differences in systems. *Trends Microbiol.* 19, 315–322.
- Winter, S. E., Thiennimit, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsoilis, R. M., Roth, J. R., and Baumler, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* 467, 426–429.
- Woodward, J. J., Iavarone, A. T., and Portnoy, D. A. (2010). c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science* 328, 1703–1705.
- Wray, L. V., Zalieckas, J. M., and Fisher, S. H. (2001). *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* 107, 427–435.
- Yang, L., Cluett, W. R., and Mahadevan, R. (2011). EMILIO: a fast algorithm for genome-scale strain design. *Metab. Eng.* 13, 272–281.
- Zamboni, N., Fendt, S.-M., Röhl, M., and Sauer, U. (2009). (13)C-based metabolic flux analysis. *Nat. Protoc.* 4, 878–892.
- Zamboni, N., and Sauer, U. (2009). Novel biological insights through metabolomics and 13C-flux analysis. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 553–558.
- Zemansky, J., Kline, B. C., Woodward, J. J., Leber, J. H., Marquis, H., and Portnoy, D. A. (2009). Development of a mariner-based transposon and identification of *Listeria monocytogenes* determinants, including the peptidyl-prolyl isomerase PrsA2, that contribute to its hemolytic phenotype. *J. Bacteriol.* 191, 3950–3964.
- Zhang, Q., Feng, Y., Deng, L., Feng, F., Wang, L., Zhou, Q., and Luo, Q. (2011). SigB plays a major role in *Listeria monocytogenes* tolerance to bile stress. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 238–243.
- Zhao, H., Chen, J., Fang, C., Xia, Y., Cheng, C., Jiang, L., and Fang, W. (2011). Deciphering the biodiversity of *Listeria monocytogenes* lineage III strains by polyphasic approaches. *J. Microbiol.* 49, 759–767.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 12 December 2011; paper pending published: 30 December 2011; accepted: 13 January 2012; published online: 03 February 2012.

Citation: Fuchs TM, Eisenreich W, Kern T and Dandekar T (2012) Toward a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection. *Front. Microbio.* 3:23. doi: 10.3389/fmicb.2012.00023

This article was submitted to *Frontiers in Microbial Immunology*, a specialty of *Frontiers in Microbiology*.

Copyright © 2012 Fuchs, Eisenreich, Kern and Dandekar. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited.

2.4 Ausblick

Mit ^{15}N -*Isotopologue Profiling* als zentraler Analytik-Methode konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *L. monocytogenes* in der Lage ist, eine Vielzahl an unterschiedlichen N-Quellen zu nutzen, und den daraus stammenden Stickstoff effektiv für den Anabolismus von AS und Proteinen zu verwenden. Auch durch den Einsatz verschiedener Stämme, welche Mutationen in Genen des N-Metabolismus aufweisen, kann der N-Stoffwechsel von *L. monocytogenes* weiter aufgeklärt werden.

In zukünftigen Arbeiten könnten weitere potentielle N-Quellen, möglicherweise auch in Kombination mit verschiedenen C-Quellen, getestet werden, um N-Substrate zu finden, welche auch bei der Infektion *in vivo* eine Rolle spielen. Auch unter anderen Wachstumsbedingungen, wie unter Sauerstoffabschluss, könnte sich hier den Gegebenheiten *in vivo* weiter genähert werden, jedoch ließen sich Listerien bisher nicht unter anaeroben Bedingungen in MM anziehen, da hier vermutlich ein unbekanntes, entscheidendes Substrat, wie etwa ein Cofaktor für eine bestimmte, enzymatische Reaktion, zu fehlen scheint. Die metabolische Flexibilität, welche diesem Bakterium das Überleben in so unterschiedlichen Umgebungen wie der Umwelt oder innerhalb eines Wirtes ermöglicht, und welche auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, gestaltet diese Suche ebenfalls schwieriger, da der Ausfall von metabolischen Genen oftmals anderweitig kompensiert werden kann.

Als weitere Anwendungsmöglichkeit für das *Isotopologue Profiling* mit *L. monocytogenes* kommen auch Zellkulturexperimente mit verschiedenen Zelllinien in Frage, wie sie mit ^{13}C bereits durchgeführt wurden (Eylert *et al.*, 2008; Eisenreich *et al.*, 2006; Götz *et al.*, 2010), da sich hierbei die intrazelluläre N-Nutzung genauer untersuchen lässt. Dabei könnte weiterhin auch die metabolische Anpassung auf Seiten des Wirts untersucht werden, um herauszufinden, wie dieser bei einer Besiedelung mit pathogenen Bakterien seinen N-Stoffwechsel umstellt oder von den Bakterien manipuliert wird, und welche Kompartimente des Wirtes die besten Voraussetzungen in Bezug auf die Nährstoffverfügbarkeit bieten (Gillmaier *et al.*, 2012; Eisenreich *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu Experimenten mit ^{13}C ist das Auflösungsvermögen dieser Methode bei Verwendung von ^{15}N jedoch weitaus geringer, was die Anwendungsgebiete einschränkt.

Neben der Analyse von bakteriellen, zellulären Proteinen bzw. AS könnten auch weitere, N-haltige Moleküle des Metabolismus untersucht werden, wie extrazelluläre Substrate, Nukleinsäuren, Fettsäuren oder Vitamine. Dadurch könnten neben der Proteinbiosynthese auch weitere Stoffwechselwege, wie zum Beispiel der Fettsäuremetabolismus, näher betrachtet werden. Von besonderem Interesse sind hierbei vor allem Reaktionen, die für Listerien für ein Überleben *in vivo* essentiell sind, bei denen sie auf die Versorgung durch den Wirt angewiesen sind, und solche, die die Expression von Virulenzfaktoren beeinflussen. Voraussetzung dafür ist, dass die zu untersuchenden Moleküle durch geeignete Methoden in ausreichender Menge isoliert werden können, um eine Messung mit GC-MS zu ermöglichen. Hierbei zeigt sich auch, dass eine Verbesserung der analytischen Werkzeuge in der Zukunft nötig ist, um die Methoden zu

sensitivieren, und ein höheres Auflösungsvermögen zu erreichen, da vor allem die NMR-Spektroskopie nur bei einer ausreichend großen Menge an Probenmaterial durchführbar ist.

Die Verwendung von *C. elegans* als Kolonisierungsmodell für *L. monocytogenes*, in Kombination mit der hier etablierten Isolationsmethode für das *Isotopologue Profiling*, konnte einen N-Fluss von einem Wirt zu einem kolonisierenden Bakterium belegen und weitere Hinweise dafür liefern, dass Oligopeptid- und AS-Transporter unter *in vivo*-Bedingungen von Bedeutung sind. Da *C. elegans* ebenso mit ^{13}C markiert werden kann, könnte diese Methode auch für die Untersuchung des C-Stoffwechsels verwendet werden. Hierbei wäre auch ein Vergleich mit dem Metabolismus anderer Bakterien denkbar, beispielsweise solcher, die tatsächlich pathogen sind für den Wurm, und auch unter Verwendung von Stämmen, welche Mutationen in bestimmten Genen tragen oder bestimmte Gene überexprimieren.

Neben *C. elegans* kann beispielsweise auch *D. melanogaster* mit stabilen Isotopen markiert werden (Gouw *et al.*, 2011). Eine vollständige Markierung ist jedoch bei höher entwickelten Organismen wie Mäusen bisher nicht möglich, wodurch die Anwendung aktuell auf niedriger entwickelte Modellorganismen, wie Invertebraten, beschränkt bleibt. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Etablierung weiterer Organ- und Tiermodelle, um die Möglichkeiten zur Nutzung von *Isotopologue Profiling*, insbesondere für Pathogenitätsstudien, zu erweitern.

All diese Daten können die Ergebnisse aus bisher bewährten Ansätzen ergänzen und vervollständigen. Neben Transkriptom oder Metabolom-Studien, die Hinweise zur Genexpression liefern, bieten die *Isotopologue Profiling*-Analysen direkte Einblicke, wie Stoffe durch den Metabolismus fließen, und lassen so Rückschlüsse auf die von den Bakterien verwendeten Enzyme und Reaktionen zu, wodurch das komplexe Stoffwechselnetzwerk, und speziell der N-Metabolismus von *L. monocytogenes*, weiter aufgeklärt werden kann. Die Erkenntnisse können außerdem bei der Konservierung von Nahrungsmitteln Anwendung finden, um Lebensmittel sicherer zu machen, und die Inzidenz der Listeriose so zu verringern. Letztendlich kann durch solche Daten auch die Suche nach Angriffspunkten für neuartige Antibiotika weiter vorangetrieben werden, um die bisher verfügbaren Therapiemöglichkeiten bei einer Listeriose zu erweitern, und auch in Zukunft wirksame Medikamente zu haben, die bei dieser Krankheit mit der hohen Letalität eingesetzt werden können.

Literaturverzeichnis

- Aballay, A., Yorgey, P. und Ausubel, F. M.** (2000). *Salmonella typhimurium* proliferates and establishes a persistent infection in the intestine of *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **10**(23): 1539–1542.
- Abram, F., Starr, E., Karatzas, K. A., Matlawska-Wasowska, K., Boyd, A., Wiedmann, M., Boor, K. J., Connally, D. und O'Byrne, C. P.** (2008). Identification of components of the sigma B regulon in *Listeria monocytogenes* that contribute to acid and salt tolerance. *Appl Environ Microbiol* **74**(22): 6848–6858.
- Abram, M., Schlüter, D., Vuckovic, D., Wraber, B., Doric, M. und Deckert, M.** (2003). Murine model of pregnancy-associated *Listeria monocytogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**(3): 177–182.
- Abu Kwaik, Y. und Bumann, D.** (2015). Host Delivery of Favorite Meals for Intracellular Pathogens. *PLoS Pathog* **11**(6): e1004866.
- Aitlhadj, L. und Stürzenbaum, S. R.** (2010). The use of FUDR can cause prolonged longevity in mutant nematodes. *Mech Ageing Dev* **131**(5): 364–365.
- Altun, Z. F. und Hall, D. H.** (2009). Introduction. *WormAtlas*. doi: 10.3908/wormatlas.1.1
- Anany, H., Chen, W., Pelton, R. und Griffiths, M. W.** (2011). Biocontrol of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in meat by using phages immobilized on modified cellulose membranes. *Appl Environ Microbiol* **77**(18): 6379–6387.
- Antoniewicz, M. R., Kelleher, J. K. und Stephanopoulos, G.** (2007). Accurate assessment of amino acid mass isotopomer distributions for metabolic flux analysis. *Anal Chem* **79**(19): 7554–7559.
- Archambaud, C., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Bécavin, C., Laval, L., Lechat, P., Smokvina, T., Langella, P., Lecuit, M. und Cossart, P.** (2012). Impact of lactobacilli on orally acquired listeriosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**(41): 16684–16689.
- Austin, J. und Kimble, J.** (1987). *glp-1* is required in the germ line for regulation of the decision between mitosis and meiosis in *C. elegans*. *Cell* **51**(4): 589–599.
- Avery, L. und Shtonda, B. B.** (2003). Food transport in the *C. elegans* pharynx. *J Exp Biol* **206**(Pt 14): 2441–2457.
- Balestrino, D., Hamon, M. A., Dortet, L., Nahori, M.-A., Pizarro-Cerda, J., Alignani, D., Dussurget, O., Cossart, P. und Toledo-Arana, A.** (2010). Single-cell techniques using chromosomally tagged fluorescent bacteria to study *Listeria monocytogenes* infection processes. *Appl Environ Microbiol* **76**(11): 3625–3636.
- Barbuddhe, S. B., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., Chakraborty, T. und Hain, T.** (2008). Rapid identification and typing of *Listeria* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol* **74**(17): 5402–5407.
- Begun, J., Gaiani, J. M., Rohde, H., Mack, D., Calderwood, S. B., Ausubel, F. M. und Sifri, C. D.** (2007). Staphylococcal biofilm exopolysaccharide protects against *Caenorhabditis elegans* immune defenses. *PLoS Pathog* **3**(4): e57.
- Bell, C., Kyriakides, A.** (2005). *Listeria*. A practical approach to the organism and its control in foods. 2nd ed. Oxford, UK: Blackwell Pub: 9–15.
- Bennett, H. J., Pearce, D. M., Glenn, S., Taylor, C. M., Kuhn, M., Sonenshein, A. L., Andrew, P. W. und Roberts, I. S.** (2007). Characterization of *relA* and *codY* mutants of *Listeria monocytogenes*: identification of the CodY regulon and its role in virulence. *Mol Microbiol* **63**(5): 1453–1467.
- Berry, D., Stecher, B., Schintlmeister, A., Reichert, J., Brugiroux, S., Wild, B., Wanek, W., Richter, A., Rauch, I., Decker, T., Loy, A. und Wagner, M.** (2013). Host-compound foraging by intestinal microbiota revealed by single-cell stable isotope probing. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(12): 4720–4725.

- Bertsch, D., Rau, J., Eugster, M. R., Haug, M. C., Lawson, P. A., Lacroix, C. und Meile, L. (2013). *Listeria fleischmannii* sp. nov., isolated from cheese. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**(Pt 2): 526–532.
- Borezee, E., Pellegrini, E. und Berche, P. (2000). OppA of *Listeria monocytogenes*, an oligopeptide-binding protein required for bacterial growth at low temperature and involved in intracellular survival. *Infect Immun* **68**(12): 7069–7077.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77**(1): 71–94.
- Bruno, J. C. und Freitag, N. E. (2010). Constitutive activation of PrfA tilts the balance of *Listeria monocytogenes* fitness towards life within the host versus environmental survival. *PLoS One* **5**(12): e15138.
- Buchrieser, C., Rusniok, C., Kunst, F., Cossart, P. und Glaser, P. (2003). Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. *FEMS Immunol Med Microbiol* **35**(3): 207–213.
- Castellen, P., Rego, F. G., Portugal, M. E., Benelli, E. M., Rego, F. G. M. und Portugal, M. E. G. (2011). The *Streptococcus mutans* GlnR protein exhibits an increased affinity for the *glnRA* operon promoter when bound to GlnK. *Braz J Med Biol Res* **44**(12): 1202–1208.
- CDC (2011). Multistate outbreak of listeriosis associated with Jensen Farms cantaloupe. United States, August–September 2011. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **60**(39): 1357–1358.
- Chatterjee, S. S., Hossain, H., Otten, S., Kuenne, C., Kuchmina, K., Machata, S., Domann, E., Chakraborty, T. und Hain, T. (2006). Intracellular gene expression profile of *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **74**(2): 1323–1338.
- Chico-Calero, I., Suárez, M., González-Zorn, B., Scotti, M., Slaghuis, J., Goebel, W. und Vázquez-Boland, J. A. (2002). Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose-6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**(1): 431–436.
- Choi, M. J., Jackson, K. A., Medus, C., Beal, J., Rigdon, C. E., Cloyd, T. C., Forstner, M. J., Ball, J., Bosch, S., Bottichio, L., Cantu, V., Melka, D. C., Ishow, W., Slette, S., Irvin, K., Wise, M., Tarr, C., Mahon, B., Smith, K. E. und Silk, B. J. (2014). Notes from the field: multistate outbreak of listeriosis linked to soft-ripened cheese—United States, 2013. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **63**(13): 294–295.
- Commichau, F. M., Forchhammer, K. und Stülke, J. (2006). Regulatory links between carbon and nitrogen metabolism. *Curr Opin Microbiol* **9**(2): 167–172.
- Commichau, F. M., Gunka, K., Landmann, J. J. und Stülke, J. (2008). Glutamate metabolism in *Bacillus subtilis*: gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *J Bacteriol* **190**(10): 3557–3564.
- Commichau, F. M., Wacker, I., Schleider, J., Blencke, H.-M., Reif, I., Tripal, P. und Stulke, J. (2007). Characterization of *Bacillus subtilis* mutants with carbon source-independent glutamate biosynthesis. *J Mol Microbiol Biotechnol* **12**(1-2): 106–113.
- Conner, C. P., Heithoff, D. M., Julio, S. M., Sinsheimer, R. L. und Mahan, M. J. (1998). Differential patterns of acquired virulence genes distinguish *Salmonella* strains. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(8): 4641–4645.
- Conradt, B. und Xue, D. (2005). Programmed cell death. *WormBook Oct* **6**: 1–13.
- Corsi, A. K., Wightman, B. und Chalfie, M. (2015). A transparent window into biology: a primer on *Caenorhabditis elegans*. *WormBook Jun* **18**: 1–31.
- Cossart, P. und Toledo-Arana, A. (2008). *Listeria monocytogenes*, a unique model in infection biology: an overview. *Microbes Infect* **10**(9): 1041–1050.
- Couillault, C. und Ewbank, J. J. (2002). Diverse bacteria are pathogens of *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* **70**(8): 4705–4707.
- Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D. und Merrick, M. (2002). Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J* **21**(4): 536–545.

- Cunin, R., Glansdorff, N., Piérard, A. und Stalon, V. (1986). Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev* **50**(3): 314–352.
- Dai, D., Holder, D., Raskin, L. und Xi, C. (2011). Separation of the bacterial species, *Escherichia coli*, from mixed-species microbial communities for transcriptome analysis. *BMC Microbiol* **11**: 59.
- Darby, C. (2005). Interactions with microbial pathogens. *WormBook* **Sep 6**: 1–15.
- Darby, C., Cosma, C. L., Thomas, J. H. und Manoil, C. (1999). Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(26): 15202–15207.
- de Valk, H., Jacquet, C., Goulet, V., Vaillant, V., Perra, A., Simon, F., Desenclos, J. C. und Martin, P. (2005). Surveillance of *Listeria* infections in Europe. *Euro Surveill* **10**(10): 527 ff.
- Débarbouillé, M. und Fisher, S. H. (2002). Nitrogen source utilization and its regulation. In: A. L. Sonenshein, J. A. Hoch und R. Losick (Hg.): *Bacillus subtilis* and its closest relatives. Washington, D.C. American Society of Microbiology: 181–191.
- Degnan, B. A., Fontaine, M. C., Doebereiner, A. H., Lee, J. J., Mastroeni, P., Dougan, G., Goodacre, J. A. und Kehoe, M. A. (2000). Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect Immun* **68**(5): 2441–2448.
- den Bakker, H. C., Warchocki, S., Wright, E. M., Allred, A. F., Ahlstrom, C., Manuel, C. S., Stasiewicz, M. J., Burrell, A., Roof, S., Strawn, L. K., Fortes, E., Nightingale, K. K., Kephart, D. und Wiedmann, M. (2014). *Listeria floridensis* sp. nov., *Listeria aquatica* sp. nov., *Listeria cornellensis* sp. nov., *Listeria riparia* sp. nov. and *Listeria grandensis* sp. nov., from agricultural and natural environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **64**(Pt 6): 1882–1889.
- Detsch, C. und Stülke, J. (2003). Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiology* **149**(Pt 11): 3289–3297.
- Doroshchuk, N. A., Gelfand, M. S. und Rodionov, D. A. (2006). Regulation of nitrogen metabolism in gram-positive bacteria. *Mol Biol (Mosk)* **40**(5): 919–926.
- Dramsi, S., Biswas, I., Maguin, E., Braun, L., Mastroeni, P. und Cossart, P. (1995). Entry of *Listeria monocytogenes* into hepatocytes requires expression of inlB, a surface protein of the internalin multigene family. *Mol Microbiol* **16**(2): 251–261.
- Dramsi, S. und Cossart, P. (1998). Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**: 137–166.
- Drevets, D. A., Canono, B. P., Leenen, P. J. und Campbell, P. A. (1994). Gentamicin kills intracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* **62**(6): 2222–2228.
- Dussurget, O., Pizarro-Cerda, J. und Cossart, P. (2004). Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. *Annu Rev Microbiol* **58**: 587–610.
- EFSA und ECDC (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal* **13**(1): 3991 ff.
- Eisenreich, W. und Bacher, A. (2007). Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. *Phytochemistry* **68**(22-24): 2799–2815.
- Eisenreich, W., Dandekar, T., Heesemann, J. und Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. *Nat Rev Microbiol* **8**(6): 401–412.
- Eisenreich, W. und Eylert, E. (2010). *Isotopologue Profiling*. Auf der Suche nach den Achillesfersen pathogener Bakterien. *BIOspektrum* **16**(4): 435–437.
- Eisenreich, W., Heesemann, J., Rudel, T. und Goebel, W. (2015). Metabolic adaptations of intracellular bacterial pathogens and their mammalian host cells during infection ("Pathometabolism"). *Microbiol Spectr* **3**(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0002-2014

- Eisenreich, W., Kutzner, E., Kern, T. und Fuchs, T. M. (2016). Bakterieller Metabolismus als Pathogenitätsfaktor. Ein neuer Ansatz in der Infektionsbiologie. *Naturwiss Rundsch* **69**(4): 174–180
- Eisenreich, W., Slaghuis, J., Laupitz, R., Bussemer, J., Stritzker, J., Schwarz, C., Schwarz, R., Dandekar, T., Goebel, W. und Bacher, A. (2006). ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(7): 2040–2045.
- Eylert, E., Schär, J., Mertins, S., Stoll, R., Bacher, A., Goebel, W. und Eisenreich, W. (2008). Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. *Mol Microbiol* **69**(4): 1008–1017.
- Farber, J. M. und Peterkin, P. I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiol Rev* **55**(3): 476–511.
- Fisher, S. H. (1999). Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! *Mol Microbiol* **32**(2): 223–232.
- Forchhammer, K. (2007). Glutamine signalling in bacteria. *Front Biosci* **12**: 358–370.
- Forchhammer, K. (2008). P_{II} signal transducers. Novel functional and structural insights. *Trends Microbiol* **16**(2): 65–72.
- Forrester, S., Milillo, S. R., Hoose, W. A., Wiedmann, M. und Schwab, U. (2007). Evaluation of the pathogenicity of *Listeria* spp. in *Caenorhabditis elegans*. *Foodborne Pathog Dis* **4**(1): 67–73.
- Friedman, M. E. und Roessler, W. G. (1961). Growth of *Listeria monocytogenes* in defined media. *J Bacteriol* **82**: 528–533.
- Fuchs, T. M., Eisenreich, W., Heesemann, J. und Goebel, W. (2012a). Metabolic adaptation of human pathogenic and related nonpathogenic bacteria to extra- and intracellular habitats. *FEMS Microbiol Rev* **36**(2): 435–462.
- Fuchs, T. M., Eisenreich, W., Kern, T. und Dandekar, T. (2012b). Toward a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection. *Front Microbiol* **3**: 23.
- Fulde, M., Willenborg, J., Huber, C., Hitzmann, A., Willms, D., Seitz, M., Eisenreich, W., Valentin-Weigand, P. und Goethe, R. (2014). The arginine-ornithine antiporter ArcD contributes to biological fitness of *Streptococcus suis*. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 131.
- Gaillard, J. L., Berche, P., Frehel, C., Guin, E. und Cossart, P. (1991). Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell* **65**(7): 1127–1141.
- Gandhi, S., Santelli, J., Mitchell, D. H., Stiles, J. W. und Sanadi, D. R. (1980). A simple method for maintaining large, aging populations of *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev* **12**(2): 137–150.
- Garsin, D. A. (2010). Ethanolamine utilization in bacterial pathogens: roles and regulation. *Nat Rev Microbiol* **8**(4): 290–295.
- Garsin, D. A. (2012). Ethanolamine: a signal to commence a host-associated lifestyle? *MBio* **3**(4): e00172-12.
- Garsin, D. A., Sifri, C. D., Mylonakis, E., Qin, X., Singh, K. V., Murray, B. E., Calderwood, S. B. und Ausubel, F. M. (2001). A simple model host for identifying Gram-positive virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(19): 10892–10897.
- Gefen, O., Fridman, O., Ronin, I. und Balaban, N. Q. (2014). Direct observation of single stationary-phase bacteria reveals a surprisingly long period of constant protein production activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**(1): 556–561.
- Gillmaier, N., Götz, A., Schulz, A., Eisenreich, W. und Goebel, W. (2012). Metabolic responses of primary and transformed cells to intracellular *Listeria monocytogenes*. *PLoS One* **7**(12): e52378.
- Gilmour, M. W., Graham, M., van Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., Trout-Yakel, K. M., Larios, O., Allen, V., Lee, B. und Nadon, C. (2010). High-throughput genome

- sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. *BMC Genomics* **11**: 120.
- Glaser, P., Frangeul, L., Buchrieser, C., Rusniok, C., Amend, A., Baquero, F., Berche, P., Bloecker, H., Brandt, P., Chakraborty, T., Charbit, A., Chetouani, F., Couvé, E., Daruvar, A. de, Dehoux, P., Domann, E., Domínguez-Bernal, G., Duchaud, E., Durant, L., Dussurget, O., Entian, K. D., Fsihi, H., García-Del Portillo, F., Garrido, P., Gautier, L., Goebel, W., Gómez-López, N., Hain, T., Hauf, J., Jackson, D., Jones, L. M., Kaerst, U., Kreft, J., Kuhn, M., Kunst, F., Kurapkat, G., Madueno, E., Maitournam, A., Vicente, J. M., Ng, E., Nedjari, H., Nordsiek, G., Novella, S., Pablos, B. de, Pérez-Díaz, J. C., Purcell, R., Rammel, B., Rose, M., Schlueter, T., Simoes, N., Tierrez, A., Vázquez-Boland, J. A., Voss, H., Wehland, J. und Cossart, P. (2001). Comparative genomics of *Listeria* species. *Science* **294**(5543): 849–852.
- Goetz, M., Bubert, A., Wang, G., Chico-Calero, I., Vazquez-Boland, J. A., Beck, M., Slaghuys, J., Szalay, A. A. und Goebel, W. (2001). Microinjection and growth of bacteria in the cytosol of mammalian host cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**(21): 12221–12226.
- Golden, T. R. und Melov, S. (2007). Gene expression changes associated with aging in *C. elegans*. *WormBook*(Feb 12): 1–12.
- Götz, A., Eylert, E., Eisenreich, W. und Goebel, W. (2010). Carbon metabolism of enterobacterial human pathogens growing in epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *PLoS One* **5**(5): e10586.
- Gouin, E., Adib-Conquy, M., Balestrino, D., Nahori, M.-A., Villiers, V., Colland, F., Dramsi, S., Dussurget, O. und Cossart, P. (2010). The *Listeria monocytogenes* InlC protein interferes with innate immune responses by targeting the I κ B kinase subunit IKK α . *Proc Natl Acad Sci USA* **107**(40): 17333–17338.
- Gouw, J. W., Tops, B. B. J. und Krijgsveld, J. (2011). Metabolic labeling of model organisms using heavy nitrogen (¹⁵N). *Methods Mol Biol* **753**: 29–42.
- Graves, L. M., Helsel, L. O., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Roof, S. E., Orsi, R. H., Fortes, E. D., Milillo, S. R., den Bakker, Henk C, Wiedmann, M., Swaminathan, B. und Sauders, B. D. (2010). *Listeria marthii* sp. nov., isolated from the natural environment, Finger Lakes National Forest. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**(Pt 6): 1280–1288.
- Gray, M. L. und Killinger, A. H. (1966). *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol Rev* **30**(2): 309–382.
- Grif, K., Patscheider, G., Dierich, M. P. und Allerberger, F. (2003). Incidence of fecal carriage of *Listeria monocytogenes* in three healthy volunteers: a one-year prospective stool survey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **22**(1): 16–20.
- Groot Kormelink, T., Koenders, E., Hagemeijer, Y., Overmars, L., Siezen, R. J., Vos, W. M. de und Francke, C. (2012). Comparative genome analysis of central nitrogen metabolism and its control by GlnR in the class Bacilli. *BMC Genomics* **13**(1): 191.
- Grubmüller, S., Schauer, K., Goebel, W., Fuchs, T. M. und Eisenreich, W. (2014). Analysis of carbon substrates used by *Listeria monocytogenes* during growth in J774A.1 macrophages suggests a bipartite intracellular metabolism. *Front Cell Infect Microbiol* **4**: 156.
- Guha, S., Klees, M., Wang, X., Li, J., Dong, Y. und Cao, M. (2013). Influence of planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* on *Caenorhabditis elegans*. *Arch Microbiol* **195**(1): 19–26.
- Guillet, C., Join-Lambert, O., Le Monnier, A., Leclercq, A., Mechaï, F., Mamzer-Bruneel, M. F., Bielecka, M. K., Scortti, M., Disson, O., Berche, P., Vazquez-Boland, J., Lortholary, O. und Lecuit, M. (2010). Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. *Emerg Infect Dis* **16**(1): 136–138.
- Gunka, K. und Commichau, F. M. (2012). Control of glutamate homeostasis in *Bacillus subtilis*: a complex interplay between ammonium assimilation, glutamate biosynthesis and degradation. *Mol Microbiol* **85**(2): 213–224.

- Hächler, H., Marti, G., Giannini, P., Lehner, A., Jost, M., Beck, J., Weiss, F., Bally, B., Jermini, M., Stephan, R. und Baumgartner, A. (2013). Outbreak of listeriosis due to imported cooked ham, Switzerland 2011. *Euro Surveill* **18**(18): 20469.
- Hagens, S. und Loessner, M. J. (2014). Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front Microbiol* **5**: 159.
- Hain, T., Chatterjee, S. S., Ghai, R., Kuenne, C. T., Billion, A., Steinweg, C., Domann, E., Kärst, U., Jansch, L., Wehland, J., Eisenreich, W., Bacher, A., Joseph, B., Schär, J., Kreft, J., Klumpp, J., Loessner, M. J., Dorscht, J., Neuhaus, K., Fuchs, T. M., Scherer, S., Doumith, M., Jacquet, C., Martin, P., Cossart, P., Rusniok, C., Glaser, P., Buchrieser, C., Goebel, W. und Chakraborty, T. (2007). Pathogenomics of *Listeria* spp. *Int J Med Microbiol* **297**(7-8): 541–557.
- Hamon, M., Bierne, H. und Cossart, P. (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat Rev Microbiol* **4**(6): 423–434.
- Hanna, S. E. und Wang, H. H. (2006). Assessment of environmental factors on *Listeria monocytogenes* Scott A inlA gene expression by relative quantitative Taqman real-time reverse transcriptase PCR. *J Food Prot* **69**(11): 2754–2757.
- Häuslein, I., Manske, C., Goebel, W., Eisenreich, W. und Hilbi, H. (2015). Pathway analysis using ¹³C-glycerol and other carbon tracers reveals a bipartite metabolism of *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol* **100**(2): 229–246.
- Hernandez-Milian, A. und Payeras-Cifre, A. (2014). What is new in listeriosis? *Biomed Res Int* **2014**: 358051.
- Heuner, K. und Eisenreich, W. (2013). The intracellular metabolism of *Legionella* by Isotopologue Profiling. *Methods Mol Biol* **954**: 163–181.
- Hodgkin, J., Kuwabara, P. E. und Corneliusen, B. (2000). A novel bacterial pathogen, *Microbacterium nematophilum*, induces morphological change in the nematode *C. elegans*. *Curr Biol* **10**(24): 1615–1618.
- Hu, P., Leighton, T., Ishkhanova, G. und Kustu, S. (1999). Sensing of nitrogen limitation by *Bacillus subtilis*: comparison to enteric bacteria. *J Bacteriol* **181**(16): 5042–5050.
- Hudson, J. A. (1992). Efficacy of high sodium chloride concentrations for the destruction of *Listeria monocytogenes*. *Lett Appl Microbiol* **14**(4): 178–180.
- Hulme, S. E. und Whitesides, G. M. (2011). Chemistry and the worm: *Caenorhabditis elegans* as a platform for integrating chemical and biological research. *Angew Chem Int Ed Engl* **50**(21): 4774–4807.
- Jamali, H., Chai, L. C. und Thong, K. L. (2013). Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media. *Food Control* **32**(1): 19–24.
- Joseph, B. und Goebel, W. (2007). Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect* **9**(10): 1188–1195.
- Joseph, B., Mertins, S., Stoll, R., Schär, J., Umesha, K. R., Luo, Q., Müller-Altrock, S. und Goebel, W. (2008). Glycerol metabolism and PrfA activity in *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **190**(15): 5412–5430.
- Joseph, B., Przybilla, K., Stühler, C., Schauer, K., Slaghuis, J., Fuchs, T. M. und Goebel, W. (2006). Identification of *Listeria monocytogenes* genes contributing to intracellular replication by expression profiling and mutant screening. *J Bacteriol* **188**(2): 556–568.
- Kaletta, T. und Hengartner, M. O. (2006). Finding function in novel targets. *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov* **5**(5): 387–399.
- Kaspar, D., Auer, F., Schardt, J., Schindele, F., Ospina, A., Held, C., Ehrenreich, A., Scherer, S. und Müller-Herbst, S. (2014). Temperature- and nitrogen source-dependent regulation of GlnR target genes in *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett* **355**(2): 131–141.

- Kawsar, H. I., Ohtani, K., Okumura, K., Hayashi, H. und Shimizu, T. (2004). Organization and transcriptional regulation of *myo*-inositol operon in *Clostridium perfringens*. *FEMS Microbiol Lett* **235**(2): 289–295.
- Kern, T., Kutzner, E., Eisenreich, W. und Fuchs, T. M. (2016). Pathogen-nematode interaction: Nitrogen supply of *Listeria monocytogenes* during growth in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Microbiol Rep* **8**(1): 20–29.
- Klarsfeld, A. D., Goossens, P. L. und Cossart, P. (1994). Five *Listeria monocytogenes* genes preferentially expressed in infected mammalian cells: *plcA*, *purH*, *purD*, *pyrE* and an arginine ABC transporter gene, *arpJ*. *Mol Microbiol* **13**(4): 585–597.
- Kloosterman, T. G., Hendriksen, W. T., Bijlsma, J. J., Bootsma, H. J., van Hijum, S. A., Kok, J., Hermans, P. W. und Kuipers, O. P. (2006). Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem* **281**(35): 25097–25109.
- Koch, J., Dworak, R., Prager, R., Becker, B., Brockmann, S., Wicke, A., Wichmann-Schauer, H., Hof, H., Werber, D. und Stark, K. (2010). Large listeriosis outbreak linked to cheese made from pasteurized milk, Germany, 2006-2007. *Foodborne Pathog Dis* **7**(12): 1581–1584.
- Korbel, J. O., Doerks, T., Jensen, L. J., Perez-Iratxeta, C., Kaczanowski, S., Hooper, S. D., Andrade, M. A. und Bork, P. (2005). Systematic association of genes to phenotypes by genome and literature mining. *PLoS Biol* **3**(5): e134.
- Kreft, J. und Vázquez-Boland, J. A. (2001). Regulation of virulence genes in *Listeria*. *Int J Med Microbiol* **291**(2): 145–157.
- Krijgsveld, J., Ketting, R. F., Mahmoudi, T., Johansen, J., Artal-Sanz, M., Verrijzer, C. P., Plasterk, R. H. A. und Heck, A. J. R. (2003). Metabolic labeling of *C. elegans* and *D. melanogaster* for quantitative proteomics. *Nat Biotechnol* **21**(8): 927–931.
- Kuhn, M. und Goebel, W. (1997). Responses by murine macrophages infected with *Listeria monocytogenes* crucial for the development of immunity to this pathogen. *Immunol Rev* **158**: 57–67.
- Kutzner, E. (nicht veröffentlicht). Stoffwechseluntersuchungen von pathogenen Bakterien und Pflanzen mit Hilfe von *Isotopologue Profiling* (GC/MS) und ¹H-NMR-Metabolomics.
- Kutzner, E., Kern, T., Felsl, A., Eisenreich, W. und Fuchs, T. M. (2016). Isotopologue profiling of the listerial N-metabolism. *Mol Microbiol* **100**(2): 315–327.
- Labrousse, A., Chauvet, S., Couillault, C., Kurz, C. L. und Ewbank, J. J. (2000). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol* **10**(23): 1543–1545.
- Lakowski, B. und Hekimi, S. (1998). The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**(22): 13091–13096.
- Lang Halter, E., Neuhaus, K. und Scherer, S. (2013). *Listeria weihenstephanensis* sp. nov., isolated from the water plant *Lemna trisulca* taken from a freshwater pond. *Int J Syst Evol Microbiol* **63**(Pt 2): 641–647.
- Larsen, R., Kloosterman, T. G., Kok, J. und Kuipers, O. P. (2006). GlnR-mediated regulation of nitrogen metabolism in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **188**(13): 4978–4982.
- Leclercq, A., Clermont, D., Bizet, C., Grimont, Patrick A D, Le Flèche-Matéos, A., Roche, S. M., Buchrieser, C., Cadet-Daniel, V., Le Monnier, A., Lecuit, M. und Allerberger, F. (2010). *Listeria rocourtiae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**(Pt 9): 2210–2214.
- Lecuit, M., Dramsi, S., Gottardi, C., Fedor-Chaiken, M., Gumbiner, B. und Cossart, P. (1999). A single amino acid in E-cadherin responsible for host specificity towards the human pathogen *Listeria monocytogenes*. *EMBO J* **18**(14): 3956–3963.
- Lecuit, M., Vandormael-Pournin, S., Lefort, J., Huerre, M., Gounon, P., Dupuy, C., Babinet, C. und Cossart, P. (2001). A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier. *Science* **292**(5522): 1722–1725.

- Lee, T. A.; Lee, T. A. (1998). *A Beginner's Guide to Mass Spectral Interpretation*. Chichester: Wiley.
- Legakis, N. J., Papavassiliou, J. T. und Xilinas, M. E. (1976). Inositol as a selective substrate for the growth of *Klebsiellae* and *Serratiae*. *Zentralbl Bakteriol Orig A* **235**(4): 453–458.
- Leimeister-Wachter, M., Domann, E. und Chakraborty, T. (1992). The expression of virulence genes in *Listeria monocytogenes* is thermoregulated. *J Bacteriol* **174**(3): 947–952.
- Liu, D. (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J Med Microbiol* **55**(6): 645–659.
- Maadani, A., Fox, K. A., Mylonakis, E. und Garsin, D. A. (2007). *Enterococcus faecalis* mutations affecting virulence in the *Caenorhabditis elegans* model host. *Infect Immun* **75**(5): 2634–2637.
- Magasanik, B. (1993). The regulation of nitrogen utilization in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**(1): 34–40.
- Marco, A. J., Prats, N., Ramos, J. A., Briones, V., Blanco, M., Dominguez, L. und Domingo, M. (1992). A microbiological, histopathological and immunohistological study of the intragastric inoculation of *Listeria monocytogenes* in mice. *J Comp Pathol* **107**(1): 1–9.
- Marin, K. und Krämer, R. (2009). Aminosäuretransport. Import und Export von Aminosäuren in Bakterien. *BIOspektrum* **15**(6): 600–604.
- Marquis, H., Bouwer, H. G., Hinrichs, D. J. und Portnoy, D. A. (1993). Intracytoplasmic growth and virulence of *Listeria monocytogenes* auxotrophic mutants. *Infect Immun* **61**(9): 3756–3760.
- Marr, A. K., Joseph, B., Mertins, S., Ecke, R., Muller-Altrock, S. und Goebel, W. (2006). Overexpression of PrfA leads to growth inhibition of *Listeria monocytogenes* in glucose-containing culture media by interfering with glucose uptake. *J Bacteriol* **188**(11): 3887–3901.
- Martin, F.-P. J., Wang, Y., Yap, I. K. S., Sprenger, N., Lindon, J. C., Rezzi, S., Kochhar, S., Holmes, E. und Nicholson, J. K. (2009). Topographical variation in murine intestinal metabolic profiles in relation to microbiome speciation and functional ecological activity. *J Proteome Res* **8**(7): 3464–3474.
- Maslowski, K. M., Vieira, A. T., Ng, A., Kranich, J., Sierro, F., Yu, D., Schilter, H. C., Rolph, M. S., Mackay, F., Artis, D., Xavier, R. J., Teixeira, M. M. und Mackay, C. R. (2009). Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature* **461**(7268): 1282–1286.
- Mateus, T., Silva, J., Maia, R. L. und Teixeira, P. (2013). Listeriosis during pregnancy: a public health concern. *ISRN Obstet Gynecol* **2013**: 851712.
- McGann, P., Ivanek, R., Wiedmann, M. und Boor, K. J. (2007). Temperature-dependent expression of *Listeria monocytogenes* internalin and internalin-like genes suggests functional diversity of these proteins among the listeriae. *Appl Environ Microbiol* **73**(9): 2806–2814.
- McGhee, J. D. (2007). The *C. elegans* intestine. *WormBook* **Mar 27**: 1–36.
- Meija, J., Coplen, T. B., Berglund, M., Brand, W. A., Bièvre, P. de, Gröning, M., Holden, N. E., Irrgeher, J., Loss, R. D., Walczyk, T. und Prohaska, T. (2016). Isotopic compositions of the elements 2013 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* **88**(3): 293–306.
- Mellin, J. R., Tiensuu, T., Becavin, C., Gouin, E., Johansson, J. und Cossart, P. (2013). A riboswitch-regulated antisense RNA in *Listeria monocytogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**(32): 13132–13137.
- Meloni, D., Galluzzo, P., Mureddu, A., Piras, F., Griffiths, M. und Mazzette, R. (2009). *Listeria monocytogenes* in RTE foods marketed in Italy: prevalence and automated *EcoRI* ribotyping of the isolates. *Int J Food Microbiol* **129**(2): 166–173.

- Mengaud, J., Ohayon, H., Gounon, P., Mege R-M und Cossart, P. (1996). E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells. *Cell* **84**(6): 923–932.
- Merrick, M. J. und Edwards, R. A. (1995). Nitrogen control in bacteria. *Microbiol Rev* **59**(4): 604–622.
- Mertins, S., Joseph, B., Goetz, M., Ecke, R., Seidel, G., Sprehe, M., Hillen, W., Goebel, W. und Muller-Altrock, S. (2007). Interference of components of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system with the central virulence gene regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **189**(2): 473–490.
- Milohanic, E., Glaser, P., Coppée, J.-Y., Frangeul, L., Vega, Y., Vázquez-Boland, J. A., Kunst, F., Cossart, P. und Buchrieser, C. (2003). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* identifies three groups of genes differently regulated by PrfA. *Mol Microbiol* **47**(6): 1613–1625.
- Mitchell, D. H., Stiles, J. W., Santelli, J. und Sanadi, D. R. (1979). Synchronous growth and aging of *Caenorhabditis elegans* in the presence of fluorodeoxyuridine. *J Gerontol* **34**(1): 28–36.
- Moshtaghi, H., Garg, S. R. und Mandokhot, U. V. (2003). Prevalence of *Listeria* in soil. *Indian J Exp Biol* **41**(12): 1466–1468.
- Moye, Z. D., Burne, R. A. und Zeng, L. (2014). Uptake and metabolism of N-acetylglucosamine and glucosamine by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* **80**(16): 5053–5067.
- Munk, M. E. und Kaufmann, S. H. (1988). *Listeria monocytogenes* reactive T lymphocytes in healthy individuals. *Microbial pathogenesis* **5**(1): 49–54.
- Muñoz-Elías, E. J. und McKinney, J. D. (2006). Carbon metabolism of intracellular bacteria. *Cell Microbiol* **8**(1): 10–22.
- Murray, E. G. D., Webb, R. A. und Swann, M. B. R. (1926). A disease of rabbits characterised by a large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n.sp.). *J Pathol Bacteriol*(29): 407–439.
- Nadon, C. A., Woodward, D. L., Young, C., Rodgers, F. G. und Wiedmann, M. (2001). Correlations between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. *J Clin Microbiol* **39**(7): 2704–2707.
- Neuhaus, K., Satorhelyi, P., Schauer, K., Scherer, S. und Fuchs, T. M. (2013). Acid shock of *Listeria monocytogenes* at low environmental temperatures induces prfA, epithelial cell invasion, and lethality towards *Caenorhabditis elegans*. *BMC Genomics* **14**: 285.
- Ooi, S. T. und Lorber, B. (2005). Gastroenteritis due to *Listeria monocytogenes*. *Clin Infect Dis* **40**(9): 1327–1332.
- O’Riordan, M., Moors, M. A. und Portnoy, D. A. (2003). *Listeria* intracellular growth and virulence require host-derived lipoic acid. *Science* **302**(5644): 462–464.
- Oza, J. P., Yeh, J. B. und Reich, N. O. (2005). DNA methylation modulates *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence in *Caenorhabditis elegans*. *FEMS Microbiol Lett* **245**(1): 53–59.
- Peel, M., Donachie, W. und Shaw, A. (1988). Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol* **134**(8): 2171–2178.
- Petran, R. L. und Zottola, E. A. (1989). A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J Food Science* **54**(2): 458–460.
- Phan-Thanh, L. und Gormon, T. (1997). A chemically defined minimal medium for the optimal culture of *Listeria*. *Int J Food Microbiol* **35**(1): 91–95.
- Pickering, M. V. und Newton, P. (1990). Amino acid hydrolysis: Old problems, new solutions. *LC-GC International* **11**(3): 22–26.
- Pine, L., Malcolm, G. B., Brooks, J. B. und Daneshvar, M. I. (1989). Physiological studies on the growth and utilization of sugars by *Listeria* species. *Can J Microbiol* **35**(2): 245–254.

- Pirie, J. H. H.** (1927). A new disease of veld rodents. "Tiger river disease". *Publ S Afr Inst Med Res*(4): 163–186.
- Popowska, M., Osińska, M. und Rzczkowska, M.** (2012). N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase (NagA) of *Listeria monocytogenes* EGD, an essential enzyme for the metabolism and recycling of amino sugars. *Arch Microbiol* **194**(4): 255–268.
- Portnoy, D. A.** (1992). Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. *Curr Opin Immunol* **4**(1): 20–24.
- Premaratne, R. J., Lin, W. J. und Johnson, E. A.** (1991). Development of an improved chemically defined minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **57**(10): 3046–3048.
- Price-Carter, M., Tingey, J., Bobik, T. A. und Roth, J. R.** (2001). The alternative electron acceptor tetrathionate supports B12-dependent anaerobic growth of *Salmonella enterica* serovar typhimurium on ethanolamine or 1,2-propanediol. *J Bacteriol* **183**(8): 2463–2475.
- Pron, B., Boumaila, C., Jaubert, F., Sarnacki, S., Monnet, J. P., Berche, P. und Gaillard, J. L.** (1998). Comprehensive study of the intestinal stage of listeriosis in a rat ligated ileal loop system. *Infect Immun* **66**(2): 747–755.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.-M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Doré, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S. D. und Wang, J.** (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**(7285): 59–65.
- Raffelsbauer, D., Bubert, A., Engelbrecht, F., Scheinpflug, J., Simm, A., Hess, J., Kaufmann, S. H. und Goebel, W.** (1998). The gene cluster *inlC2DE* of *Listeria monocytogenes* contains additional new internalin genes and is important for virulence in mice. *Mol Gen Genet* **260**(2-3): 144–158.
- Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J., Tang, C. M., Ray, K., Marteyn, B., Sansonetti, P. J. und Tang, C. M.** (2009). Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**(5): 333–340.
- Rehm, N., Georgi, T., Hiery, E., Degner, U., Schmiedl, A., Burkovski, A. und Bott, M.** (2010). L-Glutamine as a nitrogen source for *Corynebacterium glutamicum*: derepression of the AmtR regulon and implications for nitrogen sensing. *Microbiology* **156**(Pt 10): 3180–3193.
- Reitzer, L. J.** (1996). Sources of nitrogen and their utilization. In: F. C. Neidhardt und R. Curtiss (Hg.): *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and molecular biology. 2nd ed. Washington, D.C. ASM Press: 380–390.
- Reitzer, L. J.** (2003). Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **57**: 155–176.
- Riddle, D. L., Blumenthal, T., Meyer, B. J. und Priess, J. R.** (1997). Chapter 1: Introduction to *C. elegans*. In: D. L. Riddle (Hg.): *C. elegans* II. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press (33): 1–22.
- Robert Koch Institut** (2016). Epidemiologisches Bulletin (13). doi: 10.17886/EpiBull-2016-020
- Rocourt, J. und Buchrieser, C.** (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy and identification. In: E. H. Marth und E. T. Ryser (Hg.): *Listeria*, listeriosis, and food safety. 3rd ed. Boca Raton, Fla, London. CRC Press (Food science and technology, 160): 1–20.
- Roof, D. M. und Roth, J. R.** (1988). Ethanolamine utilization in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **170**(9): 3855–3863.

- Rothstein, M.** (1963). Nematode biochemistry. III. Excretion products. *Comp Biochem Physiol* **34**: 51–59.
- Rothstein, M. und Rothstein, M.** (1965). Nematode Biochemistry. V. Intermediary metabolism and amino acid interconversions in *Caenorhabditis briggsae*. *Comp Biochem Physiol* **14**: 541–552.
- Ryan, S., Begley, M., Gahan, C. G. M. und Hill, C.** (2009). Molecular characterization of the arginine deiminase system in *Listeria monocytogenes*: regulation and role in acid tolerance. *Environ Microbiol* **11**(2): 432–445.
- Ryan, S., Hill, C. und Gahan, C. G. M.** (2008). Acid stress responses in *Listeria monocytogenes*. *Adv Appl Microbiol* **65**: 67–91.
- Salyers, A. A. und Pajeau, M.** (1989). Competitiveness of different polysaccharide utilization mutants of *Bacteroides thetaiotaomicron* in the intestinal tracts of germfree mice. *Appl Environ Microbiol* **55**(10): 2572–2578.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L. und Griffin, P. M.** (2011). Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. *Emerg Infect Dis* **17**(1): 7–15.
- Schär, J., Stoll, R., Schauer, K., Loeffler, D. I. M., Eylert, E., Joseph, B., Eisenreich, W., Fuchs, T. M. und Goebel, W.** (2010). Pyruvate carboxylase plays a crucial role in carbon metabolism of extra- and intracellularly replicating *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **192**(7): 1774–1784.
- Schauer, K., Geginat, G., Liang, C., Goebel, W., Dandekar, T. und Fuchs, T. M.** (2010). Deciphering the intracellular metabolism of *Listeria monocytogenes* by mutant screening and modelling. *BMC Genomics* **11**: 573.
- Schauer, K., Stolz, J., Scherer, S. und Fuchs, T. M.** (2009). Both thiamine uptake and biosynthesis of thiamine precursors are required for intracellular replication of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **191**(7): 2218–2227.
- Schneebeli, R. und Egli, T.** (2013). A defined, glucose-limited mineral medium for the cultivation of *Listeria* spp. *Appl Environ Microbiol* **79**(8): 2503–2511.
- Schoder, D., Stessi, B., Szakmary-Brändle, K., Rossmanith, P. und Wagner, M.** (2014). Population diversity of *Listeria monocytogenes* in quargel (acid curd cheese) lots recalled during the multinational listeriosis outbreak 2009/2010. *Food Microbiol* **39**: 68–73.
- Schuchat, A., Swaminathan, B. und Broome, C. V.** (1991). Epidemiology of human listeriosis. *Clin Microbiol Rev* **4**(2): 169–183.
- Seeliger, H. P. und Hohne, K.** (1979). Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods Microbiol*(13): 31–49.
- Shabala, L., Lee, S. H., Cannesson, P. und Ross, T.** (2008). Acid and NaCl limits to growth of *Listeria monocytogenes* and influence of sequence of inimical acid and NaCl levels on inactivation kinetics. *J Food Prot* **71**(6): 1169–1177.
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. und Ireton, K.** (2000). InlB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* **103**(3): 501–510.
- Siddiqi, R. und Khan, M. A.** (1982). Vitamin and nitrogen base requirements for *Listeria monocytogenes* and haemolysin production. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* **253**(2): 225–235.
- Sifri, C. D., Begun, J. und Ausubel, F. M.** (2005). The worm has turned - microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans*. *Trends Microbiol* **13**(3): 119–127.
- Sifri, C. D., Begun, J., Ausubel, F. M. und Calderwood, S. B.** (2003). *Caenorhabditis elegans* as a model host for *Staphylococcus aureus* pathogenesis. *Infect Immun* **71**(4): 2208–2217.
- Slaghuis, J., Goetz, M., Engelbrecht, F. und Goebel, W.** (2004). Inefficient replication of *Listeria innocua* in the cytosol of mammalian cells. *J Infect Dis* **189**(3): 393–401.

- Slaghuis, J., Joseph, B. und Goebel, W.** (2007). Metabolism and Physiology of *Listeria monocytogenes*. In: H. Goldfine und H. Shen (Hg.): *Listeria monocytogenes: Pathogenesis and Host Response*. Norwell. Springer: 63–80.
- Snapir, Y. M., Vaisbein, E. und Nassar, F.** (2006). Low virulence but potentially fatal outcome-*Listeria ivanovii*. *Eur J Intern Med* **17**(4): 286–287.
- Snider, T. A., Fabich, A. J., Conway, T. und Clinkenbeard, K. D.** (2009). *E. coli* O157:H7 catabolism of intestinal mucin-derived carbohydrates and colonization. *Vet Microbiol* **136**(1-2): 150–154.
- Sonenshein, A. L.** (2007). Control of key metabolic intersections in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **5**(12): 917–927.
- Soni, D. K., Singh, M., Singh, D. V. und Dubey, S. K.** (2014). Virulence and genotypic characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetable and soil samples. *BMC Microbiol* **14**: 241.
- Soni, K. A. und Nannapaneni, R.** (2010). Bacteriophage significantly reduces *Listeria monocytogenes* on raw salmon fillet tissue. *J Food Prot* **73**(1): 32–38.
- Spanier, B., Lasch, K., Marsch, S., Benner, J., Liao, W., Hu, H., Kienberger, H., Eisenreich, W. und Daniel, H.** (2009). How the intestinal peptide transporter PEPT-1 contributes to an obesity phenotype in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* **4**(7): e6279.
- Spanier, B., Starke, M., Higel, F., Scherer, S. und Fuchs, T. M.** (2010). *Yersinia enterocolitica* infection and *tcaA*-dependent killing of *Caenorhabditis elegans*. *Appl Environ Microbiol* **76**(18): 6277–6285.
- Srikumar, S. und Fuchs, T. M.** (2011). Ethanolamine utilization contributes to proliferation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in food and in nematodes. *Appl Environ Microbiol* **77**(1): 281–290.
- Staub, L. und Fuchs, T. M.** (2014). From food to cell: nutrient exploitation strategies of enteropathogens. *Microbiology* **160**(Pt 6): 1020–1039.
- Stevens, J. M., Galyov, E. E. und Stevens, M. P.** (2006). Actin-dependent movement of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**(2): 91–101.
- Styer, K. L., Hopkins, G. W., Bartra, S. S., Plano, G. V., Frothingham, R. und Aballay, A.** (2005). *Yersinia pestis* kills *Caenorhabditis elegans* by a biofilm-independent process that involves novel virulence factors. *EMBO Rep.* **6**(10): 992–997.
- Swaminathan, B. und Gerner-Smidt, P.** (2007). The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect* **9**(10): 1236–1243.
- Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G. und Ausubel, F. M.** (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(5): 2408–2413.
- Thomsen, L. E., Slutz, S. S., Tan, M.-W. und Ingmer, H.** (2006). *Caenorhabditis elegans* is a model host for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **72**(2): 1700–1701.
- Toledo-Arana, A., Dussurget, O., Nikitas, G., Sesto, N., Guet-Revillet, H., Balestrino, D., Loh, E., Gripenland, J., Tiensuu, T., Vaitkevicius, K., Barthelemy, M., Vergassola, M., Nahori, M.-A., Soubigou, G., Régnauld, B., Coppée, J.-Y., Lecuit, M., Johansson, J. und Cossart, P.** (2009). The *Listeria* transcriptional landscape from saprophytism to virulence. *Nature* **459**(7249): 950–956.
- Trivett, T. L. und Meyer, E. A.** (1971). Citrate cycle and related metabolism of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **107**(3): 770–779.
- Tsai, H.-N. und Hodgson, D. A.** (2003). Development of a synthetic minimal medium for *Listeria monocytogenes*. *Appl Environ Microbiol* **69**(11): 6943–6945.
- Tsoy, O., Ravcheev, D. und Mushegian, A.** (2009). Comparative genomics of ethanolamine utilization. *J Bacteriol* **191**(23): 7157–7164.
- Vanfleteren, J. R. und Vreese, A. de** (1996). Rate of aerobic metabolism and superoxide production rate potential in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Exp Zool* **274**(2): 93–100.

- Vázquez-Boland, J. A., Kuhn, M., Berche, P., Chakraborty, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn, B., Wehland, J. und Kreft, J. (2001). *Listeria pathogenesis* and molecular virulence determinants. *Clin Microbiol Rev* **14**(3): 584–640.
- Weis, J. und Seeliger, H. P. (1975). Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl Microbiol* **30**(1): 29–32.
- Weller, D., Andrus, A., Wiedmann, M. und den Bakker, Henk C (2015). *Listeria booriae* sp. nov. and *Listeria newyorkensis* sp. nov., from food processing environments in the USA. *Int J Syst Evol Microbiol* **65**(Pt 1): 286–292.
- Welshimer, H. J. (1963). Vitamin requirements of *Listeria monocytogenes*. *J Bacteriol* **85**: 1156–1159.
- Winter, C. H., Brockmann, S. O., Sonnentag, S. R., Schaupp, T., Prager, R., Hof, H., Becker, B., Stegmanns, T., Roloff, H. U., Vollrath, G., Kuhm, A. E., Mezger, B. B., Schmolz, G. K., Klittich, G. B., Pfaff, G. und Piechotowski, I. (2009). Prolonged hospital and community-based listeriosis outbreak caused by ready-to-eat scalded sausages. *J Hosp Infect* **73**(2): 121–128.
- Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Roth, J. R. und Bäuml, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature* **467**(7314): 426–429.
- Winter, S. E., Winter, M. G., Xavier, M. N., Thiennimitr, P., Poon, V., Keestra, A. M., Laughlin, R. C., Gomez, G., Wu, J., Lawhon, S. D., Popova, I. E., Parikh, S. J., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Stewart, V. J. und Bäuml, A. J. (2013). Host-derived nitrate boosts growth of *E. coli* in the inflamed gut. *Science* **339**(6120): 708–711.
- Wu, D., Rea, S. L., Cypser, J. R. und Johnson, T. E. (2009). Mortality shifts in *Caenorhabditis elegans*: remembrance of conditions past. *Aging Cell* **8**(6): 666–675.
- Yen, K. und Mobbs, C. V. (2010). Evidence for only two independent pathways for decreasing senescence in *Caenorhabditis elegans*. *Age (Dordr)* **32**(1): 39–49.
- Yoshida, K. I., Aoyama, D., Ishio, I., Shibayama, T. und Fujita, Y. (1997). Organization and transcription of the *myo*-inositol operon, *iol*, of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **179**(14): 4591–4598.
- Yousef, A. und Lado, B. (2007). Characteristics of *Listeria monocytogenes* important to food processors. In: E. H. Marth und E. T. Ryser (Hg.): *Listeria, listeriosis, and food safety*, Bd. 20076074. 3rd ed. Boca Raton, Fla, London. CRC Press (Food science and technology, 160): 157–213.
- Zamboni, N. und Sauer, U. (2009). Novel biological insights through metabolomics and ¹³C-flux analysis. *Curr Opin Microbiol* **12**(5): 553–558.
- Zlei, M., Ailisei, O. und Carasevici, E. (2003). T cell reactivity to *Listeria monocytogenes* amongst us. *Roum Arch Microbiol Immunol* **62**(3-4): 229–237.

Konferenzbeiträge

Vorträge

Kern Tanja, Kutzner Erika, Eisenreich Wolfgang, Fuchs Thilo M. Host-adapted N-metabolism of *Listeria monocytogenes*. 2nd International Symposium on Metabolism and Bacterial Pathogenesis, Osnabrück, Deutschland. 04/2014.

Kern Tanja, Kutzner Erika, Eisenreich Wolfgang, Fuchs Thilo M. Host-adapted N-metabolism of *Listeria monocytogenes*. SPP1316 Meeting/5th Isotopologue Profiling Workshop, Freising, Deutschland. 11/2013.

Kern Tanja, Kutzner Erika, Eisenreich Wolfgang, Fuchs Thilo M. Host-adapted N-metabolism of *Listeria monocytogenes*. SPP1316 Meeting/4th Isotopologue Profiling Workshop, Obergurgl, Österreich. 10/2012.

Poster-Präsentationen

Kern Tanja, Kutzner Erika, Eisenreich Wolfgang, Fuchs Thilo M. Host-adapted N-metabolism of *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiology Congress, Leipzig, Deutschland. 07/2013.

Danksagung

In einem wissenschaftlichen Werk steckt meist viel mehr als nur die Gedanken und die Arbeit einer einzelnen Person. An dieser Stelle möchte ich mich daher herzlichst bei allen Menschen bedanken, die mir die vergangenen Jahre der Forschungsarbeit, die zu dieser Dissertation geführt haben, ermöglicht haben und welche mich immer und auf jede erdenkliche Art und Weise unterstützt, an mich geglaubt und mich in meinem Tun bestärkt haben. Ich wusste es wirklich jederzeit sehr zu schätzen. Danke.....

apl. Prof. Dr. Thilo M. Fuchs

apl. Prof. Dr. Wolfgang Eisenreich
Univ.-Prof. Dr. Siegfried Scherer
Univ.-Prof. Dr. Rudi F. Vogel
Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Liebl

Erika Kutzner

Dr. Kristina Schauer

Johannes Rothhardt
Dr. Mandy Knüpfer
Lena Staib
Angela Felsl
Patrick Schiwiek
Jessica Hellinckx, Nicoletta Nolle, Katharina Springer

Dr. Stefanie Müller-Herbst, Dr. Daniela Kaspar, Dr. Richard Landstorfer, Mario von Neubeck, Jakob Schardt, Elena Ferrari und allen anderen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des ZIEL

Maria Thole und Brigitte Stable

den Mitgliedern des Worm Community Forums und Britta Spanier

meinen Freunden und „Leidensgenossen“

allen Bands die ich im Labor gehört habe

Brigitte und Werner und meiner ganzen Familie

Alex
