

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
DEPARTMENT CHEMIE
LEHRSTUHL BIOCHEMIE

Interaktion zwischen Metabolismus und Virulenz pathogener Bakterien

-

¹³C-Isotopologstudien und Metabolitprofiling zur Aufklärung von Stoffwechselwegen in pathogenen Bakterien, deren Adaptation an und Beeinflussung von Wirtszellmetabolismen

Nadine Gillmaier

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung
des akademischen Grades eines

Doktor der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. W. Eisenreich

2. Univ.-Prof. Dr. H. Hilbi

Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 25.06.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und von der Fakultät für Chemie am 13.08.2012 angenommen.

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden im Zeitraum von April 2009 bis April 2012 an der Fakultät Chemie, Lehrstuhl Biochemie der Technischen Universität München durchgeführt.

PUBLIKATIONSLISTE

Teile vorliegender Dissertation wurden bereits oder werden in Kürze publiziert in:

[1] Eylert, E*.; Herrmann, V.*; Jules, M.; **Gillmaier, N.**; Lautner, M.; Buchrieser, C.; Eisenreich, W.; Heuner, K. (2010): Isotopologue Profiling of *Legionella pneumophila*: ROLE OF SERINE AND GLUCOSE AS CARBON SUBSTRATES. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (29), S. 22232–22243

[2] **Gillmaier, N***.; Götz, A*.; Schulz, A.; Eisenreich, W.; Goebel, W.: Metabolic Responses of Primary and Transformed Cells to Intracellular Bacteria. (submitted).

* Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

*„Man sieht oft etwas hundert Mal, tausend Mal,
ehe man es zum allerersten Mal wirklich sieht.“*

Christian Morgenstern

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
1.	Isotopolog-Profilings	1
1.1.	Werkzeuge des Isotopolog-Profilings: NMR- und GC/MS-Analytik	2
	Vernetzung von GC/MS und NMR-Daten:	4
2.	Rekonstruktion von Stoffwechselflüssen in der Retrospektive	5
3.	Zentrale Stoffwechselwege	9
3.1.	Kohlenhydratstoffwechsel	9
3.1.1.	Abbau von Glucose	9
	Entner-Doudoroff-Weg (ED):	10
3.1.2.	Gluconeogenese	12
3.2.	Citratzyklus (TCA-Zyklus) und anaplerotische Reaktionen	12
3.3.	Aminosäuremetabolismus	15
3.4.	Fettsäurestoffwechsel	20
3.5.	CO ₂ -Fixierung und Freisetzung	21
4.	Professionell-fakultativ intrazelluläre Erreger	23
5.	Modellorganismus der fakultativ extrazellulären Infektion:	
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	25
5.1.	Virulenzfaktoren von <i>Yersinia</i>	26
5.1.1.	Das Virulenzplasmid pYV (plasmid for <i>Yersinia</i> virulence)	26
5.1.2.	YOPS: <i>Yersinia</i> outer proteins zur Neuprogrammierung der Wirtszelle	27
5.2.	Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) von <i>Yersinien</i> und dessen Regulation	27
6.	Modellorganismen der intrazellulär-invasiven Infektion:	29
6.1.	<i>Legionella pneumophila</i> – ein phagosomaler Erreger	29
6.1.1.	Epidemiologie von <i>L. pneumophila</i> – Legionellose	30
6.1.2.	Der biphasische Lebenszyklus von <i>Legionella pneumophila</i>	30
6.1.3.	Sekretionssysteme und Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i>	35
6.1.4.	Zentrale Stoffwechselprozesse in <i>L. pneumophila</i> – State of the Art	36
6.1.5.	<i>Acanthamoeba castellanii</i> – der natürliche Wirtsorganismus von <i>L. pneumophila</i>	41

6.2.	<i>Legionella oakridgensis</i>	43
6.3.	<i>Listeria monocytogenes</i> – ein cytosolischer Erreger	44
7. Infektionsmodelle im direkten Vergleich: Primäre versus etablierte		
Makrophagen.....		
8. Metabolomics und Metabolit-Profilng		55
9. Zielsetzung.....		57
II.	MATERIAL UND METHODEN	59
1. Materialien		59
1.1.	Geräte	59
1.2.	Chemikalien.....	60
1.3.	Markierte Verbindungen	60
1.4.	Verwendete Software	60
2. <i>Yersinia enterocolitica</i>		61
2.1.	Verwendete <i>Yersinia enterocolitica</i> Stämme	61
2.2.	Verwendete Kulturmedien	61
2.3.	Anzucht und Markierungsexperimente mit <i>Y. enterocolitica</i>	63
3. <i>Acanthamoeba castellanii</i>		65
3.1.	Verwendete Amöbenkultur	65
3.2.	Verwendete Kulturmedien	65
3.3.	Anzucht und Markierung von <i>A. castellanii</i>	66
	In vitro ¹³ C-Markierung von <i>A. castellanii</i> (vormarkiert).....	66
4. <i>Legionella pneumophila</i> Paris		67
4.1.	Verwendete Stämme von <i>L. pneumophila</i> Paris	67
4.2.	Verwendete Kulturmedien	68
4.2.1.	Verwendete Kulturmedien <i>in vitro</i>	68
4.2.2.	Verwendete Kulturmedien <i>in vivo</i>	69
4.3.	<i>Metabolomics</i> -Experimente von <i>L. pneumophila in vitro</i>	70
4.4.	Markierungsexperimente von <i>L. pneumophila in vitro</i>	70
4.5.	Markierungsexperimente von <i>L. pneumophila in vivo</i> in <i>A. castellanii</i>	71
5. <i>Legionella oakridgensis</i>.....		73

6. J774A.1 Makrophagen	75
6.1. Verwendete J774A.1 Makrophagen	75
6.2. Verwendete Kulturmedien und Puffer	75
6.3. Anzucht von J774A.1	76
6.4. Markierungsexperimente mit uninfizierten J774A.1	77
7. Primäre Mausmakrophagen	79
8. <i>Listeria monocytogenes</i>	79
9. NMR-Messungen	81
9.1. ¹³ C-NMR: Probenvorbereitung	81
9.1.1. Rohextrakte	81
9.1.2. Aminosäuren	82
9.2. ¹³ C-NMR-Spektroskopie	82
9.2.1. Ermittlung der relativen ¹³ C-Anreicherung (% ¹³ C _{rel})	83
9.2.2. Berechnung der absoluten ¹³ C-Anreicherung.....	83
Schnittstelle zwischen ¹ H-NMR und GC/MS:	83
9.2.3. Quantitative positionelle % ¹³ C-Bestimmung über ¹³ C ¹³ C-Kopplung	85
9.3. Metabolomics- ¹ H-NMR	86
9.3.1. Probenvorbereitung – Zellaufschluss und Extraktion	86
9.3.2. Messung und Auswertung	86
10. Gaschromatographie/Massenspektrometrie	87
10.1. ¹³ C-Isotopologanalysen: Probenvorbereitung und Messung	87
10.1.1. Aminosäuren und PHB.....	87
10.1.2. Alginat	92
10.2. ¹³ C-Isotopologanalysen: Berechnung und Darstellung der Ergebnisse	94
10.3. Metabolomics	96
III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	99
1. Modellorganismus der extrazellulären Infektion – <i>in vitro</i>-Studien mit <i>Yersinia enterocolitica</i>	99
1.1. Der Glucose-Stoffwechsel – <i>in vitro</i> -Studien mit [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	100
1.1.1. ¹³ C-Einbauraten in proteinogene Aminosäuren	100
1.1.2. Isotopologmuster	102
1.2. CO ₂ -Fixierung in <i>Y. enterocolitica</i> - <i>in vitro</i> -Studien mit NaH ¹³ CO ₃	105

1.2.1.	^{13}C -Inkorporationsrate aus $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$	105
1.2.2.	Isotopologmuster	106
1.3.	Der Glutamin-Stoffwechsel – <i>in vitro</i> -Studien mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$	107
1.3.1.	^{13}C -Einbaurrate aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$	107
1.3.2.	Isotopologmuster	108
1.4.	Diskussion	110
1.4.1.	Verwertung von Glucose	110
1.4.2.	CO_2 -Fixierung in <i>Y. enterocolitica</i>	113
1.4.3.	Glutamin-Verstoffwechslung	116
1.4.4.	Zusammenfassung	118
2. Modelle der intrazellulären Infektion – Wachstum von <i>L. pneumophila</i> Paris		
<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> in <i>A. castellanii</i>		
119		
2.1.	Ergebnisse der <i>in vitro</i> -Studien von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i>	120
2.1.1.	Wachstumsphasenunanabhängige Studien.....	120
2.1.1.1.	^{13}C -Profile von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> kultiviert mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$	121
2.1.1.2.	^{13}C -Profile von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> kultiviert mit $[\text{1,2-}^{13}\text{C}_2]\text{Glucose}$	128
2.1.1.3.	^{13}C -Profile von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> kultiviert mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$	133
2.1.1.4.	^{13}C -Profile von <i>L. pneumophila</i> kultiviert mit $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{-Stärke}$	138
2.1.1.5.	^{13}C -Profile von <i>L. pneumophila</i> kultiviert mit $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{-Fettsäuren}$	139
2.1.1.6.	Diskussion	139
2.1.2.	Wachstumsphasenabhängige Studien.....	150
2.1.2.1.	^{13}C -Glucose und ^{13}C -Serin als Kohlenstoffquellen für <i>L. pneumophila</i>	151
2.1.2.2.	Wachstumsphasenabhängige Produktion von PHB	159
2.1.2.3.	Diskussion	162
2.2.	Ergebnisse der <i>in vivo</i> -Studien von <i>L. pneumophila</i> replizierend in <i>A. castellanii</i>	166
2.2.1.	^{13}C -Profile von <i>A. castellanii</i>	167
2.2.2.	^{13}C -Profile von intrazellulär replizierenden <i>L. pneumophila</i> in <i>A. castellanii</i>	171
2.2.3.	Diskussion	175

2.3.	Metabolomics-Studien.....	179
2.3.1.	Ergebnisse der ^1H -NMR-Analytik	180
2.3.2.	Ergebnisse der GC/MS-Analytik.....	183
2.3.3.	Diskussion	187
3.	Modulation des Kohlenstoffmetabolismus von primären und etablierten	
	Mausmakrophagen durch Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	189
3.1.	Ergebnisse	190
3.1.1.	Differentielle ^{13}C -Inkorporationsrate aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$	190
3.1.2.	^{13}C -Isotopologmuster von BMM und J774A.1 mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$	193
3.1.3.	Differentielle ^{13}C -Inkorporationsrate aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$	198
3.1.4.	^{13}C -Isotopologprofile von BMM und J774A.1 mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$	200
3.1.5.	^{13}C -Profile von cytosolischen <i>L. monocytogenes</i> kultiviert in BMM und J774A.1	203
3.2.	Diskussion	207
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	213
V.	SUMMARY	217
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	221
VII.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	239
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS	239
IX.	ANHANG	249
1.	<i>Yersinia enterocolitica</i>	249
1.1.	$[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ -Experimente.....	249
1.2.	$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ -Experimente	250
1.3.	$[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$ -Experimente.....	252
2.	<i>Legionella pneumophila</i> und <i>Legionella oakridgensis</i>.....	253
2.1.	Experimente mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$	253
2.2.	Experimente mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glucose}$	255
2.3.	Experimente mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$	257
2.4.	Experimente mit $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{-Stärke}$	259
2.5.	Experimente mit $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{-Fettsäuren}$	260

2.6.	Wachstumsabhängige Studien	260
2.7.	<i>In Vivo</i> Studien - <i>Legionella pneumophila</i> replizierend in <i>Acanthamoeba castellanii</i>	265
X.	DANKSAGUNG	267

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Celsius
µl	Mikroliter
3-HB	3-Hydroxybutyrat
ACN	Acetonitril
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym-A
Ala	Alanin
Asp	Aspartat
ATCC	American Type Culture Collection
AYE	ACES-buffered Yeast Extract (ACES-gepufferter Hefe-Extrakt)
CDM	chemisch definiertes Medium
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (Chelator)
FCS	fetales Kälberserum
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie Massenspektrometrie
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
Hz	Hertz
Ile	Isoleucin
in vitro	außerhalb eines lebendigen Organismus (lateinisch für "im Glas")
in vivo	im lebenden Organismus (lateinisch für "im lebendigen")
Leu	Leucin
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>
Lp	<i>Legionella pneumophila</i>
Lys	Lysin
M	Molar
M	molar
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
min	Minute
mL	Milliliter
MOI	Multiplicity of Infection
MSTFA	<i>N</i> -methyl- <i>N</i> -(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
MTBSTFA	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -(<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid
N	Normal
NMR	Nuclear magnetic resonance

OD	optische Dichte
p.a.	<i>pro analysi</i> (lateinisch für: "zur Analyse"), gemeint ist der hohe Reinheitsgrad
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat Carboxylase
PGA	3-Phosphoglycerat
pH	potentia Hydrogenii (lateinisch für "Kraft des Wasserstoffs")
PHB	Poly-3-Hydroxybutyrat
Phe	Phenylalanin
pYV	plasmid for <i>Yersinia</i> virulence
RP	Reversed Phase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RZ	Retentionszeit
Ser	Serin
T	Tesla
T3SS	Typ-III Sekretionssystem
TBDMS	Tertbutyldimethylsilyl
TCA	Zitronensäure
Thr	Threonin
TIC	Total-Ionenstrom
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
WT	Wildtyp
YOPS	<i>Yersinia</i> outer proteins

I. EINLEITUNG

“The world of the nuclear spins is a true paradise for theoretical and experimental physicists. It supplies, for example, most simple test systems for demonstrating the basic concepts of quantum mechanics and quantum statistics, and numerous textbook-like examples have emerged. On the other hand, the ease of handling nuclear spin systems predestinates them for testing novel experimental concepts. Indeed, the universal procedures of coherent spectroscopy have been developed predominantly within nuclear magnetic resonance (NMR) and have found widespread application in a variety of other fields” (Richard Ernst, Nobel Lecture; 1992).

1. Isotopolog-Profilung

Gerade in den letzten Jahrzehnten hat eine rasante Ausdehnung der NMR-Anwendung auf sehr viele verschiedene Bereiche stattgefunden. So wurden unter anderem mit der hochauflösenden Strukturaufklärung durch die NMR-Analytik in Kombination mit der hochsensitiven GC/MS-Analytik die Grundvoraussetzungen des *Isotopolog-Profilings* gelegt. In der Retrospektive können anhand dieser relativ neu entwickelten Methoden mithilfe von ^{13}C -Perturbationsstudien Stoffwechselforgänge und -flüsse in den verschiedensten Organismen aufgeklärt werden (Adam *et al.*, 2006; Eisenreich *et al.*, 2006; Eisenreich and Bacher, 2007; Zamboni and Sauer, 2009; Eisenreich *et al.*, 2010; Eylert *et al.*, 2010). Nach Zugabe von ^{13}C -markierten Vorstufen (wie z.B. Zucker, Aminosäuren oder Fettsäuren) zu *in vitro* oder *in vivo*-Experimenten werden die Metabolite von Interesse (z.B. Aminosäuren und Polyhydroxybutyrat (PHB)) extrahiert und auf ihre ^{13}C -Isotopologkomposition hin untersucht. Indem die markierten C-Quellen aufgenommen und verstoffwechselt werden, findet ein Eintrag von ^{13}C -Atomen in die Biomasse der betrachteten Organismen statt. Die entstehende Verteilung der Markierung in den Metaboliten ist hierbei nicht zufällig, sondern vorbestimmt durch die bei der Biosynthese eingegangenen (enzymatischen) Prozesse. Isotopologe sind dabei Moleküle einer gegebenen Verbindung, die sich in der Isotopenverteilung unterscheiden. Isotopomere hingegen sind Isotopologe mit der gleichen Anzahl an Isotopen (entweder $m+1$, oder $m+2$,... $m+n$; mit m = Molekülmasse und n = Anzahl der C-Atome im Molekül) (Eisenreich and Bacher, 2007). Somit gibt es $n+1$ -verschiedene

Spezies an Isotopomeren unter dem Überbegriff Isotopologe.

Durch die Isotopmuster der Endprodukte wird eine Rekonstruktion der Isotopkomposition in zentralen Intermediaten vorgenommen und so Position für Position eine retrobiosynthetische Analyse des Metabolit-Netzwerks durchgeführt.

1.1. Werkzeuge des Isotopolog-Profilings: NMR- und GC/MS-Analytik

Wie bereits erwähnt, basiert das Isotopolog-Profilings auf den Ergebnissen der NMR- und GC/MS-Analytik.

NMR-Analytik:

Die *NMR-Analytik* liefert hierzu exakte, strukturauflösende Informationen. Bei der ^{13}C -NMR Spektroskopie macht man sich dabei folgende Prinzipien zu Nutze: Zum Einen können nur magnetisch aktive Kerne im NMR detektiert werden, d.h. nur solche, die einen ungeraden Kernspin besitzen (wie z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N). So liefert lediglich das schwere ^{13}C - (Kernspin = $\frac{1}{2}$), nicht jedoch das leichte ^{12}C -Isotop (Kernspin = 0) ein Signal im Spektrum (Lottspeich, 2006). Die Fläche unter der Signalkurve bezeichnet man dabei als Intensität eines Resonanzsignals. Sie wird in Form einer Stufenkurve, dem Integral, gemessen (Friebolin, 2006). Über den Vergleich der Stufenhöhen in einem Spektrum kann man das Atom-Verhältnis (^1H bzw. ^{13}C) im Molekül und damit die relative Menge bestimmen. Die niedrigere Nachweisempfindlichkeit von ^{13}C -Atomen im Vergleich zu Protonen in der NMR-Spektroskopie (Friebolin; 2006) bedingt eine relativ große Probenmenge von mind. 200 mg lyophilisiertem Zellmaterial für die Messung von proteinogenen Aminosäuren. Somit ist das Einsatzgebiet der ^{13}C -NMR Spektroskopie im Rahmen dieser Arbeit auf *in vitro*-Experimente begrenzt. Da die Lage des Signals eines ^1H - oder ^{13}C -Atoms im Spektrum (ppm-Werte, chemische Verschiebung) abhängig von dessen chemischer Umgebung ist, können die Signale in einem NMR-Spektrum eindeutig den einzelnen Atomen in einem Molekülgerüst zugeordnet werden (Hesse *et al.*, 2005). Des Weiteren ist es dem natürlichen, sehr geringen Gehalt von ^{13}C (1,11%) zu verdanken, dass die Kernkombination ^{13}C - ^{13}C nur ca. 1/100 so wahrscheinlich ist wie ^{13}C - ^{12}C und nur in etwa 10^{-4} mal so wahrscheinlich wie das Ereignis ^{12}C - ^{12}C in einer natürlichen, unmarkierten Probe (Hesse *et al.*; 2005). Der ultimative Vorteil ist die Tatsache, dass spinleiche, benachbarte Atome im Spektrum miteinander koppeln (z.B. ^1H - ^1H , ^1H - ^{13}C , oder ^{13}C - ^{13}C) (Friebolin, 2006), so dass mithilfe charakteristischer

Kopplungskonstanten die genaue Position der künstlich angereicherten ^{13}C -Isotope im Metaboliten aus einem ^{13}C -NMR-Spektrum bestimmt und quantifiziert werden kann.

Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC/MS)-Analytik:

Die zweite Messmethode zur Bestimmung der ^{13}C -Anreicherung ist die *GC/MS-Analytik*. Dazu werden die Substanzen in einer Probe zunächst durch die Gaschromatographie anhand einer beschichteten 30 m (oder 60 m) langen Kapillarsäule aufgetrennt. Die Trennsäule wird dabei mit inerten Trägergasen, wie z.B. Helium durchströmt. In den Gasstrom wird über den beheizbaren Injektor das Stoffgemisch injiziert. Eine Auftrennung der Komponenten erfolgt durch charakteristische Retentionszeiten und Verdampfungstemperaturen. Um auch Substanzen mit stark polaren funktionellen Gruppen über die Säule auftrennen zu können, muss die Probe vorher derivatisiert werden, wodurch die Substanzen flüchtiger werden. Durch das Derivatisieren werden die Massen der Substanzen verändert, was wiederum bei der Auswertung berücksichtigt werden muss. Die Schnittstelle zwischen GC und MS ist das Interface. Ein erneutes Vermischen der Probe im Interface wird verhindert, indem dies möglichst kurz ist und zur Vermeidung partieller Kondensation beheizt wird (Hesse *et al.*, 2005). Nachdem die Substanzen das Interface verlassen haben, werden sie mittels Elektronenstoßionisation (EI) ionisiert, wodurch charakteristische Fragment-Ionen entstehen (Hesse *et al.*; 2005). Die Auftrennung der Fragment-Ionen erfolgt im Quadrupol-Massenanalysator mittels elektrischer Felder (Hesse *et al.*; 2005). Die m/z -Verhältnisse der Fragment-Ionen im MS werden am Detektor als Totalionenstrom gemessen. Der ^{13}C -Überschuss wird dann rechnerisch aus den Rohdaten der Peakintegration aus dem Chromatogramm anhand eines Vergleichs mit einem unmarkierten Standard ermittelt (Eylert, 2009). Diese Methode ist äußerst sensitiv, es reicht bereits eine Probenmenge von 10^7 Zellen (entspricht in etwa 1 mg Trockensubstanz). Mit dieser Methodik lässt sich auch bei *in vivo*-Studien sehr genau der absolute ^{13}C -Überschuss in verschiedenen Metaboliten errechnen und die Isotopomer-Zusammensetzung ermitteln. Schwieriger stellt sich die genaue positionelle Bestimmung der ^{13}C -Atome dar. Dies ist zum Teil über die unterschiedlichen Fragmente möglich, muss aber oft extrapoliert werden.

Vernetzung von GC/MS und NMR-Daten:

Im Idealfall werden die beiden Messtechniken zur Ermittlung der Isotopolog-Komposition der Metabolite kombiniert. Falls genügend Probenmaterial zur Verfügung steht, kann eine Analyse der polaren und unpolaren Metabolite und der proteinogenen Aminosäuren sowohl mittels NMR als auch mithilfe von GC/MS stattfinden. Beide Methoden liefern die gleiche ^{13}C -Anreicherung in den jeweiligen Metaboliten (in einer Probe), nur auf unterschiedlichen Wegen. Meist ist eine Bestimmung der absoluten ^{13}C -Anreicherung im NMR-Spektrum über die ^1H - ^{13}C -Satelliten nicht möglich, da oft Überlagerungen der Satelliten mit anderen Signalen im ^1H -NMR-Spektrum auftreten. Dieser Wert wird jedoch zur Quantifizierung der positionellen ^{13}C - ^{13}C -Kopplung benötigt. An dieser Stelle können die Massendaten in die Berechnung mit einfließen und so eine Quantifizierung (in mol%) ermöglichen. Zudem können die Massendaten im Falle einer Vollmarkierung durch das ganze Molekülgerüst diese eindeutig bestätigen, wohingegen in der NMR-Spektroskopie diese Aussage nur extrapoliert werden könnte. Die unterschiedlichen Ergebnisse werden so miteinander verknüpft und ergeben ein schlüssiges Gesamtbild über die Metabolite und deren ^{13}C -Markierungsmuster.

2. Rekonstruktion von Stoffwechselflüssen in der Retrospektive

Führt man einem System ^{13}C -markierte Vorstufen künstlich zu, so ist der Eintrag von ^{13}C -Atomen in die Biomasse und die entstehende Verteilung der Markierung in den Metaboliten in ^{13}C -Perturbationsstudien nicht zufällig, sondern vorbestimmt durch die zur Biosynthese nötigen (enzymatischen) Prozesse. Allein auf dieser Basis kann in der Retrospektive, ausgehend von bekannten Synthesewegen (siehe Kapitel I. 3.), über die Markierungsmuster der Metabolite die Masseverteilung der zentralen Intermediate rekonstruiert werden (Eisenreich *et al.*, 1993).

Aminosäuren stehen besonders im Fokus, da ihre Vorstufen direkte Intermediate aus dem zentralen primären C-Stoffwechsel sind (siehe Abbildung 1.1). Am aussagekräftigsten für katabole Wege sind dabei *Alanin*, *Aspartat* und *Glutamat*, da diese nur ein Transaminierungsschritt entfernt von ihrem jeweiligen korrespondierenden Vorläufer sind (Kapitel I.3.3. Abbildung 1.10; und Eisenreich *et al.*, 1993) und zu ihrer Synthese keine regulierte Kette an Reaktionen nötig ist. Somit ist der Einbau von ^{13}C aus Glucose und Glutamin in *Ala*, *Asp* und *Glu* direkt korreliert mit der Aufnahme- und Verstoffwechslungsrate der jeweiligen ^{13}C -Vorstufe.

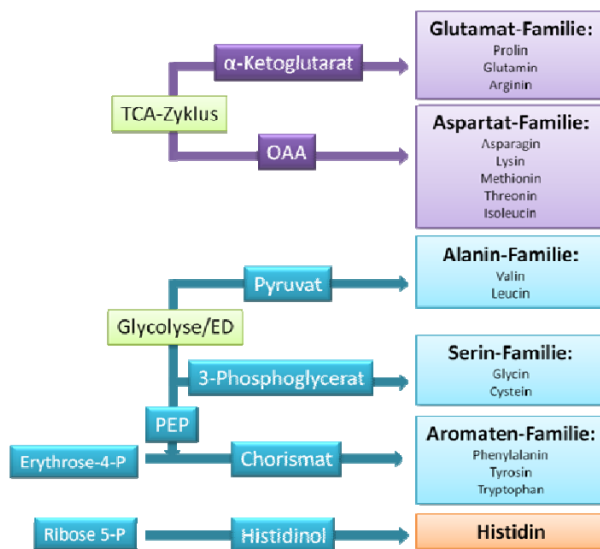


Abbildung 1.1: Vorstufen der Aminosäuren sind Intermediate aus dem zentralen Stoffwechsel. Die Pfeile deuten gängige Synthesewege an (vergleiche dazu Kapitel I. 3.).

Aber auch alle anderen Aminosäuren geben durch ihr Markierungsmuster Aufschluss über ihre Biosynthesewege und die entsprechenden Intermediate. So geben z.B. auch Arginin, Prolin und Lysin neben Glutamat Auskunft über 2-Oxoglutarat. Das Markierungsmuster von Pyruvat ist zusätzlich rekonstruierbar über die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren

(durch die Bildung über Chorismat; siehe Kapitel I. 3). Über OAA lassen sich des Weiteren Aussagen durch Threonin und Methionin treffen. Eine schematische Darstellung der Rekonstruktion der Isotopzusammensetzung in zentralen Intermediaten findet sich in Abbildung 1.2.

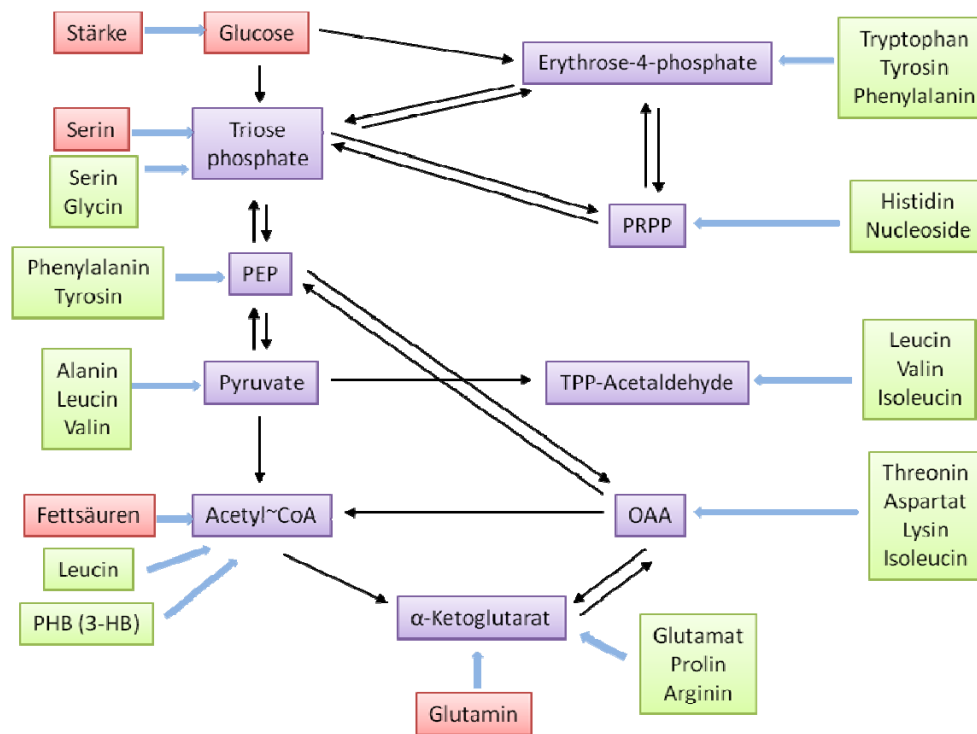


Abbildung 1.2: Rekonstruktion der ^{13}C -Markierungsmuster zentraler Stoffwechselintermediate (modifiziert nach Eisenreich *et al.*, 1993): in **grünen Kästchen**: Aminosäuren, anhand deren ^{13}C -Muster die entsprechenden Intermediate rekonstruiert werden können; in **lila Kästchen**: rekonstruierbare Intermediate; in **roten Boxen**: in vorliegender Arbeit verwendete ^{13}C -Vorstufen; **blaue Pfeile**: direkter Rekonstruktionsschritt.

Das kleine 1 x 1 der Isotopologie:

Damit das Stoffwechselnetzwerk eines Organismus anhand ^{13}C -Isotopologmuster rekonstruiert werden kann, vergleicht man die verschiedenen zentralen Stoffwechselwege miteinander. Da in diesen unterschiedlichen Vorgängen jeweils andere Enzyme und Reaktionen zum Abbau der C-Quellen zum Einsatz kommen, sind die resultierenden ^{13}C -Markierungen in den Metaboliten durchaus unterschiedlich

Anhand bekannter Biosynthesen lassen sich gewisse Grundregeln für das Auftreten von ^{13}C -Isotopomere je nach eingesetzter ^{13}C -Vorstufe ableiten. Diese finden sich in den folgenden beiden Tabellen (für $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ Tabelle 1.1, für die $[1,2\text{-}^{13}\text{C}_2]\text{Glucose}$ Tabelle 1.2).

Tabelle 1.1: Isotopologie für $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ (modifiziert nach Eisenreich *et al.*, 1993).
Abkürzungen: P5-P: Pentose-5-Phosphat; E4-P: Erythrose-4-Phosphat; TK: Transketolase; TA: Transaldolase; F6-P: Fructose-6-Phosphat; α -KG: α -Ketoglutarat.

Intermediat	entsprechendes Muster in AS	Glycolyse //ED// PPP
M+3 (111) in Pyruvat oder PEP	Ala, Val oder Phe, Tyr, Ser	Glycolyse, ED oder PPP
M+2 (011) in PEP	Ala, Ser, Val, Phe oder Tyr	Anteil an Triosen, gebildet über Transketolase in PPP
M+5 in P5-P	His	Anteil durch PPP aus G6-P
M+2 / M+3 in P5-P	His	Anteil durch die TK-Rkt in PPP
M+4 in P5-P	His	Anteil aus E4-P und C ₁ -Einheit (TK und TA Rkt)
M+4 in E4-P	Phe, Tyr	direkte Bildung aus F6-P
M+3 / M+2 in E4-P	Phe, Tyr	Kombination von TK und TA aus P5-P
TCA und anaplerotische Rkts		
Vergleich α -KG mit OAA mit M+2:	α -KG: Glu, Pro, Arg OAA: Asp, Thr, Ile, Lys	1. TCA vorwärts (si-spezifisch) 2. TCA rückwärts (re-spezifisch)
1. α -KG (00011) und OAA (11000)		Randomisierung beachten (Symmetrie von Suc und Fum)
2. α -KG (11000) und OAA (00011)		
Asymetrie in M+2 bei OAA	Asp, Thr, Ile, Lys	Glyoxylat-shunt
M+4 / M+3 in α -KG	Glu, Pro, Arg	TCA-Recycling (si-spezifisch)
M+3 / M+1 in OAA	Asp, Thr, Ile, Lys	TCA-Recycling (si-spezifisch)
M+3 in OAA	Asp, Thr, Ile, Lys	aus PEP oder Pyruvat durch Carboxylierung
Gluconeogenese		
M+2 in PEP	Ser, Phe, Tyr	PEP-Carboxykinaseaktivität (PEP aus OAA)
M+2 in Pyruvat	Ala, Val	„malic enzyme“-Aktivität; PEP zu Pyruvat, aber nicht umgekehrt
C₁-Metabolismus		
Vergleich PEP mit Ser	Ser (typisch M+2), Gly	Anteil Ser über Gly + C ₁

Tabelle 1.2: Isotopologie für [1,2-¹³C₂]Glucose (modifiziert nach Eisenreich *et al.*, 1993).

Intermediat	entsprechendes Muster in AS	<i>Glycolyse / ED / PPP</i>
M+2 in PEP und Pyruvat	PEP: Ser Pyruvat: Ala	Glycolyse
unmarkiertes PEP	Ser	ED und PPP
M+2 in Pyruvat	Ala	ED
unmarkiertes PEP und Pyruvat	Ser, Phe, Tyr und Ala	PPP

3. Zentrale Stoffwechselwege

Unter dem Begriff *Stoffwechsel* werden all jene Vorgänge, bei denen lebende Systeme freie Enthalpie benötigen und verbrauchen, um ihre diversen Funktionen ausüben zu können, zusammengefasst. Dabei unterscheidet man zwischen *Katabolismus*, dem Abbau von Nahrungs- oder Zellbestandteilen in deren Grundbausteine und der dabei resultierenden Freien Enthalpie sowie dem *Anabolismus*, der Biosynthese von Biomolekülen aus einfachen Bausteinen unter Energieverbrauch (Voet *et al.*, 2010).

3.1. Kohlenhydratstoffwechsel

Kohlenhydrate kommen in der Natur sehr viel häufiger vor als jede andere Klasse von Biomolekülen und verdienen somit besondere Aufmerksamkeit was Stoffwechselnetzwerke betrifft. Schätzungen zufolge besteht mehr als die Hälfte des Trockengewichts der Biomasse auf der gesamten Erde – einschließlich aller lebenden Organismen – aus Polymeren der Glucose (McMurphy and Begley, 2005), womit sich letztere als hervorragende ^{13}C -Quelle für *Isotopolog-Profiling* erweist.

3.1.1. Abbau von Glucose

Glucose stellt eine der wichtigsten kurzfristig verfügbaren Energiequellen dar und ist für viele Mikroorganismen die bevorzugte Kohlenstoffquelle (White, 1995). Bei vielen Bakterien ist die Aufnahme und Aktivierung von Glucose synchronisiert durch PEP:Glucose-Phosphotransferase-Systeme (Muñoz-Elias and McKinney, 2006). Andere wiederum haben zahlreiche spezifische Glucosetransportsysteme. Es können in Bakterien drei Hauptabbauwege von Glucose unterschieden werden: die Glykolyse, der Entner-Doudoroff- und der Pentosephosphatweg. Eine schematische Übersicht aller drei Abbauwege ist in Abbildung 1.3 zu finden.

Glykolyse:

Sowohl Eu- als auch viele Prokaryoten verwenden die Glykolyse zum Abbau von Glucose zu zwei Molekülen Pyruvat unter Freisetzung von zwei ATP. Die Glykolyse, auch *Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg* genannt, ist eine Folge von zehn enzymatisch katalysierten Reaktionen, die Glucose in zwei äquivalente Pyruvat spaltet. Die Glykolyse lässt sich

grundsätzlich in drei Stufen einteilen. Zunächst wird Glucose zu Fructose-1,6-bisphosphat phosphoryliert und isomerisiert. In der zweiten Stufe erfolgt die Spaltung in zwei C₃-Fragmente, Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Dihydroxyacetonphosphat, welche leicht ineinander umwandelbar sind. Zuletzt wird ATP gewonnen durch Oxidation der C₃-Fragmente zu Pyruvat (McMurry and Begley, 2005).

Pentosephosphat-Weg (PPP):

Weitverbreitet unter Pro- und Eukaryoten ist auch der Abbau über den Pentosephosphat-Weg. Dieser siebenstufige Prozess ermöglicht den Metabolismus von C₅-Zuckern, sorgt für die Bereitstellung des reduzierenden Coenzym NADPH, stellt das für die Ribonukleotid-Biosynthese benötigte Ribose-5-Phosphat zur Verfügung und synthetisiert Erythrose-4-P, das Mikroorganismen und Protisten zum Aufbau aromatischer Aminosäuren brauchen (McMurry and Begley, 2005). Der PPP ist im wesentlichen in drei Abschnitte eingeteilt: einen einleitenden oxidativen Teil, in dem NADPH und Ribulose-5-P produziert wird, gefolgt von zwei nichtoxidativen Stufen, in denen zunächst die Isomerisierung und Epimerisierung von Ribulose-5-P und abschließend Reaktionen zur Knüpfung und Spaltung von C-C-Bindungen stattfinden. Insgesamt werden auf diesem Weg drei Moleküle Glucose-6-P in drei Moleküle CO₂, zwei Moleküle Fructose-6-P und ein Molekül Glycerinaldehyd-3-P umgewandelt, wobei zusätzlich sechs Moleküle NADPH entstehen.

Entner-Doudoroff-Weg (ED):

Alternativ gibt es bei vielen Bakterien den Entner-Doudoroff-Weg (Entner and Doudoroff, 1952) zur Verstoffwechslung von Glucose, der in Säugern nicht vorkommt (Muñoz-Elías and McKinney, 2006). Im ED erfolgt ebenfalls ein Abbau von Glucose zu Pyruvat unter Freisetzung von ATP, jedoch unter Verwendung anderer Enzyme. Das Besondere an dieser Glucoseumsetzung ist die Spaltung von 6-Phosphogluconat zu Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (Entner and Doudoroff, 1952; Conway, 1992).

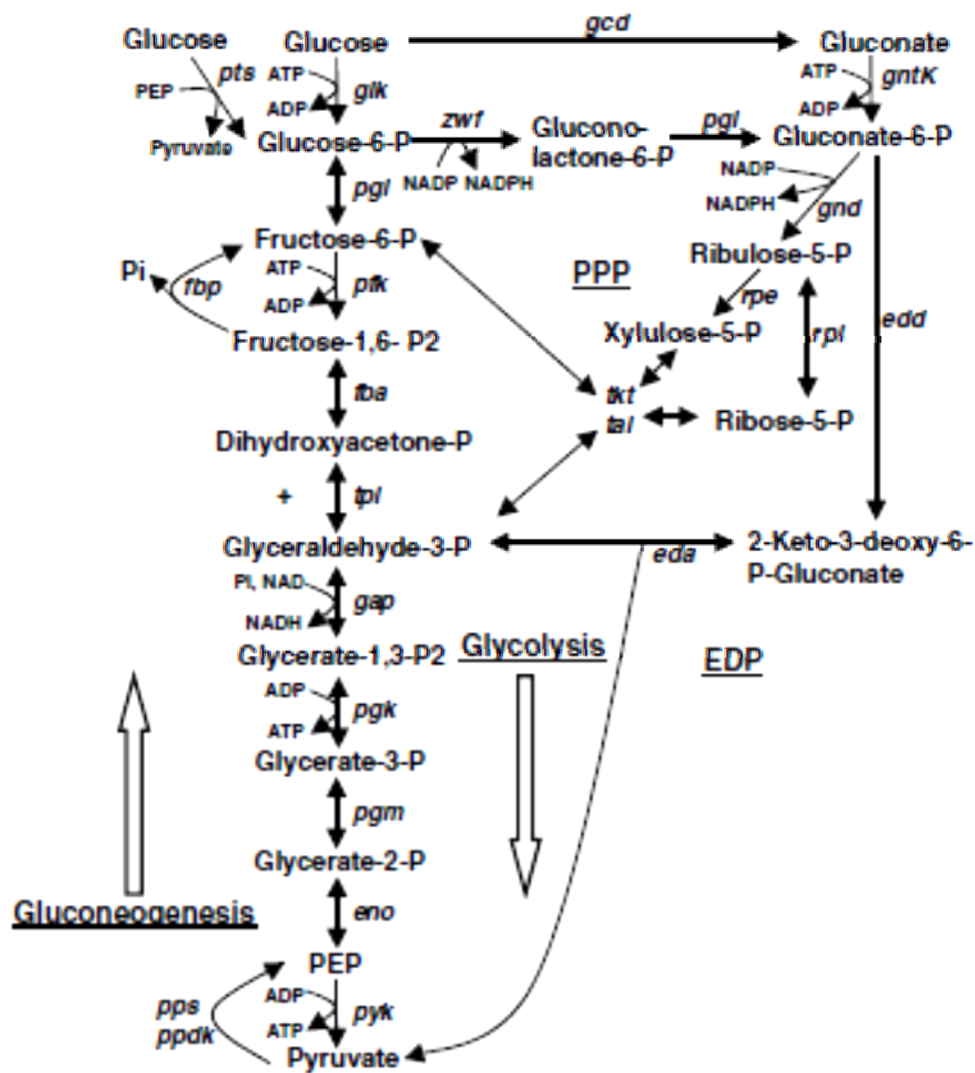
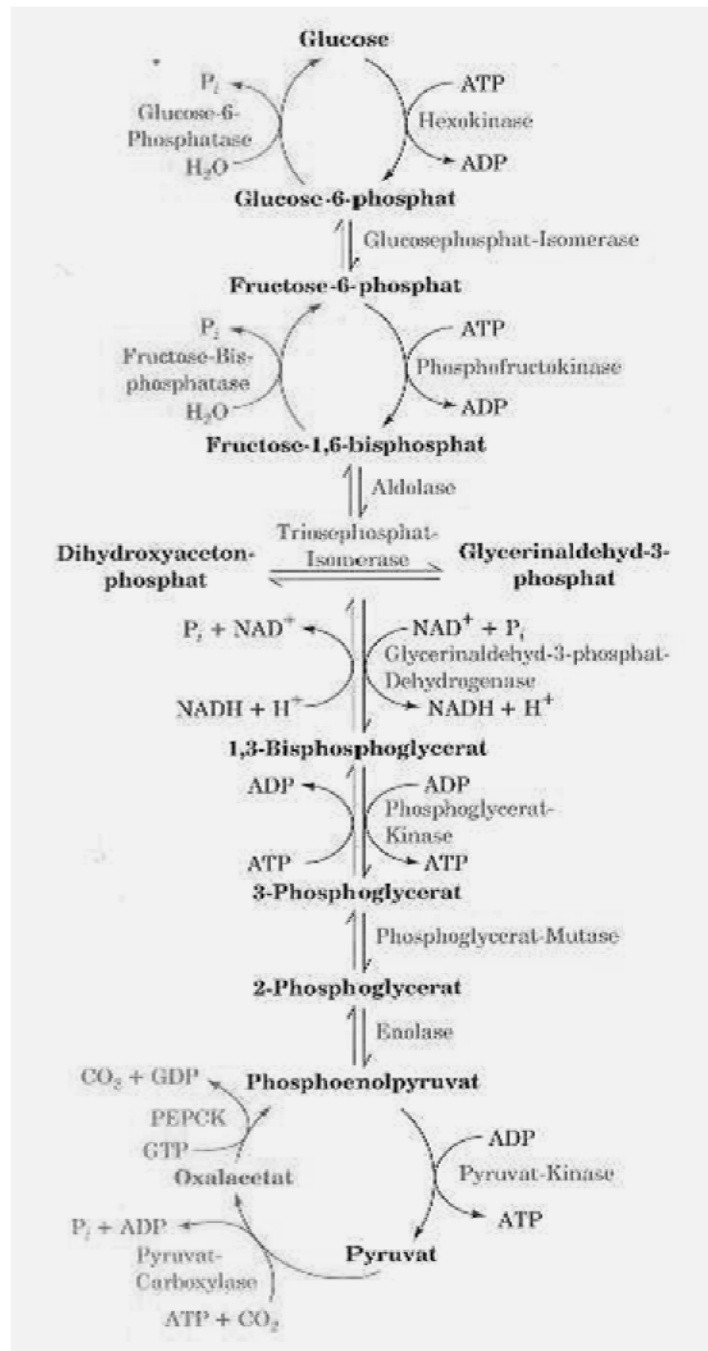


Abbildung 1.3: Hauptwege des Kohlenhydratstoffwechsels in Bakterien (aus Muñoz-Elías and McKinney, 2006). Schlüssel: Enzyme für Glycolyse und Gluconeogenese sind mit Doppelpfeilen angegeben; *pts*: PEP:glucose phosphotransferase system; *pfk*: phosphofruktokinase; *glk*: glucose kinase; *pgi*: phosphoglucose isomerase; *fbp*: fructose-1,6-bisphosphatase; *fba*: fructose-1,6-bisphosphatase aldolase; *tpi*: triosephosphate isomerase; *gap*: glyceraldehyde-3-phosphat dehydrogenase; *pgk*: phosphoglycerate kinase; *pgm*: phosphoglyceratemutase; *eno*: enolase; *pyk*: pyruvate kinase; *pps*: PEP synthase; *ppdk*: pyruvate phosphate dikinase; *gcd*: glucose dehydrogenase; *gntK*: gluconate kinase; *zwf*: glucose-6-P-dehydrogenase; *pqi*: 6-P-gluconolactonase; *edd*: 6-phosphogluconate dehydrogenase; *eda*: 2-keto-3-deoxy-6-phosphogluconate aldolase; *gnd*: 6-phosphogluconate dehydrogenase; *rpe*: ribulose-5-P-epimerase; *tkt*: transketolase; *tal*: transaldolase; *rpi*: ribose-5-P-isomerase.

3.1.2. Gluconeogenese

Wie bereits erwähnt sind mehrere Intermediate des Glucoseabbaus Vorstufen für diverse Biosynthesewege. Falls keine exogenen Zucker (im Medium) zugänglich sind, werden diese Intermediate sowie auch Glucose durch Gluconeogenese gebildet (Anderson and Wood, 1969). Dieser elfstufige Biosyntheseweg ist zwar mit der Glycolyse verwandt, stellt aber nicht deren genaue Umkehr dar (McMurry and Begley, 2005). Die Unterschiede sind in Abbildung 1.4 ersichtlich.

Abbildung 1.4: Glykolyse und Gluconeogenese im Vergleich (aus Voet *et al.*, 2010, S. 599). Rote Pfeile stellen die Schritte dar, die jeweils von verschiedenen Enzymen in beiden Stoffwechselwegen katalysiert werden; die anderen 7 Reaktionsschritte der Gluconeogenese werden von Enzymen der Glykolyse in gleichgewichtsnahen Reaktionen katalysiert.



3.2. Citratzyklus (TCA-Zyklus) und anaplerotische Reaktionen

Citratzyklus:

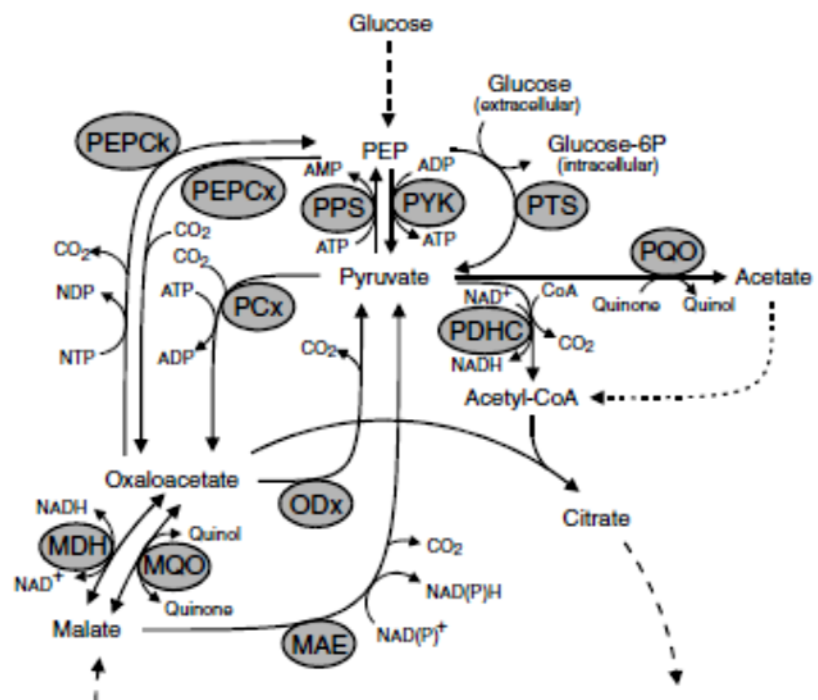
Auf den ersten Blick betrachtet, folgt der Citratzyklus direkt auf die oben genannten Hauptwege des Kohlenhydratstoffwechsels, da deren Endprodukt Pyruvat über

Läuft der TCA-Zyklus im normalen Betrieb ab, dann wird Acetyl-CoA (C_2 -Körper) auf Oxalacetat (OAA) durch eine Kondensationsreaktion übertragen. Die zwei eingeschleusten C-Atome verlassen den Zyklus wieder durch Oxidation. Einige Intermediate – wie OAA, Citrat oder α -Ketoglutarat - werden aber für Biosynthesewege benötigt und fließen aus dem TCA-Zyklus stetig ab, weswegen es anaplerotischer (griech.: *ana*, auf; *plerotikos*, füllend) Reaktionen bedarf (Muñoz-Elías and McKinney, 2006).

Anaplerotische Reaktionen:

Abhängig von den jeweils zur Verfügung stehenden Substraten bzw. den vorhandenen Enzymen in einem Organismus, können unterschiedliche anaplerotische Wege eingeleitet werden. So ist z.B. der Glyoxylat-Zyklus, bei dem durch die Isocitrat-Lyase und Malat-Synthase ein Molekül Malat aus zwei Molekülen Acetyl-CoA entsteht, ein weitverbreiteter Weg bei pathogenen Bakterien (Muñoz-Elías and McKinney, 2006). Dies gilt jedoch nicht für *L. monocytogenes* (Glaser *et al.*, 2001) und *L. pneumophila* (Chien *et al.*, 2004). Ein anderer wichtiger Knotenpunkt liegt bei PEP-Pyruvat-Oxalacetat (siehe Abbildung 1.6). So kann z.B. Phosphoenolpyruvat (PEP) bei *Yersinia enterocolitica*, oder Pyruvat bei *L. pneumophila* und *L. monocytogenes* direkt zu OAA carboxyliert werden (Sauer and Eikmanns, 2005).

Abbildung 1.6: Schematische Darstellung des PEP-pyruvat-OAA-Knotenpunkts (aus Sauer und Eikmanns, 2005).
Schlüssel: MAE: malic enzyme; MDH: malat dehydrogenase; MQO: malate:quinon oxidoreductase; ODx: oxaloacetat decarboxylase; PCx: pyruvat carboxylase; PDHC: pyruvat dehydrogenase complex; PEPCK: PEP carboxykinase; PEPCx: PEP carboxylase; PPS: PEP synthase; PQO: pyruvat: quinon oxidoreductase; PTS: Phosphotransferase system; PYK: pyruvat kinase.

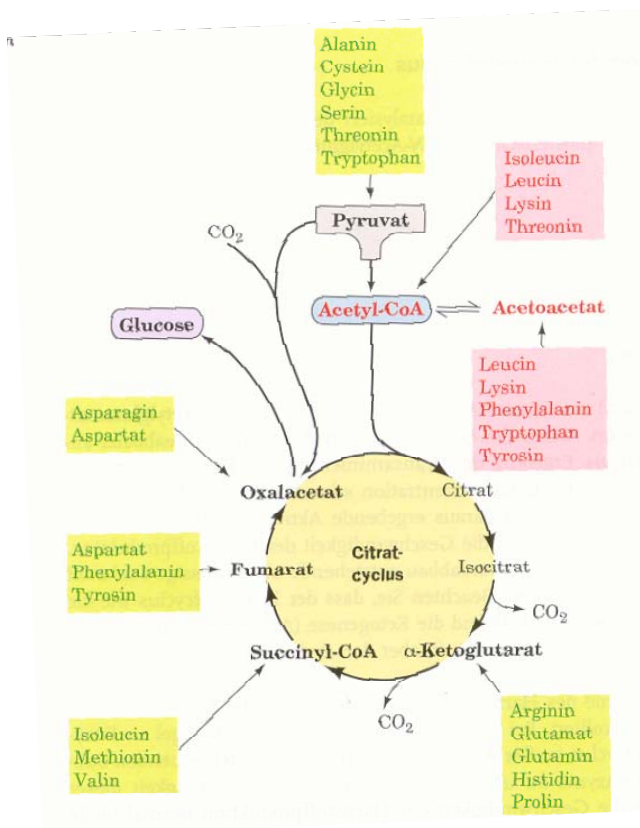


3.3. Aminosäuremetabolismus

Die Biochemie der Aminosäuren ist um ein vielfaches komplexer als die der Kohlenhydrate, da jede der 21 proteinogenen α -Aminosäuren (AS) in biologischen Systemen auf unterschiedlichen Wegen auf- und abgebaut wird.

Der Aminosäureabbau:

Aminosäuren werden zunächst zu Zwischenprodukten abgebaut, die dann weiter zu CO_2 und H_2O metabolisiert oder in der Gluconeogenese verwendet werden können. Die in dieser Arbeit betrachteten AS (die sogenannten 21 „Standard“-AS) werden zu Pyruvat, α -Ketoglutarat, Succinyl-CoA, Fumarat, OAA, Acetyl-CoA oder Acetoacetat (siehe Abbildung 1.7) abgebaut. Die AS lassen sich dabei, je nach Abbauweg, in zwei

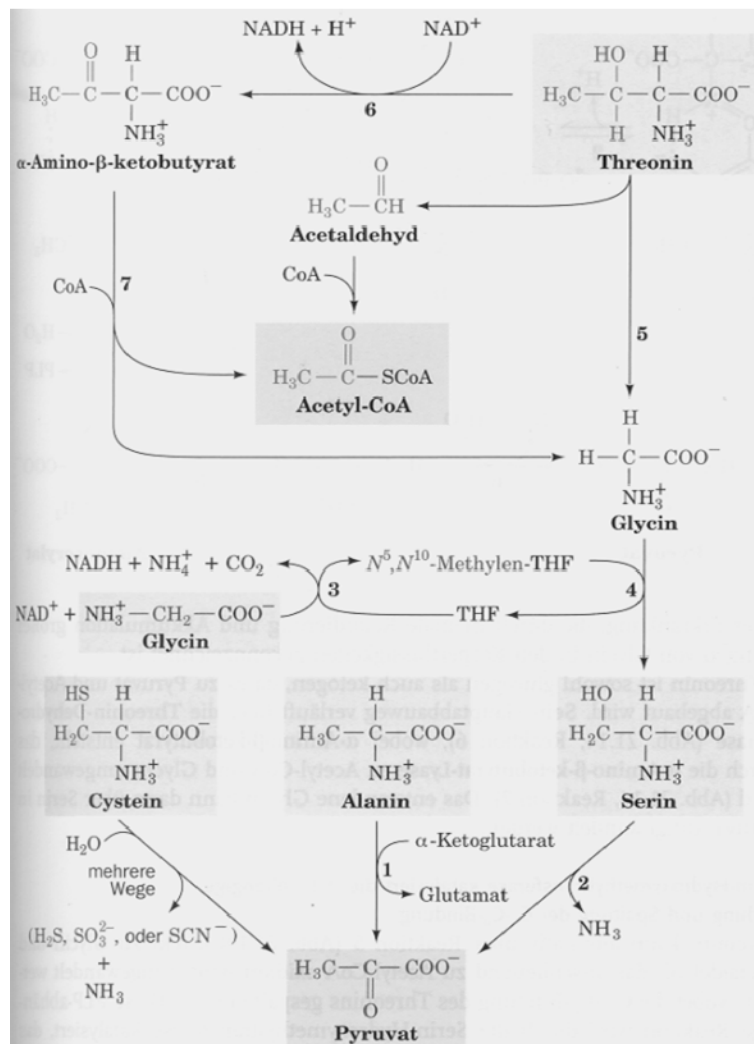


unterschiedliche Gruppen einordnen. Die *glucogenen AS* werden dabei zu Pyruvat, α -Ketoglutarat, Succinyl-CoA, Fumarat oder OAA abgebaut und sind demzufolge Glucosevorstufen. Die *ketogenen AS* werden dagegen zu Acetyl-CoA oder Acetoacetat abgebaut und können zu Fettsäuren oder Ketonkörpern umgewandelt werden (Voet *et al.*, 2010; S. 808).

Abbildung 1.7: Abbau von AS zu einem von sieben allgemeinen Stoffwechselintermediaten (aus Voet *et al.*, 2010; p. 808). Glucogene Abbauwege sind in grün, ketogene in rot gekennzeichnet.

Der Abbau von Alanin, Cystein, Glycin, Threonin und im speziellen von Serin ist in Abbildung 1.8 zu sehen. Alanin wird direkt durch Transaminierung in Pyruvat umgewandelt, Serin erst nach einem vorausgehenden Dehydratationsschritt durch die Serin-Dehydratase (Voet *et al.*, 2010, p. 809).

Abbildung 1.8: Umwandlung von Alanin, Cystein, Glycin, Threonin und Serin in Pyruvat (Voet *et al.*, 2010; p. 809). Enzyme: (1): Alanin-Aminotransferase; (2): Serin-Dehydratase; (3): Glycin-Spaltsystem; (4 und 5): Serin-Hydroxymethyltransferase; (6): Threonin-Dehydrogenase; (7): α -Amino- β -ketobutyrat-Lyase.



Glutaminolyse:

Die Reaktion von Glutamin zu Glutamat und umgekehrt ist ein zentraler Kontrollpunkt im Stickstoff-Metabolismus. Glutamin ist der Aminogruppendonor bei der Bildung vieler biosynthetischer Produkte und zugleich die Speicherform des Ammoniaks (Voet *et al.*, 2010; S.826). Diese AS wird durch die Glutaminase zu Glutamat hydrolysiert, welches wiederum durch oxidative Desaminierung mit dem Enzym Glutamat-Dehydrogenase in α -Ketoglutarat umgewandelt wird (siehe Abbildung 1.9).

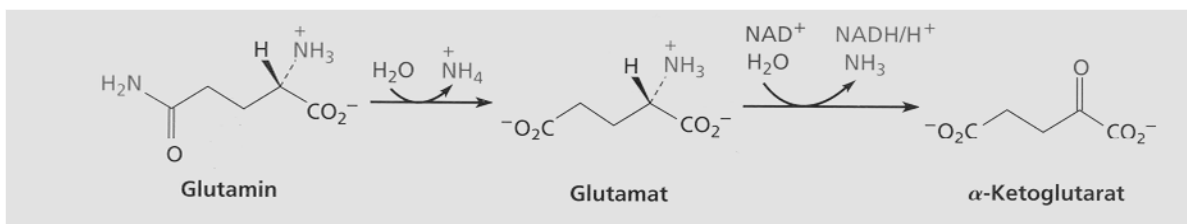


Abbildung 1.9: Glutaminolyse (aus McMurry and Begely, 2005, p.236).

Die Aminosäurebiosynthese:

Unter den 21 proteinogenen Aminosäuren kann zwischen *essentiellen* (nicht vom Organismus selbst synthetisierbar) und *nicht essentiellen* (und somit selber produzierbaren) AS unterschieden werden (VanSlyke, 1949). Diese Einteilung ist allerdings nicht immer eindeutig, von Organismus zu Organismus unterschiedlich (McMurry and Begely, 2005) und besonders bei Bakterien, Protisten und Säugern sehr verschieden. Eine Übersicht über die Quellen in einem typischen hetero- und prototrophen Bakterium, aus denen die Intermediate zur Aminosäuresynthese bezogen werden, ist in Abbildung 1.10. (hervorgehoben durch grüne Pfeile und blaue Boxen) zu sehen.

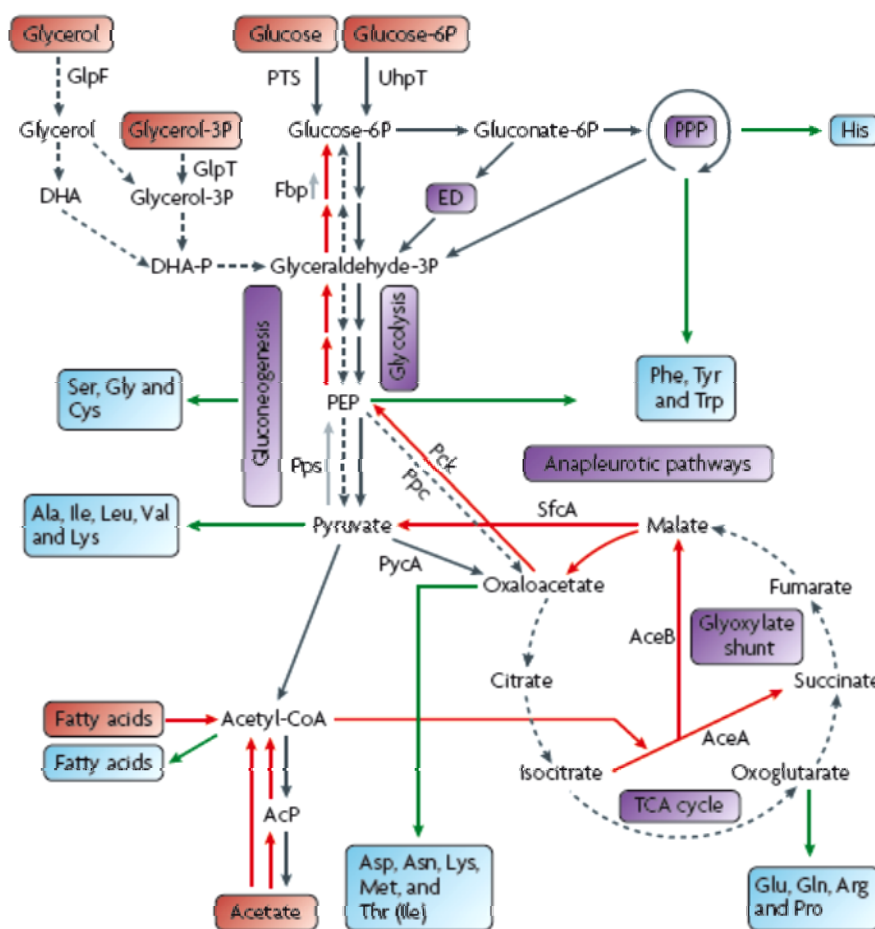


Abbildung 1.10: Metabolismus von typischen hetero- und prototrophen Bakterien (aus Eisenreich *et al.*, 2010). Schlüssel: **Boxen:** blau: Anabolische Monomere; lila: Zentrale Stoffwechselwege; rot: Hauptkohlenstoffquellen; **Pfeile:** grün: Quelle für anabolische Monomere; rot: Acetat-Flux; **Enzyme:** *AceA*: isocitratlyase; *AceB*: malate synthase; *SfcA*: malate dehydrogenase; *PcK*: PEP carboxykinase; *Pps*: PEP synthase; *Fbp*: fructose-1,6-bisphosphatase; *AcP*: acetyl phosphate; *DHA*: dihydroxyacetone; *PTS*: PEP-dependent phosphotransferase system; *UhpT*: glucose-6P permease.

Alanin, Aspartat und Glutamat:

Genauer betrachtet sind die Intermediate Pyruvat, OAA und α -Ketoglutarat die α -Ketosäuren (die sog. Kohlenstoffgerüste), die jeweils Alanin, Aspartat und Glutamat entsprechen. Ihre Synthese besteht aus einer einstufigen Transaminierungsreaktion (Abbildung 1.11).

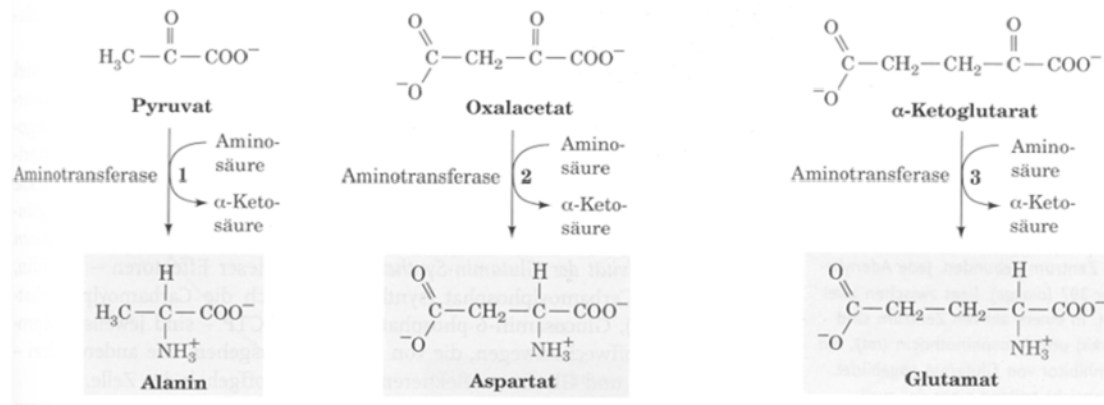


Abbildung 1.11: Synthese von Alanin, Aspartat und Glutamat (Voet *et al.*, 2010).

Serin und Glycin:

Serin entsteht aus dem Intermediat 3-PGA. Die Bildung von Serin beginnt mit der Oxidation der OH-Gruppe des 3-PGAs zu einem Keton mit anschließender PLP-abhängiger Transaminierung zu 3-Phosphoserin. Durch die Hydrolyse der Phosphatgruppe entsteht Serin (siehe Abbildung 1.12; McMurry and Begely, 2005).

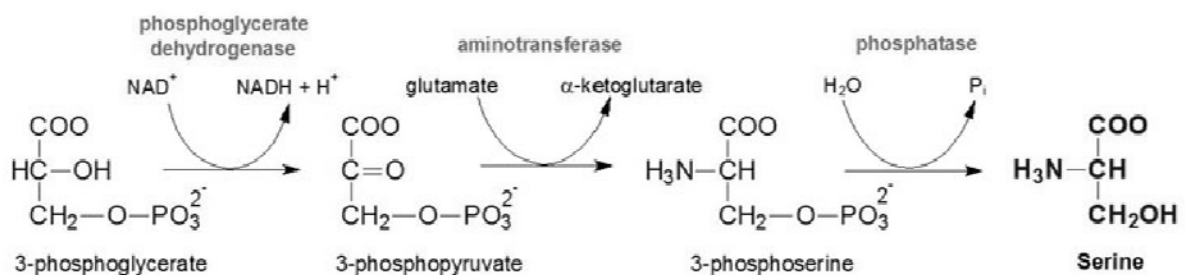


Abbildung 1.12: Serinbiosynthese aus 3-PGA (aus: medicalbiochemistry.org (Zugriffsdatum: 30.3.12)).

Die Biosynthese von Glycin kann zum einen aus Serin, durch die Serin-Hydroxymethyl-Transferase katalysierte Übertragung von CH_2O auf Tetrahydrofolat (THF), geschehen. Zum anderen kann Glycin auch mit einem CO_2 -fixierenden Schritt über THF anhand der

Glycinsynthese entstehen, oder über Transaminierung von Glyoxylat (OHCCO_2^-) (McMurry and Begeley, 2005). Das Reaktionsschema ist in Abbildung 1.13 abgebildet.

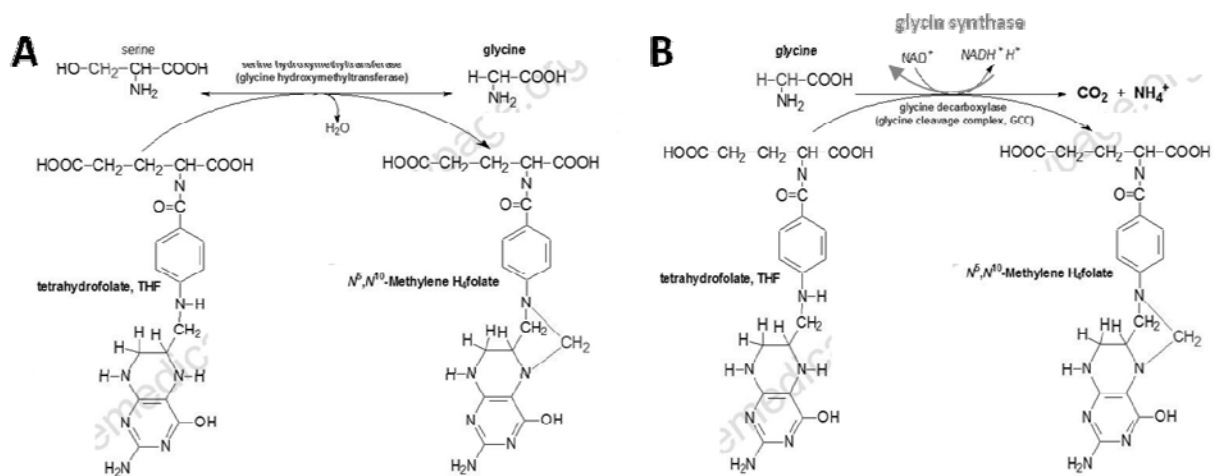


Abbildung 1.13: Glycinsynthese aus **A:** Serin und **B:** CO_2 -Fixierung über Glycinsynthase (modifiziert nach: medicalbiochemistry.org (Zugriffsdatum: 30.3.12) und Voet *et al.*, 2010).

Der Shikimat-Weg – die Synthese von aromatischen Aminosäuren:

Die Synthese von aromatischen AS ist nicht jedem Organismus möglich und findet sich hauptsächlich im Pflanzenreich, jedoch auch in einigen Bakterien, wie z.B. *E. coli*, bei Hefen, wie z.B. *Saccharomyces* und bei Protisten wie z.B. *Euglena* (Bentley and Haslam; 1990; Herrmann and Weaver; 1999) oder *Acanthamoeba* (Eylert, 2009).

Die Vorstufen der aromatischen AS sind Phosphoenolpyruvat (PEP) und Erythrose-4-Phosphat (ein Intermediat des PPP; siehe Kapitel I.3.1.1.) Ihre Kondensation liefert *2-Keto-3-desoxy-D-arabinoheptulosanat-7-phosphat*, welches cyclisiert und zu Chorismat umgewandelt wird. Letzteres wird entweder zu *Anthranilat* und dann zu Tryptophan oder zu *Prephenat* und weiter zu Tyrosin und Phenylalanin umgewandelt (Voet *et al.*, 2010). Eine Skizze des Reaktionsschemas ist in Abbildung 1.14. dargestellt.

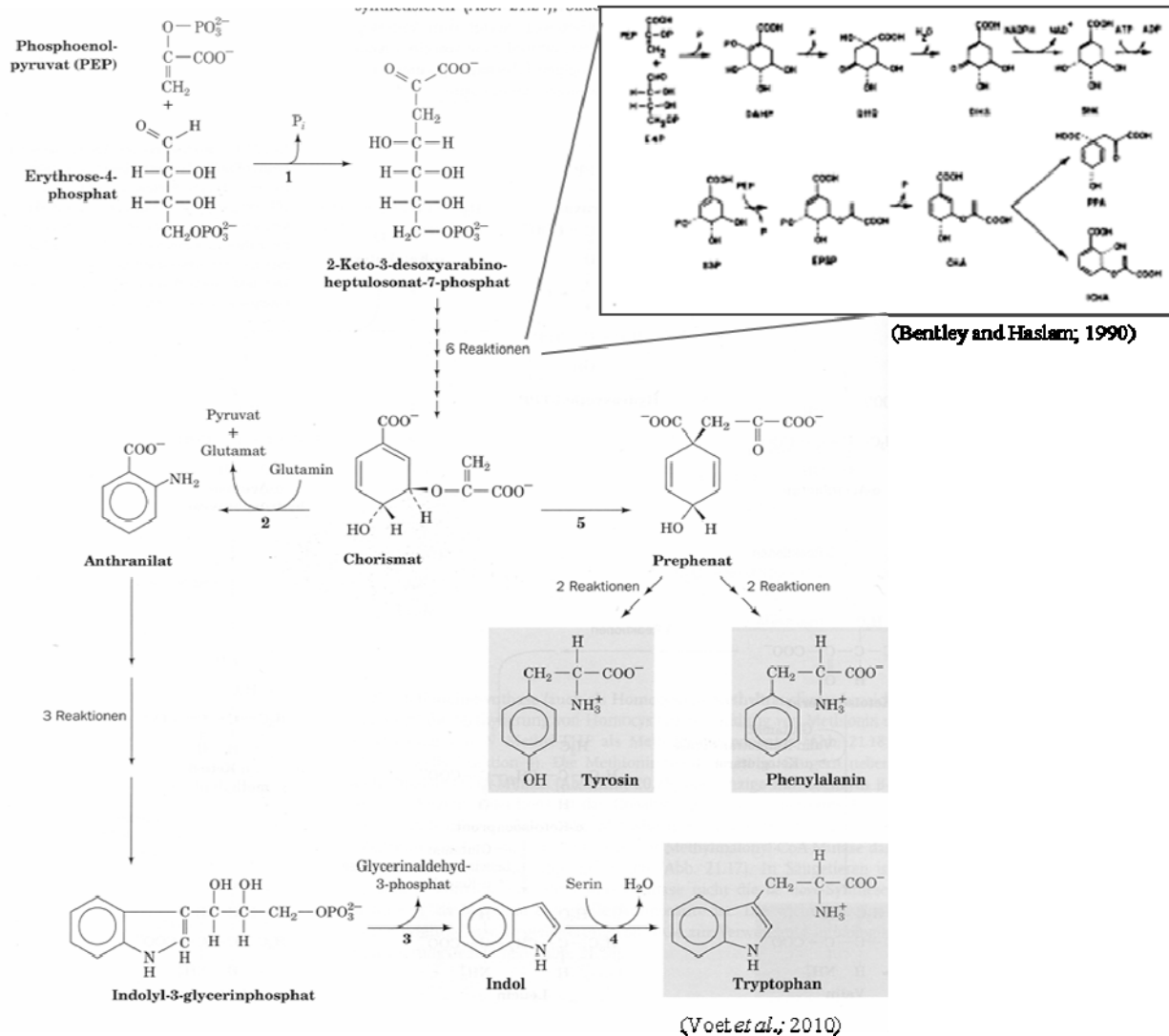


Abbildung 1.14: Der Shikimat-Weg (modifiziert nach Voet *et al.*, 2010 und Bentley and Haslam, 1990).

3.4. Fettsäurestoffwechsel

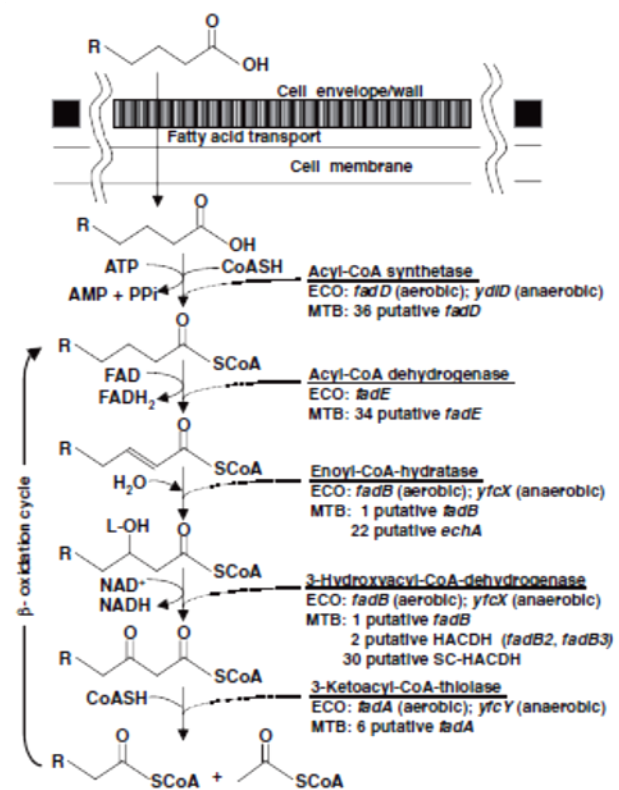
Der dominante Weg zur oxidativen Degradation von Fettsäuren, sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryoten ist der β -Oxidations-Zyklus (Kunau *et al.*, 1995; Muñoz-Elías and McKinney, 2006) - er findet lediglich in unterschiedlichen Kompartimenten statt (siehe Tabelle 1.3). Selbst langkettige Fettsäuren können anhand mehrmaligen „Durchlaufens“ der β -Oxidation zu Acetyl-CoA und Propionyl-CoA abgebaut werden, wobei letztere wiederum in den TCA-Zyklus eingeschleust werden können (Muñoz-Elías and McKinney, 2006).

Tabelle 1.3: Auftreten der β -Oxidation von Fettsäuren (nach Kunau *et al.*, 1995).

Organismus	Mitochondrien	Microbodies	Cytosol
(Säuge-)Tiere	+	+	-
Pflanzen	-	+	-
Pilze	-	+	-
Bakterien	-	-	+

Der Abbau von *Fettsäure-Acyl-CoA* verläuft über vier Stufen. Zunächst wird eine *trans- α,β* -Doppelbindung (DB) über die Dehydrierung durch das Flavoenzym Acyl-CoA-Dehydrogenase eingeführt. Nach einer Hydratisierung der DB durch die Enoyl-CoA-Hydratase wird das dabei entstandene β -Hydroxyacyl-CoA durch die 3-L-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase NAD^+ -abhängig zum entsprechenden β -Ketoacyl-CoA dehydriert. Abschließend findet eine Thiolyse durch die Ketoacyl-CoA-Thiolase statt, wobei Acetyl-CoA und ein, um zwei C-Atome kürzeres, neues Acyl-CoA entsteht. Eine Darstellung der Reaktion ist in Abbildung 1.15 zu finden.

Abbildung 1.15: Schematische Darstellung der β -Oxidation (aus Muñoz-Elías and McKinney, 2006).



3.5. CO_2 -Fixierung und Freisetzung

Die Freisetzung von CO_2 erfolgt hauptsächlich durch die Oxidation von Acetyl-CoA aus Zuckern oder Fettsäuren über den TCA-Zyklus (Kapitel I 3.2.). In Eukaryoten ist der Citratzyklus der Hauptweg zur Acetyl-CoA-Oxidation. Bei Prokaryoten spielt dieser meist eine untergeordnete Rolle und ist oft auch nicht geschlossen, d.h. es fehlen häufig ein oder

mehrere Enzyme wie z.B. die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase wie es beispielsweise bei *L. monocytogenes* der Fall ist (Eisenreich *et al.*, 2006).

Die Fixierung von anorganischem CO_2 in organischer Materie (Autotrophie) ist die Voraussetzung für das Leben im biologischen Sinne. In der Biosphäre wird hauptsächlich der reduktive Pentose-Phosphat (*Calvin-Benson*) Zyklus von Prokaryoten und allen CO_2 -fixierenden Pflanzen genutzt. Es gibt aber neben der Gluconeogenese aus Acetyl-CoA noch weitere wichtige alternative autotrophe Wege in Prokaryoten, die oft vernachlässigt werden (Fuchs, 2011):

Ein wichtiger CO_2 -fixierender Schritt liegt bei PEP-Pyruvat-Oxalacetat vor (Abbildung 1.6). So kann beispielsweise Phosphoenolpyruvat (PEP) bei *Yersinia enterocolitica*, oder Pyruvat bei *L. pneumophila* und *L. monocytogenes* direkt zu OAA carboxyliert werden (Sauer and Eikmanns, 2005; Kapitel I 3.2. Anaplerotische Reaktionen). Zudem existiert noch die Möglichkeit der CO_2 -Fixierung über die Glycinsynthase mittels THF (vergleichend dazu Kapitel I. 3.3; Abbildung 1.12).

Neben diesen Schritten gibt es noch vier weitere Möglichkeiten der CO_2 -Fixierung unter anderem über den reduktiven TCA-Zyklus (Wächtershäuser; 1990; Smith and Morowitz, 2004), den reduktiven Acetyl-CoA/ Kohlenstoffmonoxid-Dehydrogenase-Weg, den 3-Hydroxypropionat/Glyoxylatzyklus oder den Dicarboxylat/4-Hydroxybutyratzyklus (im Archaeon *Ignicoccus hospitalis*), bei denen entweder Bicarbonat oder CO_2 die Intermediate sind (siehe Abbildung 1. 16; Huber *et al.*, 2008).

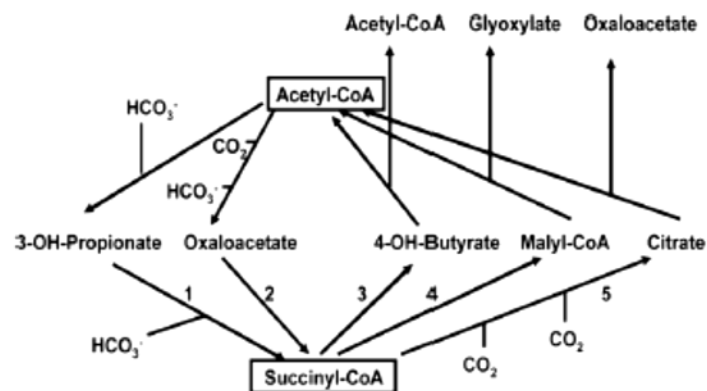


Abbildung 1.16: Wege der CO_2 -Fixierung (aus Huber *et al.*, 2008). Die Gemeinsamkeit ist die Bildung von Succinyl-CoA aus Acetyl-CoA durch zwei anorganische C-Atome. Durch Kombination ergeben sich die verschiedenen Fixierungswege. **1,4:** 3-Hydroxypropionat/Glyoxylatzyklus (*Chloroflexus sp.*); **1,3:** 3-Hydroxypropionat/4-Hydroxybutyrat (*Crenarchaeota*); **2,5:** Reduzierender Citratzyklus (viele Anaerobier oder fakultative Anaerobier); **2,3:** Dicarboxylat/4-Hydroxybutyrat (*Ignicoccus hospitalis*).

4. Professionell-fakultativ intrazelluläre Erreger

Infektionskrankheiten werden durch pathogene Mikroorganismen, die die Fähigkeit besitzen, neben einer Infektion auch Krankheitssymptome (= *Pathogenität*) bei spezifischen Wirten zu induzieren, ausgelöst. Dabei umfassen die krankheitserzeugenden Eigenschaften nicht allein die toxischen Wirkungen, sondern es besteht vielmehr eine Fülle an komplexen Strategien, um Wirtszellen zu infizieren (Toft and Andersson, 2010) und deren Immunantwort zu unterwandern (Sansonetti and Santo, 2007). Die hierbei zum Einsatz kommenden Komponenten, wie z.B. *Adhäsine*, *Invasine*, *Exo-* und *Endotoxine*, werden unter dem Überbegriff *Pathogenitätsfaktoren* zusammengefasst (Hacker and Heesemann, 2000). Man unterscheidet in der Mikrobiologie zwischen *spezifischen Pathogenitätsfaktoren*, wie etwa Kapselbildung, Adhäsine, Toxine, Invasionsfaktoren und *unspezifischen Faktoren*, die die biologische Voraussetzung zur Auslösung einer Krankheit bilden, wie z.B. die Anpassung an Habitate und bestimmte Stoffwechsellleistungen (Hacker and Heesemann, 2000).

Invasion als Überlebensstrategie:

Die Adhäsion an Wirtszellen ist der erste Schritt bei der Etablierung einer Infektion. Adhärierende, extrazelluläre Pathogene sind jedoch permanent dem Angriff des Immunsystems, der Einwirkung von Antibiotika oder einer mechanischen Abwehr ausgesetzt, weswegen es von Vorteil sein kann, in die Wirtszelle einzudringen. Diese intrazelluläre Überlebensstrategie erfordert jedoch eine Anpassung des bakteriellen Metabolismus an dessen Wirt(zelle) (Eisenreich *et al.*, 2010; Tolman and Valvano, 2012). *Obligat intrazelluläre* Bakterien, wie z.B. *Chlamydien* können nicht außerhalb der Wirtszelle überleben und haben ihren Stoffwechsel vollkommen an den des Wirts angepasst („*Stoffwechselparasitismus*“). Im Gegensatz dazu sind *professionell-fakultativ intrazelluläre* Pathogene sowohl an eine extra- als auch an eine intrazelluläre Umgebung adaptiert. Wichtige Vertreter dieser Gruppe sind z.B. *Listerien*, *Yersinien* und *Legionellen* (Hacker and Heesemann, 2000), mit denen sich vorliegende Arbeit im wesentlichen befasst. Unter dieser Gruppe haben sich ebenfalls mehrere Strategien etabliert. So gibt es einige Pathogene, die sich in membranumgebenen Vakuolen aktiv intrazellulär replizieren (z.B. *Legionella pneumophila*, *Salmonella enterica*, *Mycobacterium tuberculosis*), andere wiederum enkommen dem primären Phagosom und replizieren im Cytosol (z.B. *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri* oder *Rickettsia prowazeki*) (Kumar and Valdivia, 2009; Deretik and Levine, 2009; Nothelfer *et al.*, 2011; Camejo *et al.*, 2011). Eine ganz

andere Strategie wird von *Yersinia enterocolitica* gewählt. *Y. enterocolitica* kann sich zwar intrazellulär replizieren, entgeht aber gerne der primären Phagozytose durch die Sezernierung von Effektorproteinen und kann sich so in der extrazellulären Matrix des Wirts aufhalten und vermehren (Schmid *et al.*, 2009).

5. Modellorganismus der fakultativ extrazellulären Infektion: *Yersinia enterocolitica*

Die Gattung *Yersinia* umfasst gram-negative, nicht sporulierende, fakultativ anaerobe Stäbchen und ist der Familie der *Enterobacteriaceae* zuzuordnen (Schleifstein and Coleman, 1939; Frederiksen, 1964). *Yersinien* sind psychrotolerant, d.h. sie können selbst bei Temperaturen von 0 bis 4°C wachsen (Bradley *et al.*, 1997), ihr Wachstumsoptimum liegt aber bei 27°C (Aepfelbacher and Heesemann, 2001). Bis heute sind 11 *Yersinia*-Arten bekannt, aus denen drei (*Y. pestis*, *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*) von humanpathogener Bedeutung sind (Koornhof *et al.*, 1999; Putzker *et al.*, 2001). Alle drei humanpathogene *Yersinia* Arten sind vollständig sequenziert (*Y. pestis*: Song *et al.*, 2004; *Y. enterocolitica*: Thomson *et al.*, 2006; *Y. pseudotuberculosis*: Eppinger *et al.*, 2007). Phylogenetisch gesehen hat sich *Y. pestis* vor ca. 1 500 – 20 000 Jahren aus *Y. pseudotuberculosis* Serotyp O:1b entwickelt (Achtman *et al.*, 1999). Somit ist die enge Verwandtschaft und die fast 97 %ige Genomsequenz-Homologie erklärt (Trebesius *et al.*, 1998). Allerdings ist *Y. pestis* anders als *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* ein obligat intrazelluläres, unbewegliches Bakterium.

Infektionsroute von *Y. enterocolitica*:

Yersinia enterocolitica ist in der Natur weit verbreitet, sowohl in aquatischen als auch in tierischen Habitaten, wobei als Haupt(zwischen)wirt das Hausschwein dient (Bottone, 1997). Es gehört in Europa zu den häufigsten Darminfektionserregern. Nach der Ingestion durch kontaminierte Lebensmittel befällt *Y. enterocolitica* den Dünndarm von Mensch und Tier. Zur erfolgreichen Infektion des Wirtes kommt dabei eine ganze Reihe von Pathogenitätsfaktoren zum Einsatz (Bottone, 1997). Chromosomal codiert sind z.B. *Invasin InvA*, der *Adhäsionsfaktor Myf* (= mucoid Yersinia factor) und das hitzestabile *Enterotoxin Yst*, welches die Guanylat-Cyclase im Darm aktiviert, wodurch Darmentzündungen und wässriger Durchfall ausgelöst werden (Delor and Cornelis, 1992). Eine schematische Darstellung der physiopathologischen Infektionsroute und Invasion von Epithelzellen des Darms ist in Abbildung 1.17 zu sehen.

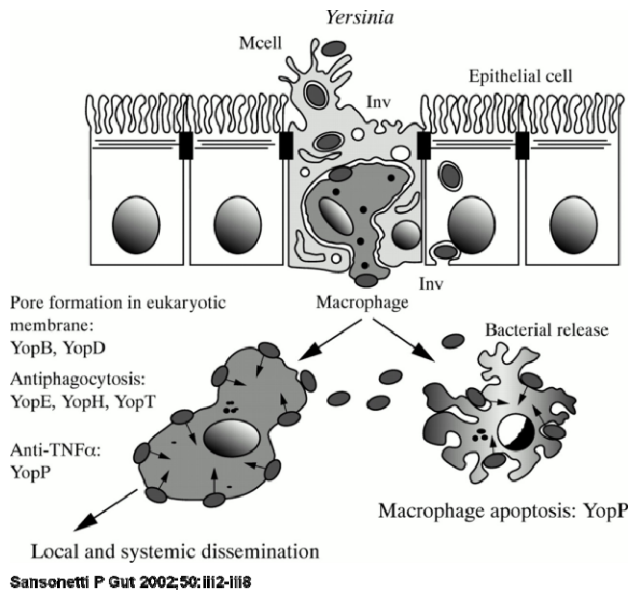


Abbildung 1.17: Physiopathologisches Schema der *Yersinia* Infektion (aus Sansonetti, 2002).

Eine unerkannte Infektion führt zu einer reaktiven Arthritis, in manchen Fällen kann es sogar durch eine allergische Reaktion der Haut zu einer akuten Entzündung des Unterhautfettgewebes mit Knötchenbildung (Erythema nodosum) kommen (Bottone, 1997; Fredriksson-Ahoma *et al.*, 2006).

5.1. Virulenzfaktoren von *Yersinia*

Der Lebenszyklus von *Yersinia enterocolitica* erfordert eine Regulation der Virulenz. Dazu sind die folgenden wichtigen Infektionsfaktoren plasmid-codiert.

5.1.1. Das Virulenzplasmid pYV (plasmid for *Yersinia* virulence)

Essentiell für die Ausprägung der Virulenz von *Y. enterocolitica* ist das 70 bis 75 Kilobasen große Plasmid pYV (Koornhof *et al.*, 1999). Neben den wichtigen Effektorproteinen, den *Yersinia outer proteins* (YOPS) codiert es unter anderem für Adhäsine YadA und verschiedene Chaperone Syc (specific Yop chaperone). Der Großteil an Information auf dem Plasmid dient jedoch zum Aufbau des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) (Cornelis *et al.*, 1998). Angepasst an den biphasischen Lebenszyklus ist die Transkription des pYV temperatursensitiv und wird erst bei 37°C und/oder bei Zell-Zellkontakt zu einer eukaryotischen Zelle (über Oberflächenproteine getriggert) aktiviert (Cornelis *et al.*, 1998). Bei 37°C und niedriger Ca²⁺-Konzentration im Medium (z.B. durch Zugabe von Komplexbildnern wie EDTA) wird der Phänotyp LCR (low calcium response) exprimiert, der durch begrenztes Wachstum und eine massive Sezernierung von YOPS in das Medium charakterisiert ist (Higuchi *et al.*, 1959; Carter *et al.*, 1980; Goguen *et al.*, 1984; Schmid *et al.*, 2009). Zur Produktion von YOPS benötigt *Y. enterocolitica* eine hohe Zufuhr an Energie und Metaboliten. Dies scheint proximal für das verringerte Wachstum verantwortlich zu sein. Allerdings gibt es Ansatzpunkte, dass der Wachstumsstopp von der YOPS-Produktion entkoppelt werden kann

(Brubaker 2005; Wiley *et al.*, 2007) und somit eine wichtige Schnittstelle zwischen der Regulation von Metabolismus und Virulenz aufgedeckt ist.

5.1.2. YOPS: *Yersinia* outer proteins zur Neuprogrammierung der Wirtszelle

Eine Besonderheit bei *Y. enterocolitica* ist die Vermeidung der Phagozytose durch Makrophagen. Die Injektion von YOPS (*Y*ersinia *O*uter *P*roteins) in die Wirtszelle, die dort eine ganze Signalkaskade auslösen, befähigen *Y. enterocolitica* dazu, die Immunantwort des Wirts zu unterlaufen und sich extrazellulär im Wirtsgewebe zu vermehren (Cornelis *et al.*, 1998; Aepfelbacher *et al.*, 1999; Schmid *et al.*, 2009). Die zellmodulierenden Eigenschaften reichen von Porenbildung in die Wirtszelle (YopB/D), über GTPase-Aktivierung (YopE), Cystein-Protease-Aktivität (Aktivierung der Caspase-Kaskade und Induktion von Apoptose in Makrophagen, Blockade der MAP-Kinase und NF- κ B-abhängigen Endocytose (YopP) (Adkins *et al.*, 2008), Agglutination von Plasma (Lee *et al.*, 1998) bis hin zur Modifikation des Stoffwechsels des Wirts zu ihren Gunsten (Schmid *et al.*, 2009). Des Weiteren ist es eine Funktion von YopK eine inflammatorische Antwort des Wirts auf das T3SS, über das die YOPS in die Wirtszelle transloziert werden, zu verhindern (Brodsky *et al.*, 2010). Bis heute sind 14 verschiedene YOPS bekannt. Aufgrund ihrer herausragenden Rolle im Infektionsmodell von *Y. enterocolitica* stehen die YOPS in besonderem Fokus dieser Arbeit, zumal bis jetzt wenig über deren Synthesewege bekannt ist.

5.2. Das Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) von *Yersinien* und dessen Regulation

Zur Injektion der Effektorproteine wird von vielen gram-negativen Bakterien, so auch bei *Y. enterocolitica* das Typ-III-Sekretionssystem ausgebildet (Troisfontaines and Cornelis; 2005). Der Basalkörper des Flagellenmotors ist mit dem Sekretionsapparat evolutionär verwandt. Das T3SS besitzt lediglich anstatt einer Flagelle eine nadelförmige Struktur. Über diese Nadel werden bei Kontakt mit der Wirtszelle die YOPS, gebunden an Chaperone, über die eukaryotische Membran transloziert (Cambronne *et al.*, 2004, Wölke *et al.*, 2011).

Regulation des Typ-III-Sekretionssystems:

Da die Ausbildung des T3SS plasmid-codiert ist, kommt es nur bei den Bedingungen, unter denen das Plasmid pYV exprimiert wird, zum Aufbau von T3SS.

Eine *negative Regulierung* erfolgt unter abiotischen, avirulenten Bedingungen (siehe Kapitel I 6.1.1). Vor allem die YOPS Sekretion bei *Y. enterocolitica* wird durch die Proteine YscM1

und YscM2 (zu 57% identisch mit YscM1) inhibiert. Die beiden YscM-Gene gelten als funktionell äquivalent, da die Deletion von nur einem der beiden Gene keine Veränderung im Phänotyp verursacht (Stainier *et al.*, 1997; Cambronne *et al.*, 2000). Jedoch besitzen beide Proteine unterschiedliche isoelektrische Punkte, weshalb nicht ausgeschlossen werden kann, dass sie unterschiedliche Effekte in der Wirts- und Bakterienzelle haben. YscM1 und YscM2 weisen homologe Strukturen mit dem N-Terminus des Effektors YopH auf, welcher mit dem Chaperon SycH wechselwirkt (Schmid *et al.*, 2009).

Beide Proteine können darüberhinaus noch mit mehreren Chaperonen interagieren und in Form eines Komplexes an das Enzym PEPC (Wirkungsweise siehe Kapitel I.3.2) binden. Durch YscM1 und YscM2 wird das Wachstum bzw. die Replikation heruntergeregelt (Schmid *et al.*, 2009). Zudem wird angenommen, dass sie die Bindung der Chaperone an die zu translozierenden Effektorproteine steuern und somit auch regulierende Eigenschaften auf die YOPS-Expression ausüben (Wilharm *et al.*, 2004; Schmid *et al.*, 2009).

Wenn die Virulenzfaktoren exprimiert werden und T3SS aktiv ist, kommt es zu unterschiedlichen Infektionsetappen. Vorausgehende ^{13}C -Perturbationsstudien von Schmid *et al.* (2009) konnten zeigen, dass in der ersten „loading“-Phase, während der massiven Produktion von YOPS, also einer Hochregulierung des Anabolismus, ein aktives PEPC Enzym für die Anaplerose (vergleiche Kapitel I. 3.2.) zur Bereitstellung der Intermediate der Aminosäuresynthese nötig ist. Bei der zweiten sogenannten „shooting“-Phase werden die YOPS gemeinsam mit den Chaperon gebundenen YscM1 und YscM2-Proteinen in den Wirt injiziert. Dies ist ein sehr energiefordernder kataboler Prozess, der eine Stilllegung der Anaplerose zu Gunsten der Energieerhaltung bedingt. Zudem kommt es bei den Mutanten $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ zu einer erhöhten Rate an Pyruvatbildung über die Glycolyse bzw dem ED-Weg bei gleichzeitiger, verstärkter (im Vergleich zum WT) Bildung von OAA über den TCA-Zyklus (Schmid *et al.*, 2009). Das virulente Stadium von *Y. enterocolitica* erfordert zusätzlich die Präsenz von Aminosäuren der Aspartat-Familie (siehe Kapitel I. 4) und der Vitamine Thiamin und Pantothenat im Medium (Koornhof *et al.*, 1999). Die Aminosäuren der Aspartat-Familie könnten dazu beitragen, den hohen Bedarf an OAA aufzufüllen, was wiederum für eine hohe TCA-Zyklusrate während der Virulenzphase spricht.

Dieser enge Zusammenhang der Regulation von Metabolismus und Virulenz macht das Infektionsmodell „*Y. enterocolitica*“, besonders aber dessen Schnittstelle von YscM1/2 an PEPC bei gleichzeitigem Einfluss auf die Sekretion und Synthese von YOPS, interessant für folgende ^{13}C -Markierungsexperimente, die vor allem die CO_2 -fixierende Funktion von PEPC,

die Verstoffwechslung von Glutamin unter virulenten und avirulenten Bedingungen sowie die Synthese von YOPS beleuchten.

6. Modellorganismen der intrazellulär-invasiven Infektion:

Unter den *professionell-fakultativ intrazellulären Pathogenen* haben sich verschiedene Strategien zur Vermeidung der Phagozytose bei Invasion der Wirtszelle und der intrazellulären Lebensweise entwickelt (Sansonetti, 2001; Cossart and Sansonetti, 2004; Fuchs *et al.*, 2012). Im Folgenden wird exemplarisch zur *phagosomalen Strategie* das Modellbakterium *Legionella pneumophila* und im Falle der *cytosolischen Überlebensweise* das Pathogen *Listeria monocytogenes* dargestellt.

6.1. *Legionella pneumophila* – ein phagosomaler Erreger

Die Gattung *Legionella* umfasst gram-negative, stäbchenförmige, nicht-sporulierende, unipolar flagellierte, obligat aerobe γ -Proteobakterien, die zur Familie der *Legionellaceae* gehört (Benson and Fields, 1998). Diesem Genus sind mittlerweile 56 Spezies und 73 Serogruppen zugehörig (Fields *et al.*, 2002; Diederens, 2008), diese Zahl steigt jedoch stetig an, so werden immer wieder neue Arten, wie z.B. *L. dresdenensis* sp. von Luck *et al.* 2009 beschrieben. *Legionellen* können im Temperaturbereich von 25 bis 42°C wachsen, ihr Optimum liegt bei 35°C (Katz and Hammel, 1987). Sie werden als Umweltbakterien bezeichnet, da sie ubiquitär v.a. freilebend in Süßwasserhabitaten, biofilmassoziiert oder im spezifischen Protisten zu finden sind (Rowbotham, 1980; Fliermans *et al.*, 1981). *Legionella* repliziert vorwiegend intrazellulär, z.B. in Protozoen wie *Acanthamoeba*, *Hartmanella*, oder *Naegleria* (Rowbotham, 1986; Fields, 1996; Swanson and Hammer, 2002). Das Vorkommen von *Legionella* ist jedoch nicht nur auf natürliche Habitate limitiert. Zudem finden sich unter den 56 *Legionella* Arten auch zahlreiche human-pathogene Vertreter, wobei ca. 75% der Legionellosen (Legionellen-Infektionen) durch *L. pneumophila* der Serogruppe 1, 20-30% von anderen Serogruppen und lediglich 5-10% von anderen *Legionella* Arten verursacht werden (Lück, 2008). Gefährlich für den Menschen ist somit das Vorhandensein von *L. pneumophila* in Kühltürmen, Warmwassersystemen, Klimaanlage, Whirlpools, Raumbefeuchter und Duschen (Atlas, 1999; Flannery *et al.*, 2006).

6.1.1. Epidemiologie von *L. pneumophila* – Legionellose

Zum ersten mal sorgte das bis dato unbeschriebene Humanpathogen während eines Treffens der US-Kriegsveteranenvereinigung „American Legion state convention“ im Sommer 1976 im Bellevue-Stratford Hotel in Philadelphia für Aufsehen. Dort erkrankten 181 Personen an einer atypischen Lungenentzündung, 29 davon verstarben. Bereits ein Jahr später konnte *L. pneumophila* isoliert und dessen Verbreitung über Aerosole in der Klimaanlage des Hotels als Ursache für das namensgebende Ereignis identifiziert werden (McDade *et al.*, 1977, Fraser *et al.*, 1977, Brenner *et al.*, 1979).

Die von *Legionella* ausgelöste Krankheit kann nach Inhalation von kontaminierten Aerosolen bei Menschen (Risikogruppen sind Senioren, Rauchern oder Immunsupprimierte) (Fields *et al.*, 2002) zwei Verlaufsformen annehmen. Die schwere Form ist, wie zuvor beschrieben, als Legionärskrankheit bekannt. Jene atypische, häufig fatale Lungenentzündung hat eine Inkubationszeit von 2-14 d und manifestiert sich mit hohem Fieber, Kopf und Muskelschmerzen. In besonders schweren Fällen kommt es zur Schädigung der Nieren und des zentralen Nervensystems, was mit Verwirrtheit und Delirium assoziiert ist (Fields *et al.*, 2002). Ein letales Stadium ist durch respiratorische Insuffizienz und Sepsis charakterisiert (Steinert and Hacker, 2005). Die milde Verlaufsform dieser Krankheit ist das selbst-limitierende Pontiac Fieber, das von Grippe-ähnlichen Symptomen begleitet ist (Glick *et al.*, 1978, Kaufmann *et al.*, 1981; Fields *et al.*; 2002). Bisher wurde von keiner Übertragung der Krankheit von Mensch-zu-Mensch berichtet (Molofky and Swanson, 2004; Hilbi *et al.*, 2010).

6.1.2. Der biphasische Lebenszyklus von *Legionella pneumophila*

Adaption an verschiedene Umweltbedingungen: Abiotische Umgebung versus intrazelluläre Replikation:

L. pneumophila hat einen biphasischen Lebenszyklus (siehe Abbildung 1.20), welcher das Produkt aus der Anpassung an die aquatische, abiotische Umwelt und der intrazellulären Lebensweise in Protozoen ist (Molofsky and Swanson, 2004). In diesen zwei Lebensphasen gibt es signifikante Unterschiede in der äußeren Form, im Metabolismus und der Ausprägung von Virulenzgenen. Diese Änderungen sind optimal abgestimmt auf die jeweiligen Umweltfaktoren wie Temperatur, Osmolarität und Nährstoffverfügbarkeit. So unterscheidet man die *transmissive* (virulente) von der *replikative* (nicht virulente) Phase (Molofsky and

Swanson, 2004, Hilbi *et al.*, 2010). In natürlicher Umgebung repliziert *Legionella* hauptsächlich als intrazellulärer Parasit (Byrne and Swanson, 1998). Da *Legionella* für die Replikation in Protozoen die selben Mechanismen benutzt wie in den Alveolarmakrophagen, ist der Lebenszyklus, bzw. Infektionszyklus in beiden Wirtszellen sehr ähnlich (Abu Kwaik, 1996; Gao *et al.*, 1997; Segal and Shuman, 1999; Molofsky and Swanson, 2004). Beobachtungen, die an Amöben-Infektionsmodellen gemacht werden, könnten somit auch Hinweise und Informationen zur Infektionsroute im Menschen geben.

Die intrazelluläre Vakuole, eine ruhige Nische zur Replikation:

Nach der Phagozytose durch Protisten oder humanen Makrophagen in der Lunge, befindet sich *L. pneumophila* in einer nährstoffreichen, membrangebundenen Vakuole, der sogenannten *Legionella-containing vacuole* (LCV) (Horwitz, 1983b). Im Gegensatz zu cytosolischen Erregern wie z.B. *L. monocytogenes* (siehe unten) ist das besondere Kennzeichen von *L. pneumophila* intrazellulär in der Vakuole zu verbleiben und in diesem Kompartiment zu replizieren (Horwitz, 1983a). *L. pneumophila* muss dabei drei essentielle Probleme bewältigen: die Vermeidung der Fusion mit dem antimikrobiellen Lysosom-Netzwerk (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006), die Versorgung mit Nährstoffen und die begrenzte räumliche Verfügbarkeit zur Replikation (Isberg *et al.*; 2009).

Zur Etablierung der LCV unterbindet *Legionella* über das *defect in organelle trafficking/intracellular multiplication* (Dot/Icm)-System - ein wichtiger Virulenzfaktor von *Legionella* - den Weg des endolysosomalen Netzwerks (Horwitz, 1983b; Roy *et al.*, 1998; Hilbi *et al.*, 2001; Shin and Roy, 2008), wodurch keine Reifung und Ansäuerung der primären Vakuole geschieht (Horwitz and Maxfield, 1984). Das Dot/Icm System ist ein Typ IV-Sekretionssystem, das mehrere hundert Proteine in das Wirtszellcytosol injiziert (Isberg *et al.*, 2009; Goody *et al.*, 2012). Die meisten dieser Effektorproteine unterwandern oder modifizieren die normalen vesiculären Transportprozesse, v.a. durch Interaktion mit Rab und Arf GTPasen (Amor *et al.*, 2005). So werden Mitochondrien, Vesikel des Endoplasmatischen Reticulums (ER) und Ribosomen von der LCV rekrutiert (Horwitz, 1983b; Swanson and Isberg, 1995; Isberg *et al.*, 2009). Dies ist möglich, da *Legionella* die Replikationsvakuole „tarnt“ (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006) und deren Effektorproteine mit Oberflächenproteinen der Wirtszelle, wie Phosphoinositide, interagieren (Weber *et al.*, 2009; Hilbi and Haas, 2012) und somit das vesiculäre Transportsystem zwischen ER und Golgiapparat ausnutzt (Kagan and Roy, 2002; Cazalet *et al.*, 2004).

Untersuchungen an immuno-magnetisch isolierten Replikationsvakuolen konnten zeigen, dass

in den LCVs mehr als 560 verschiedene Wirtszellproteine vorhanden sind, unter denen sich auch GTPasen befinden, die in Zusammenhang mit endosomalen und sekretorischen Vesiceltransport stehen (Urwyler *et al.*, 2009).

Es ist anzunehmen, dass das „Residieren“ in der Vacuole den Vorteil der Verfügbarkeit an Nährstoffen hat (Joshi and Swanson, 2011). Die nährstoffreiche Umgebung induziert in *L. pneumophila* das replikative Stadium, in dem Gene für die Proteinbiosynthese, den Metabolismus und der Replikation hochreguliert sowie die transmissiven Faktoren reprimiert werden (Molofsky and Swanson, 2003; Brüggemann *et al.*, 2006; Abbildung 1.18). Die Hauptmerkmale der replikativen Form von *Legionella* sind die Ausbildung und Hochregulierung von AS- und Oligonukleotidtransporter, Proteasen, Zucker-Transporter, Glycolyse- und ED-Weg-Enzyme und der Replikations-, Translations-, und Transkriptionsmaschinerie (Brüggemann *et al.*, 2006). Während dieser Phase ist *Legionella* salzresistent und nicht flagelliert (Heuner *et al.*, 1999).

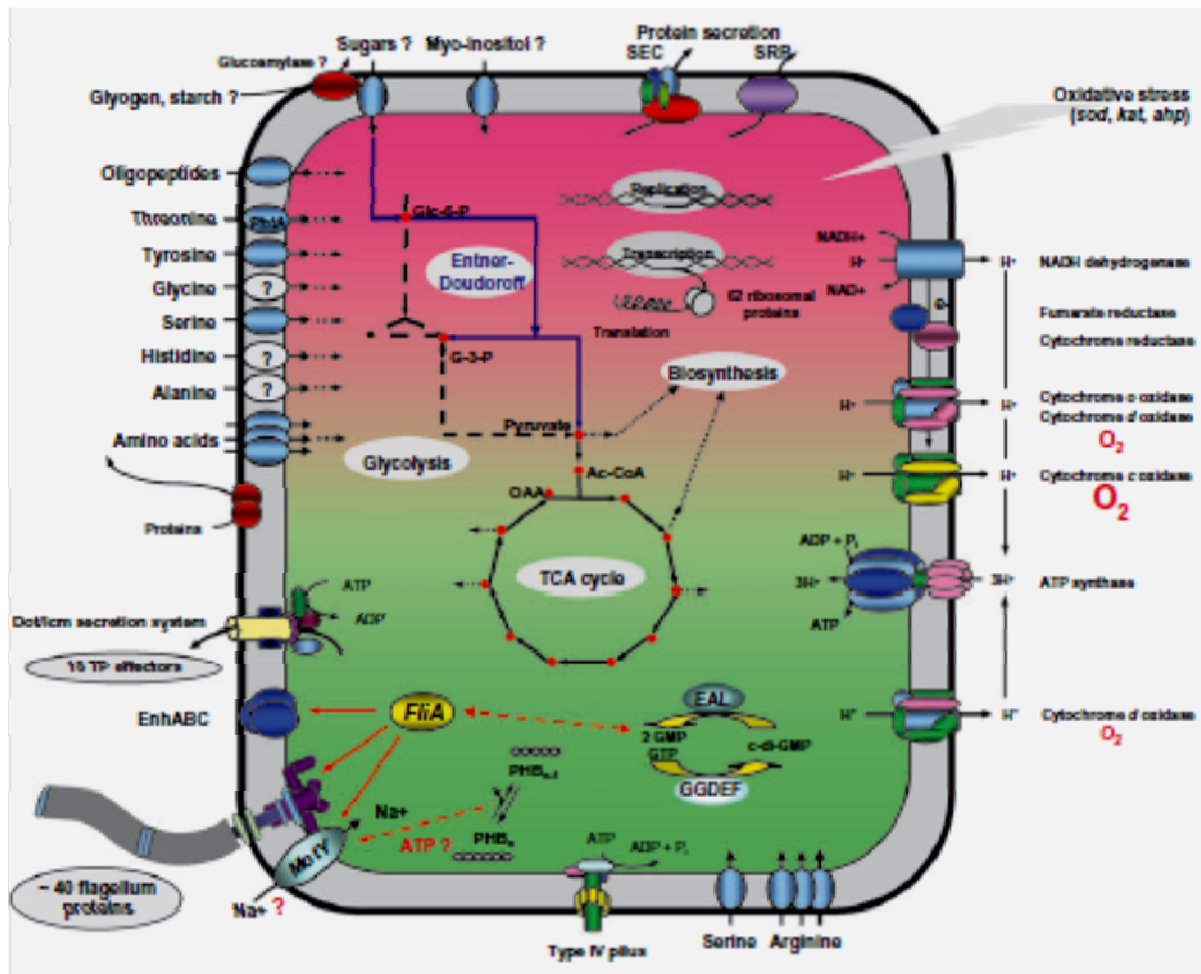
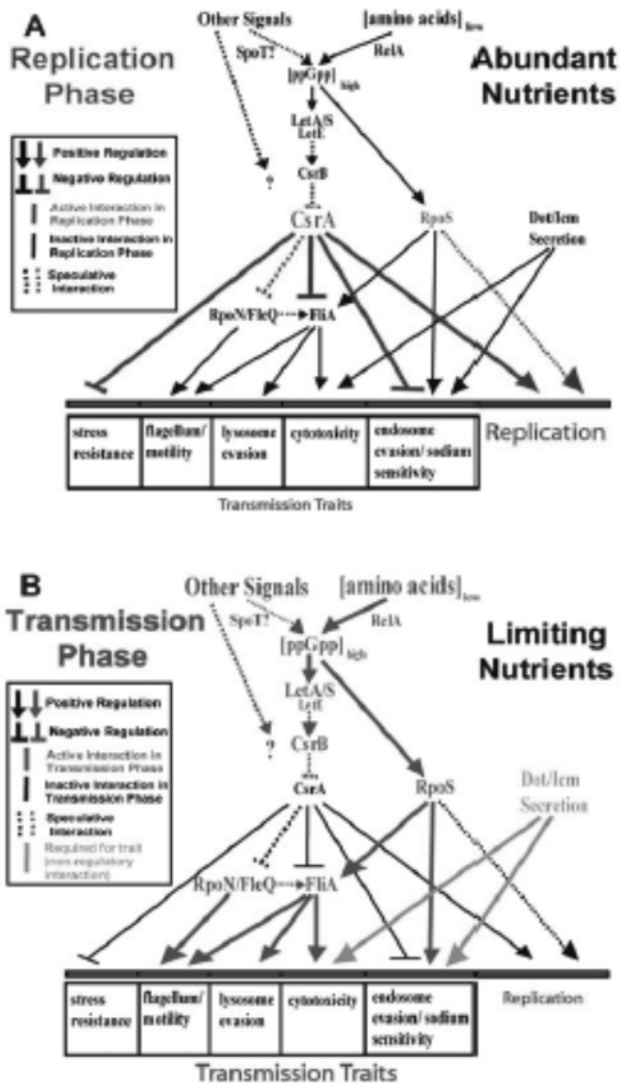


Abbildung 1.18: Der biphasische Lebenszyklus von *L. pneumophila* abgeleitet aus Transkriptomdaten (aus Brüggemann *et al.*; 2006). Schlüssel: **pink:** replikative Phase; **grün:** transmissive Phase; **Hauptmerkmale der replikativen Phase:** AS- und Oligonukleotidtransporter, Proteasen, KH-Transporter, Glycolyse und ED-Weg-Enzyme, Sc- und SRP (signal recognition protein)-abhängige Proteinsekretions-Systeme, Oxidative-Stress-response-Proteine und die Replikations-, Translations- und Transkriptionsmaschinerie; Endooxidasen für die ETC (Energy-producing Respiratory Chain) sind Cytochrom O, D und C Oxidasen. **Hauptmerkmale der transmissiven Phase:** GGDEF/EAL Proteine, Serin und Arginin Transporter, Typ IV Pilus Biosynthese, Synthese und Degradation von Polyhydroxybutyrat (PHB), Flagellen Formation und Sekretion von Effektorproteinen (über das *Dot/Icm*-System).

Nach einigen Replikationszyklen eignet sich *Legionella* auch die lysosomalen Komponenten an und vermehrt sich in phagolysosomaler Umgebung (Sturgill-Koszycki and Swanson, 2000). Mit fortschreitender Replikation in der Vakuole werden sowohl Nährstoffe als auch intraphagolysosomaler Raum knapp, so dass *Legionella* wieder zurück zur *transmissiven Form* ausdifferenziert. Reguliert wird dieser Phasenübergang durch Akkumulation des Alarmons ppGpp (Guanosin-3',5'-bipyrophosphat) (Dalebroux *et al.*, 2010), das ein unter Mikroorganismen weit verbreitetes Signalmolekül bei Stress oder Nährstoffmangel ist (Molofsky and Swanson, 2004, Dalebroux and Swanson, 2012). Der ppGpp-Spiegel korreliert indirekt mit dem Aminosäure-Spiegel. Reguliert wird dies über die ppGpp-Synthetase RelA

und der bifunktionalen Synthetase/Hydrolase SpoT (Potrykus and Cashel, 2008). Bei AS-Mangel wird die Expression von RelA induziert. SpoT kann jedoch auch bei Fettsäuremangel ppGpp-Expression hochregulieren. *L. pneumophila* ist somit fähig, die verfügbaren AS und



Fettsäuren wahrzunehmen und gleichzeitig auch auf Modifikationen im eigenen Metabolismus zu reagieren (Edwards *et al.*, 2009, Dalebroux *et al.*, 2009).

In der *transmissiven Phase* ist *Legionella* flagelliert, zytotoxisch und salzsensitiv (Byrne and Swanson, 1998). Die Ausbildung von Flagellen ist ein eindeutiger Marker der Virulenz (Bosshardt *et al.*, 1997). Die Expression der transmissiven und replikativen Faktoren ist in *Legionella* reziprok reguliert (Abbildung 1.19; Molofsky and Swanson, 2004).

Abbildung 1.19: Reziproke Expression des replikativen und transmissiven Phänotyps von *Legionella* (aus Molofsky and Swanson, 2004). Reguliert wird dies über das ppGpp-Level und einem Netzwerk an sigma-Faktoren, sowie posttranskriptioneller Regulation. **A:** Replikative Phase, CsrA (Carbon Storage Regulator) inhibiert Flagellenexpression; **B:** Transmissive Phase.

Als zentrale Schnittstelle dieser gegenläufigen Regulation sei hier besonders CsrA (carbon storage Regulator = small-RNA-binding Protein; Fettes *et al.*, 2001, Steinert *et al.*, 2007) erwähnt (siehe Abbildung 1.20). So inhibiert CsrA während der replikativen Phase die Expression der transmissiven Eigenschaften, wie z.B. die Flagellen-Biosynthese (Fettes *et al.*, 2001).

In der infektiösen, virulenten Form verlässt *Legionella* die Vakuole durch Lyse (Oldham and Rogers, 1985) oder in Membranvesikeln (Berk *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2004) und ist nun in der Lage neue Zellen zu infizieren. Grundsätzlich können durch *in vitro*-Kulturen die Manifestierung der beiden reziproken Phänotypen simuliert werden. Die Expression von replikativen Faktoren findet dabei während der exponentiellen Wachstumsphase statt, wenn

im Medium noch genügend Nährstoffe vorhanden sind und keine Raum-Limitation besteht. Beim Übergang zur stationären Wachstumsphase werden dann transmissive Eigenschaften exprimiert (Molofsky and Swanson, 2004). *Legionella* kann jedoch nach der Replikation im Wirt beim Übergang zur transmissiven Phase auch in eine cystenähnliche *mature intracellular form* (MIF-form) übergehen. Die MIF-Form ist typischerweise gekennzeichnet durch verkürzte Stäbchen, zahlreiche Polyhydroxybutyrateinschlüsse, eine erhöhte Virulenz, Antibiotika-, sowie pH-Resistenz (Garduno *et al.*, 2002).

Durch die enge Verknüpfung von Virulenzausprägung und Metabolismus an der Schnittstelle CsrA und dessen Regulation der Flagellenproteine (*fleQ* (Transkriptionsfaktor), *rpoN* (σ^{54} -Faktor); Steinert *et al.*, 2007; Albert-Weissenberger *et al.*, 2010) ist *L. pneumophila* besonders interessant für ^{13}C -Perturbationsstudien, mit speziellem Fokus auf die differentielle Expression von Metabolismus- und Virulenz-Eigenschaften während der einzelnen Wachstumsphasen.

6.1.3. Sekretionssysteme und Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

L. pneumophila bildet eine Vielzahl an Sekretionssystemen (Typ I-VI) aus, unter denen Typ II und IV eine entscheidende Rolle in der Ausprägung der Virulenz spielen.

Das Typ-II-Sekretionssystem (T2SS):

Die Translokation über die innere Membran im Periplasma erfolgt beim T2SS über einen zweistufigen Prozess, der Sec- oder Tat-abhängig ist (Cianciotto, 2005, de Buck *et al.*, 2007). Als Substrate konnten mindestens 20 Proteine bestimmt werden, von denen viele Enzyme, wie z.B. Chitinasen, Aminopeptidasen, Phosphatasen und Proteasen darstellen (Hales and Shumann, 1999; Aragon *et al.*, 2001; DebRoy *et al.*, 2006). So ist es nahe liegend, dass dieses Lsp (*Legionella* secretion pathway)-System entscheidend für die intrazelluläre Replikation in Amöben und humanen Makrophagen ist (Hales and Shumann, 1999). Es hat aber auch während der transmissiven Phase eine wichtige Rolle in der Persistenz in Biofilmen und beim Wachstum im niedrigen Temperaturbereich (Söderberg *et al.*, 2004).

Das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS):

Das T4SS ist in die zwei Subklassen T4ASS und T4BSS aufgeteilt (Christie and Vogel, 2000). *T4ASS* ist nicht in allen *Legionella*-Stämmen präsent. Es ermöglicht einen

DNA-Transfer auch zwischen verschiedenen *Legionella*-Arten (Glöckner *et al.*, 2008). Das wichtigste Sekretionssystem zur Virulenzausprägung ist das *T4BSS* (Dot/Icm) (Molofsky and Swanson, 2004). Es ermöglicht die direkte Injektion, ohne periplasmatische Zwischenstufe, von (mindestens 140) Effektorproteinen in das Wirtszellcytosol und wird gleich nach Eintritt in die Wirtszelle, also zum Übergang in die replikative Phase, aktiviert (Hubber and Roy, 2010). Es ist zudem essentiell für die Phagozytose, die Etablierung der LCV, die Vermeidung der Phagosom-Lysosom-Fusion und ist wichtig bei dem Verlassen der Wirtszelle (Molofsky and Swanson, 2004; Albert-Weissenberger *et al.*, 2007)

6.1.4. Zentrale Stoffwechselprozesse in *L. pneumophila* – State of the Art

Aminosäuren als zentrale Energie-Quellen:

Bisherige *in vitro*-Studien zeigten, dass *L. pneumophila* hauptsächlich Aminosäuren, vor allem Serin, Threonin und Glutamat als Energie- und Kohlenstoffquelle nutzt (Pine *et al.*, 1979; George *et al.*, 1980; Tesh and Miller, 1981). Da eine Replikation von *L. pneumophila* in der Natur exklusiv intrazellulär stattfindet, ist dieser Sachverhalt nicht verwunderlich. Die inkorporierten ^{14}C -Atome aus Glutamat fanden sich in der Biomasse von *L. pneumophila* in den Lipiden, Proteinen, Polysacchariden und Nukleinsäuren wieder, Leucin-stämmige C-Atome werden hauptsächlich für die Proteingenesse genutzt (Tesh *et al.*, 1983). Genomics-Daten zeigen weiter, dass *L. pneumophila* eine Vielzahl an Peptidasen, Proteinasen und Aminosäuretransporter besitzt (Cazalet *et al.*, 2004). Zum Wachstum im Medium benötigt *L. pneumophila* Cystein, Methionin, Prolin, Arginin, Threonin, Isoleucin, Leucin und Valin (Pine *et al.*, 1984). Eine echte Auxotrophie besteht allerdings nur für Cystein, Methionin (vermutlich keine Fähigkeit der Inkorporation von anorganischem Schwefel), Leucin, Isoleucin und Valin (Pine *et al.*, 1979). Durchgeführte ^{13}C -Perturbationsstudien mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ bestätigten diese Auxotrophie (Eylert *et al.*, 2010). Weiterführend zeigten diese *in vitro*-Studien, dass exogenes Serin (mit 25% ^{13}C -Excess) effizient zur Proteinbiosynthese genutzt wird. Zudem konnte auch in anderen Aminosäuren ^{13}C -Markierung detektiert werden, so dass offensichtlich auch ein Eintrag der C-Atome in den Kohlenhydratstoffwechsel stattfindet. Das rekonstruierte Modell der Verstoffwechslung von Serin im Kulturmedium findet sich in Abbildung 1.20.

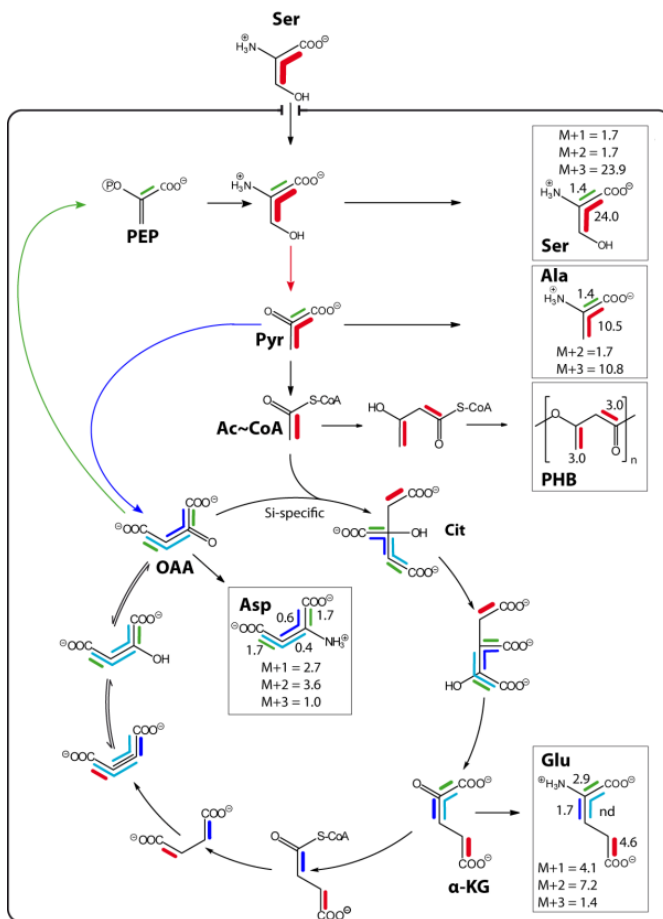


Abbildung 1.20: Modell der *in vitro*-Verstoffwechslung von Serin in *Lp Paris* (aus Eylert *et al.*, 2010). **Boxen:** gemessene AS und PHB; Farbige **Balken:** ^{13}C -Überschuss; anhand ^{13}C -NMR Spektroskopie bestimmt. **Isotopomer-Daten** anhand GC/MS-Analytik berechnet.

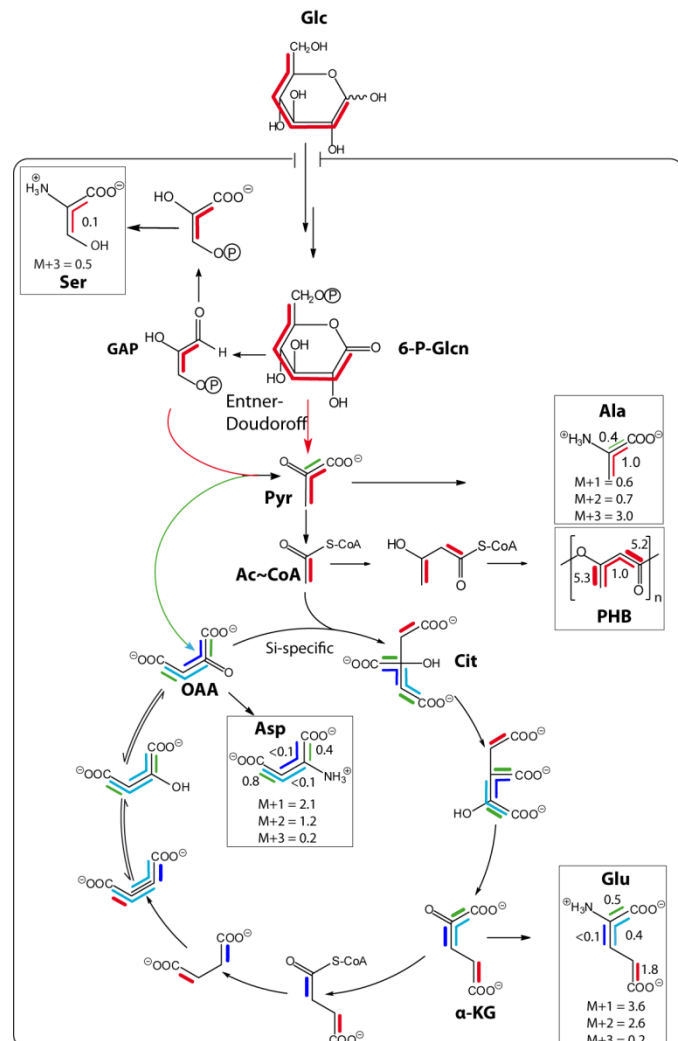
Während der replikativen Phase in Amöben konnten Brüggemann *et al.* (2006) zeigen, dass *L. pneumophila* das Angebot an Wirtszellprotein „plündert“ und daher auch die Expression von Enzymen zur Aminosäuredegradation hochreguliert. Zusätzlich werden aber auch Zuckerverbindungen aufgenommen.

Kohlenhydratstoffwechsel:

Lange wurde postuliert, dass *Legionella* Glucose nicht verstoffwechselt. In der Tat kommt es zu keiner Wachstumsoptimierung durch Zugabe von Glucose ins Medium (Pine *et al.*, 1979). Untersuchungen mit ^{14}C - und ^{13}C -markierter Glucose konnten jedoch aufzeigen, dass Glucose erfolgreich verstoffwechselt werden kann. (Tesh *et al.*, 1983; Harada *et al.*, 2010; Eylert *et al.*, 2010). Aufgrund ungleicher Verwendung der C-Atome (C1 und C2 hauptsächlich zur CO_2 -Produktion, C6 vermehrt in der Biomasse) wurde als Abbauweg der ED- oder PPP-Weg postuliert und die Glycolyse eher ausgeschlossen (Tesh *et al.* 1983). Im Gegensatz dazu wird C1 von Glc-1-P fast ausschließlich in die Biomasse inkorporiert und gegenüber Glucose oder Glc-6-P bevorzugt (Weiss *et al.*, 1980). Parallel dazu zeigten die Analysen von Brüggemann *et al.* (2006) eine Hochregulierung der ED-Enzyme, Glucokinasen und Zuckertransporter während der replikativen Wachstumsphase. Ein putatives Modell der Glucose-Verstoffwechslung ‚abgeleitet von *in vitro*-Markierungsstudien mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glucose, ist in Abbildung 1.21 dargestellt (aus Eylert *et al.*, 2010). Vermutlich spielt auch die Gluconeogenese in *L. pneumophila* eine Rolle, da die Aktivität der Fru-1,6-bisphosphatase

um circa 10-fach höher ist, als die der Phosphofruktokinase (Kapitel I.3.1.2) (Pine *et al.*, 1984). Ebenfalls ist die anaplerotische Funktion von PEPC (Kapitel I.3.2.) in *L. pneumophila* vorhanden (Pine *et al.*, 1984).

Abbildung 1.21: Modell der Glucose-Verstoffwechslung durch *Lp* Paris in AYE-Medium (aus Eylert *et al.*, 2010). **Boxen:** gemessene AS und PHB; **Farbige Balken:** ^{13}C -Überschuss; anhand ^{13}C -NMR Spektroskopie bestimmt. **Isotopomer-Daten** anhand GC/MS-Analytik berechnet.



Neben der Verstoffwechslung von Glucose ist *L. pneumophila* auch dazu fähig, über eine eukaryotenähnliche Glucoamylase A (*gamA*) Glycogen und Stärke zu spalten und als C-Quellen zu nutzen (Brüggemann *et al.*, 2006; Herrmann *et al.*, 2011).
Glucoamylasen

(Glucan-1,4- α -Glucosidasen) katalysieren dabei die Hydrolyse der α -1,4- und α -1,6-glykosidischen Bindungen am nicht-reduzierenden Ende der Kohlenhydrate, wobei als Endprodukt eine β -D-Glucose entsteht (Xiao *et al.*, 2006; Herrman *et al.*, 2011). Die Expression von GamA ist während der intrazellulären Replikation in Amöben hochreguliert (Brüggemann *et al.*, 2006).

Produktion von Polyhydroxybutyrat (PHB) als Energie- und Speicherstoff:

Unter Prokaryoten ist die Fähigkeit aus verschiedensten C-Quellen Biopolymere herzustellen sehr weit verbreitet. Dabei gibt es 4 Klassen von Polymeren: Polysaccharide, Polyamide, anorganische Polyanhydride (wie z.B. Polyphosphate) und Polyester. Zur letzten Klasse zählt unter Anderem das Polyhydroxybutyrat (PHB) (Rehm, 2010), welches als gängigstes endogenes Speicherpolymer von Bakterien akkumuliert wird (Anderson and Dawes, 1990;

Steinbüchel and Schlegel, 1991; Hermawan and Jendrossek, 2006). Wichtig sind diese „Vorratspolymere“ vor allem zum Erhalt des Energiehaushaltes in einer nährstoffarmen, abiotischen Umgebung (James *et al.*, 1991). Gerade die hochvirulente MIF-Form von *L. pneumophila* (Kapitel I. 7.1.2.) enthält sehr viel PHB (Oldham and Rogers, 1986), das typischerweise in kristalliner Granula-Form, die aus 10^3 - 10^4 Monomere besteht (Poirier, 2001), gespeichert wird (James *et al.*, 1999; Rehm, 2010).

Die *Biosynthese* geht von zwei Molekülen Acetyl-CoA aus, welche mit der β -Ketothiolase (in *Legionella pneumophila* gibt es drei homologe Gene: *lpp1307*, *lpp1555*, *lpp1788*; Herrmann, 2012) durch eine Claisen-Kondensation zu Acetoacetyl-CoA umgewandelt werden (Eylert *et al.*, 2010). Acetoacetyl-CoA wird weiter unter Verbrauch von NADPH zu β -Hydroxybutyryl-CoA durch die Acetoacetyl-CoA-Reduktase (vier putative Homologe in *Legionella pneumophila*: *lpp0620*, *lpp0621*, *lpp2035*, *lpp2322*; Herrmann, 2012) reduziert, welches schließlich mittels der PHB-Synthase (*lpp0650*, *lpp2038*, *lpp2214*, *lpp2323*; Herrmann, 2012) zu PHB polymerisiert wird (Steinbüchel and Schlegel, 1991; Rehm and Steinbüchel, 2005).

In der Bildung von PHB hat *L. pneumophila* zwei wichtige Prozesse vereint. Zum einen entsteht ein für das extrazelluläre Überleben in der abiotischen Natur wichtiger Energie- und Kohlenstoff-Speicher, zum anderen wird simultan überschüssiges Acetyl-CoA abgebaut und Reduktionsäquivalente zurückgewonnen (Mauchline *et al.*, 1992; Kabir and Shimizu, 2003). Eine hohe Konzentration an reduzierten Reduktionsäquivalenten würde die Aktivität vieler Enzyme, wie die der β -Ketothiolase, der Pyruvat-Dehydrogenase, der Citratsynthase und Isocitratdehydrogenase herabsetzen, was in einer Runterregulierung des TCA-Zyklus mit vermindertem Wachstum resultieren würde (Mothes *et al.*, 1996).

Der *Abbau von PHB* hin zu Acetoacetat geschieht durch PHB-Depolymerasen, Hydroxybutyratdimer-Hydrolasen und β -Hydroxybutyrat-Dehydrogenasen (Korotkova and Lidstrom, 2001). Weiter wird Acetoacetat aktiviert über die Acetoacetyl-CoA-Synthetase zu Acetoacetyl-CoA, welches in Acetyl-CoA umgewandelt und in den Fettsäure-Metabolismus oder in den TCA-Zyklus eingeschleußt werden kann (Hoffmann, 2008; KEGG). Eine Übersicht des PHB-Stoffwechsels von *LpP* findet sich in Abbildung 1.22.

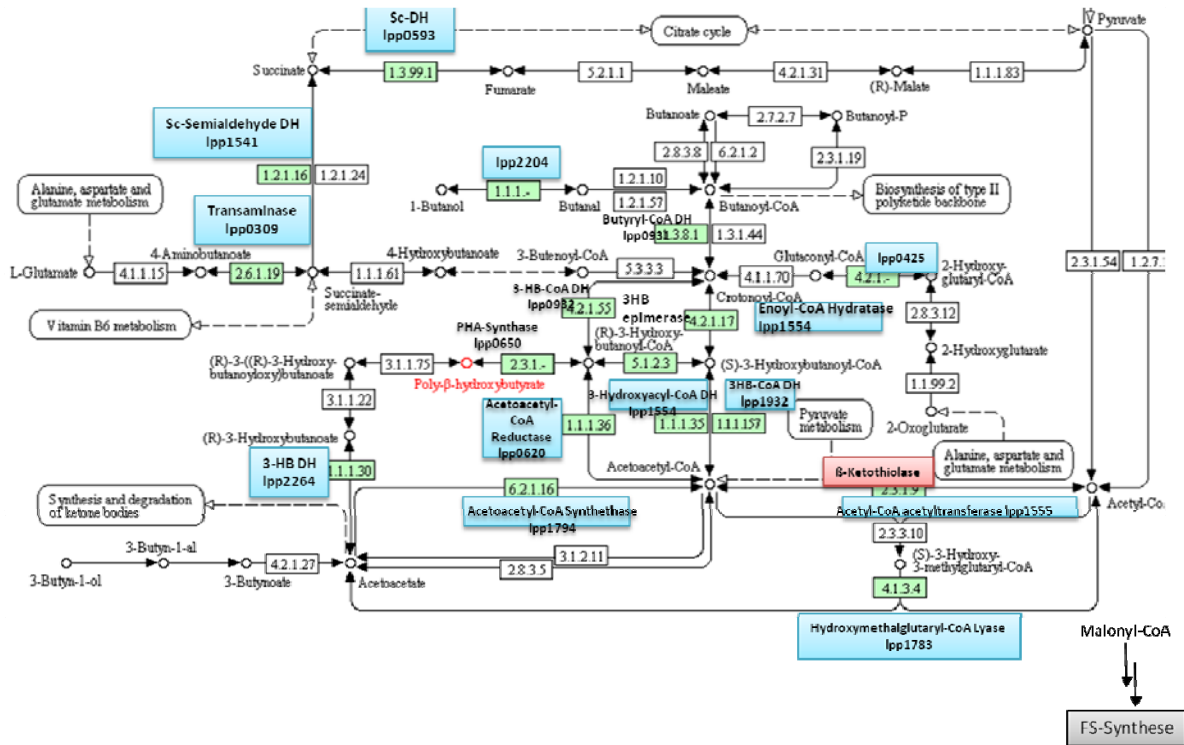


Abbildung 1.22: Der Poly-3-Hydroxybutyrat-Stoffwechsel von *L. pneumophila* Paris (modifiziert aus KEGG-lpp0065 und Steinbüchel and Schlegel, 1991); Stand: April 2012); **grüne Boxen:** nachgewiesene Enzyme in LpP (BRENDA-Nomenklatur); **blaue Boxen:** Enzym-Name und Zuordnung in *L. pneumophila*.

Regulation der PHB-Produktion:

Proteomics-Daten konnten erst vor kurzem zeigen, dass in der post-exponentiellen Wachstumsphase die Expression der Enzyme β -Ketothiolase und Acetoacetyl-CoA-Reduktase hochreguliert wird (Hayashi *et al.*, 2010). Laut den Transkriptomik-Daten von Brüggemann *et al.* (2006) werden zum Übergang in die transmissive Phase *in vivo* in *Acanthamoeba castellanii* mehrere putative PHB-Synthasen in *L. pneumophila* induziert. Unter *in vitro*-Bedingungen wird die PHB-Synthese durch Eisenmangel und niedrige Temperaturen hochreguliert (Mauchline *et al.*, 1992; James *et al.*, 1999). Da PHB essentiell zur Ausübung des biphasischen Lebensstils von *L. pneumophila* und eng mit diesem verknüpft ist, ist es naheliegend, dass die PHB-Produktion ähnlichen Regulationsmechanismen wie die der Virulenzfaktoren unterliegt, wodurch PHB in einen besonderen Fokus bei der Betrachtung des Metabolismus von *L. pneumophila* rückt.

6.1.5. *Acanthamoeba castellanii* – der natürliche Wirtsorganismus von *L. pneumophila*

Protozoen, wie z.B. Amöben, haben eine essentielle Rolle in den Nährstoffkreisläufen des Ökosystems, da sie als eine Art Schnittstelle zwischen Mikro- und Makrokosmos fungieren (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Amöben ernähren sich von Bakterien (durch Phagozytose und Lyse der Mikroorganismen) und führen so dem Ökosystem wieder Mineralstoffe zu. Dazu bilden sie eine Vielzahl an Abbau-Enzymen, wie z.B. Proteasen, Chitinasen, Cellulasen, Alginat-Lyasen, oder (PHB)-Depolymerasen aus und können so auch Mikroorganismen aus Biofilmen aufnehmen oder sich von bakteriellen Polymeren ernähren (Anderson *et al.*, 2005). *Acanthamoeba castellanii* gehört zu den wichtigsten Vertretern der frei-lebenden Amöben (FLA) und ist in der Natur ubiquitär verbreitet (Anderson *et al.*, 2005). Man findet sie jedoch nicht nur in natürlichen Habitaten, sondern auch im Trinkwasser, in Schwimmbädern oder in Kontaktlinsenflüssigkeiten (Marshall *et al.*, 1997; Lee and Gotay, 2010). Dies ist problematisch, da *Acanthamoeba* ein opportunistischer Krankheitserreger ist und z.B. Hornhautentzündungen oder granulomatöse Amöben-Enzephalitis beim Menschen auslösen kann (Anderson *et al.*, 2005).

A. castellanii kann auch widrige äußere Bedingungen überleben, indem sie einen biphasischen Lebenszyklus eingeht. In nährstoffreicher, stressarmer Umgebung befinden sich Amöben in der vegetativen Lebensphase (*Trophozoit*). In dieser Phase replizieren sie sich durch Zellteilung und haben einen aktiven Stoffwechsel. Unter Stresseinfluss differenzieren die Trophozoiten zu *Cysten* aus. Diese sind metabolisch inaktiv und weisen eine hohe Toleranz gegenüber Trockenheit, Hitze, UV-Strahlung und Desinfektion auf (Bryant *et al.*, 1982).

Die Tatsache, dass freilebende Amöben natürliche Wirtszellen für viele pathogene Mikroorganismen, wie z.B. *Chlamydia pneumoniae* (Amann *et al.*, 1997), *Francisella tularensis* (Abd *et al.*, 2003), *Helicobacter pylori* (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002) oder auch *Legionella* spp. (Neumeister *et al.*, 1997) sind, macht sie besonders interessant für Infektionsstudien, aber auch gefährlich für den Menschen, da sie als Vektoren und Reservoir für humanpathogene Bakterien angesehen werden müssen (Schmitz-Esser *et al.*, 2010).

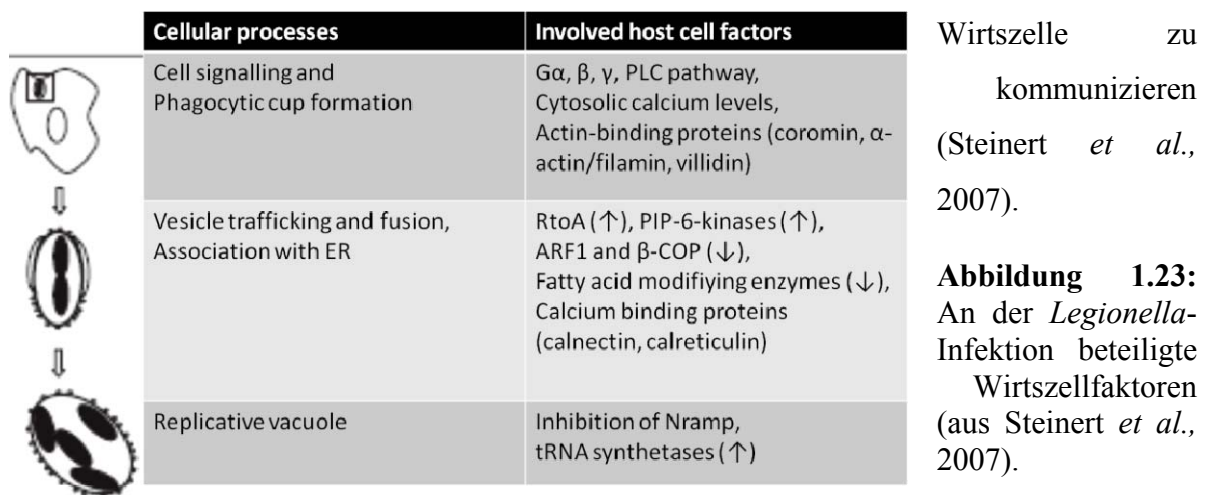
Acanthamoeba diente bereits erfolgreich als Modellorganismus für die eukaryotische Transkription und ist auf zellulärer Ebene dem humanen System sehr ähnlich (Chen *et al.*, 2004).

Der Metabolismus von *A. castellanii*:

Bisher ist noch relativ wenig über den Metabolismus von *A. castellanii* bekannt. Vorabstudien mit ^{13}C -markierter Glucose haben gezeigt, dass *A. castellanii* aus Glucose die Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly, Ser, Pro, Phe, Thr und Tyr *de novo* synthetisieren kann. Die Synthese der aromatischen AS belegt einen vollständigen Shikimat-Weg (Eylert, 2009).

Interaktion zwischen *L. pneumophila* und *A. castellanii*:

Die enge Vergesellschaftung von *L. pneumophila* mit frei-lebenden Protozoen hat vermutlich ein ganzes Set an Virulenzfaktoren generiert, die es *Legionella* erlaubt mit der eukaryotischen



Dies spiegelt sich auch im Genom der sequenzierten *Legionella*-Arten wieder (Cazalet *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004), da der Großteil für eukaryoten-ähnliche Proteine oder Proteine mit Motiven, die bisher nur (oder hauptsächlich) in Eukaryoten gefunden wurden (Cazalet *et al.*, 2004; Brüggemann *et al.*, 2006) codiert. Diese Proteine könnten die Wirtszellproteine nachahmen, wodurch eine Pathogen-Wirt-Interaktion ermöglicht wird. Besonders interessant sind z.B. die Proteine, die durch eine F- oder U-Box mit der Ubiquitin-Maschinerie (Ubiquitinierung dient als Marker für proteasomale Degradation) des Wirts interagieren können (Steinert *et al.*, 2007).

L. pneumophila reagiert nicht nur auf Konzentrationsänderungen von Nährstoffen mit Anpassungen und Regulation des Metabolismus und der Virulenz, sondern moduliert auch gezielt den Wirtszellmetabolismus und dessen Proteinsynthese (Hilbi *et al.*, 2010). So produziert *L. pneumophila* drei Glucosyltransferasen (Lgt1-3), die differentiell reguliert sind und damit eine spezifische Rolle bei der Virulenzausprägung haben könnten (Hilbi *et al.*, 2010). Durch diese Glucosyltransferasen können Komponenten der Translation so modifiziert

werden, dass die Proteinbiosynthese in der Wirtszelle gestoppt wird, was subsequent deren Zelltod zur Folge hat.

Transkriptomdaten zufolge drosselt *L. pneumophila* die Synthese von Hydrolasen, Proteinen, Lipid-modifizierenden Enzymen und die Lysosom-Aktivität im Wirt. Gleichzeitig werden Gene für den tRNA-Metabolismus, die Glucose Homeostase, die Synthese von Glutamin- und Pyruvat-stämmigen Aminosäuren, die Nukleotid-Biosynthese und cytoskeletale Proteine hochreguliert (Steinert *et al.*, 2007). Eine Liste der involvierten Wirtszellfaktoren findet sich in Abbildung 1.23.

Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass *L. pneumophila* gezielt die Wirtszelle zur Replikation ausnützt. Viele Marker und Faktoren konnten dabei schon identifiziert werden, wie jedoch der Wirtszell-Metabolismus genau modifiziert wird, ist bis jetzt noch relativ unklar. Die vorliegende Arbeit kann als Auftakt zur Erforschung des Wirtszell-Metabolismus während der Infektion angesehen werden.

6.2. *Legionella oakridgensis*

Die Spezies *L. oakridgensis* konnte 1982 aus einem Kühlturm in Oak Ridge isoliert werden (Orrison *et al.*, 1983). *L. oakridgensis* ist im Gegensatz zu *L. pneumophila* nicht flagelliert, unbeweglich und benötigt zum Wachstum keine Zugabe von L-Cystein (Orrison *et al.*, 1983). Die Fähigkeit ohne Cystein auf Agar zu wachsen verdankt *L. oakridgensis* (anders als *L. pneumophila*) einer aktiven Serin-O-Acetyltransferase. Zudem konnte eine relativ hohe Konzentration an zellulären Fettsäuren, vor allem Hydroxy-Fettsäuren verglichen mit *L. pneumophila* nachgewiesen werden (Orrison *et al.*, 1983). Bisher konnten drei Fälle von Infektionen durch *L. oakridgensis* im Menschen nachgewiesen werden (Presti *et al.*, 2000). *L. oakridgensis* ist allerdings im Vergleich zu *L. pneumophila* sehr reduziert in der Pathogenität. Ähnlich wie in *L. pneumophila* werden in *L. oakridgensis* Dot/IcM Sekretionssysteme und eukaryotenähnliche Proteine codiert, jedoch mangelt es an einem homologen Glucosetransporter (*lpp0488*) (Heuner, *unpublished data*).

6.3. *Listeria monocytogenes* – ein cytosolischer Erreger

Listeria monocytogenes ist ein gram-positives, nicht sporulierendes, fakultativ anaerobes humanpathogenes Stäbchen-Bakterium, das vor allem bei Immunsupprimierten, Schwangeren und Neugeborenen schwerwiegende systemische Infektionen wie Bakteriämie, Meningoencephalitis, Schwangerschaftsabbruch oder neonatale Sepsis verursacht (Dussurget *et al.*, 2004; Hain *et al.*, 2007). Da Listerien im Temperaturbereich von 4-50°C unter aeroben und anaeroben Bedingungen und bei hohen Salzkonzentrationen wachsen können, sind sie ein großer Problemfaktor in der Lebensmittelindustrie. So ist es nicht verwunderlich, dass die Hauptinfektionsquelle von *Listeriosen* die Ingestion von kontaminierten (Roh-)Milchprodukten, Eiern, aber auch von listeriell-belasteten Meeresfrüchten oder Gemüse ist. Die Bakterien können nach der Magenpassage das Darmepithel überwinden und in den Blutkreislauf gelangen. Zudem haben sie die Fähigkeit, die Blut-Hirn- sowie die Plazenta-Schranke zu überwinden. Die hohe Sterberate von 20-30% (sogar 70%, wenn die Pathogene die Blut-Hirn-Schranke passieren), trotz frühzeitiger Antibiotikatherapie, hat die Erforschung dieses Bakteriums, vor allem von dessen Virulenzeigenschaften extrem forciert (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Hamon *et al.*, 2006).

Infektionsroute:

Mit der Nahrung aufgenommene *Listerien* binden an nicht-phagozytierende Zellen, wie z.B. Epithelzellen des Darms, Hepatocyten oder Fibroblasten durch die Oberflächenproteine Internalin A und B (Fuchs *et al.*, 2012). Internalin A bindet dabei an das Zell-Zell-Adhäsionsprotein E-Cadherin und Internalin B an die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Met (Gaillard *et al.*, 1991). So werden in den Wirtszellen Prozesse zur Phagozytose eingeleitet, die dazu führen, dass das Bakterium durch Macropinocytose in eine primäre Vacuole (Phagosom) eingeschlossen wird (Kerr and Teasdale, 2009).

Evasion aus dem Phagosom – die cytosolische Lebensweise:

Das Kennzeichen von *Listeria monocytogenes* ist dessen Fähigkeit aus dem Phagosom zu entkommen. Durch die Sezernierung des hämolytischen Zytolysins Listeriolysin (Meyer-Morse *et al.*, 2010) und der Phosphatidyl-spezifischen Phospholipase A wird die phagosomale Membran zersetzt (Abbildung 1.24; Ray *et al.*, 2009). Die Evasion aus der Vacuole muss geschehen, bevor die Vacuole mit dem Lysosom, das antimikrobielle Substanzen enthält, fusionieren kann (Haas; 2007).

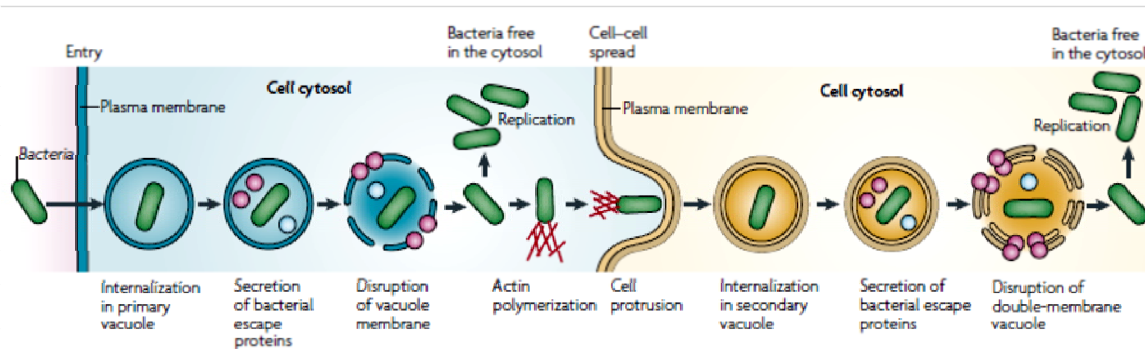


Abbildung 1.24: Der intrazelluläre Lebensstil von cytosolischen Pathogenen (aus Ray *et al.*, 2009).

Einmal aus der Vacuole befreit, kann sich *Listeria* nicht nur im Cytosol vermehren, sondern auch zelluläres Aktin rekrutieren und polymerisieren, und sich so ungerichtet in der Wirtszelle fortbewegen. Trifft das Bakterium dabei die Wirtszellmembran, bilden sich lokale Ausstülpungen bis in die Nachbarzelle hinein. Diese können sich von der Ursprungszelle abschnüren, so dass das Pathogen von einer Doppelmembran (sekundären Vakuole) umgeben ist (Ray *et al.*, 2009). Durch die Sekretion von Phospholipase C (Phosphatidylcholin-spezifisch) und Listeriolysin entkommt *Listeria* auch dieser sekundären Vakuole und beginnt mit einem neuen Infektionszyklus in der nächsten Zelle. Mit dieser Strategie kann sich *Listeria* horizontal in einem Gewebe ausbreiten ohne dabei den extrazellulären Raum passieren zu müssen und kann somit erfolgreich der humoralen Immunantwort des Wirtsorganismus entgehen (Flannagan *et al.*, 2009).

Das Cytosol – Eine Nische für intrazelluläre Pathogene:

Die cytosolische Lebensweise schützt die Bakterien nicht nur vor der Immunabwehr, sondern hat noch weitere Vorteile, setzt aber auch gleichzeitig einige Anpassungen voraus. Die Verfügbarkeit von Nährstoffen und die Zusammensetzung der Metabolite im Cytosol ist bisher noch relativ unbekannt. Vermutlich hängt die Komposition des Cytosols auch von dem Zelltypus ab, da interessanterweise verschiedene intrazelluläre Pathogene unterschiedliche Zelltypen präferieren (Chatterjee *et al.*, 2006). Üblicherweise ist jedoch das Cytosol relativ arm an Magnesium-, Natrium-, Eisen- und Kalzium-Ionen bei neutralem pH-Wert (Ray *et al.*, 2009). In eukaryotischen Zellen gibt es schätzungsweise um die 100 verschiedene Kohlenstoff-, Stickstoff-, Phosphor- und Schwefel-Quellen (Brown *et al.*, 2008). Des Weiteren hat das Cytosol ein reduzierendes Milieu (Hwang *et al.*, 1992), auf das *L. monocytogenes* sogar angewiesen ist (Joseph and Goebel; 2007).

Pathogenitätsfaktoren:

Hauptregulator der Virulenzgen-Expression bei *Listeria* ist der Transkriptionsfaktor PrfA (Leimeister-Wächter *et al.*, 1990; Brehm *et al.*, 1996). Die Expression von PrfA selbst ist temperaturreguliert und wird induziert bei 37°C. Die Virulenzgene codieren unter anderem für Integraline, Phospholipasen und Metalloproteasen, die alle wichtig sind zum Entkommen aus der Vakuole. Bemerkenswerterweise reguliert PrfA auch die Expression von Glucose-Phosphat-Transporter (Ripio *et al.*, 1997), so dass ein enger Zusammenhang zwischen Virulenzausprägung und Metabolismus besteht.

Der Metabolismus von L. monocytogenes – State of the Art:

Genomanalysen zufolge sollte *L. monocytogenes* hauptsächlich prototroph sein, da die Gene für die meisten anabolen Stoffwechselwege vorhanden sind (Glaser *et al.*, 2001) und somit eine Vielzahl an verschiedenen Kohlenstoffquellen genutzt werden kann (Mertins *et al.*, 2007).

Über den Metabolismus von *L. monocytogenes* ist bereits dank zahlreicher Isotopolog-Studien schon Einiges bekannt. So konnten Eisenreich *et al.* 2006 anhand NMR-basiertem Isotopolog Profiling demonstrieren, dass in *L. monocytogenes* ein unvollständiger TCA-Zyklus vorliegt. Des Weiteren spielt die Pyruvatcarboxylase (PycA) unter *in vitro*- und *in vivo*-Bedingungen eine entscheidende Rolle bei der Bereitstellung von OAA (Schär *et al.*, 2010), wodurch PycA als möglicher Angriffspunkt für anti-listerielle Wirkstoffe identifiziert werden konnte. Als geeignete Kohlenstoffquellen für *Listeria* haben sich Glucose, Glucose-6-P, aber auch Glycerol und Aminosäuren bewiesen (Eylert *et al.*, 2008), wobei Glucose-6-P gegenüber Glucose bevorzugt wird (Chico-Calero *et al.*, 2002). Unter *in vitro*-Bedingungen ist die Gluconeogenese und die PrfA-Expression hochreguliert bei gleichzeitiger Runterregulierung sowohl der Glycolyse-Enzyme als auch der Biosynthese der verzweigten AS, wenn nur Glycerol als C-Quelle im Medium vorhanden ist (Joseph *et al.*, 2008). Intrazellulär wird der katabolische Abbau von Kohlenstoff heruntergefahren (Joseph *et al.*, 2006; Stoll and Goebel; 2010). Zudem ist *in vivo* der PPP gegenüber der Glycolyse bevorzugt (Chaterjee *et al.*, 2006). Es gibt mindestens 6 verschiedene listerielle AS- und Oligopeptid-Transportsysteme, die zum Überleben in Makrophagen beitragen (Joseph *et al.*, 2006; Schauer *et al.*, 2009). Man geht davon aus, dass *L. monocytogenes* intrazelluläre Peptide als AS-Quelle nutzen kann (Marquis *et al.*, 1993). Transkriptomdaten zeigen, dass Gene für die Biosynthese von Glutamat, Glutamin und Arginin während intraepitheliale Wachstum hochreguliert sind, ähnliches

trifft auch auf Tryptophan und die verzweigten AS Valin, Isoleucin und Leucin zu (Joseph *et al.*, 2006). ^{13}C -Isotopologstudien konnten *in vivo* eine *de novo*-Synthese von Ala, Asp, Glu, Ser, Thr, Val und Gly (in abnehmender ^{13}C -Excess-Werte-Reihenfolge) feststellen. In der selben Studie konnte aber auch gezeigt werden, dass zu mindestens 50% der AS Ala, Asp und Glu aus der Wirtszelle rekrutiert wurden (Eylert *et al.*, 2008). Es wird angenommen, dass während des intrazellulären Wachstums das Auffüllen des TCA-Zyklus (Anaplerose) und die Synthese der verzweigten AS in ständiger Konkurrenz stehen und eine Art Gleichgewicht zwischen diesen beiden metabolischen Wegen besteht (Johnson *et al.*, 2004).

Die Glutaminolyse von Glutamin zu Glutamat (siehe Kapitel I.3.3) ist unter *in vitro*-Bedingungen die Haupt-Stickstoffquelle von *L. monocytogenes* (Fischer; 1999). Bisher ist noch relativ wenig bekannt über den intrazellulären Stickstoff-Metabolismus. Es wird angenommen, dass Ammonium, Arginin und/oder Ethanolamin als N-Quellen herangezogen werden (Buchrieser *et al.*, 2003; Joseph and Goebel; 2007).

Eine Darstellung des rekonstruierten Metabolismus anhand bisher bekannter Daten ist in Abbildung 1.25 zu sehen. Dieses Modell dient der vorliegenden Arbeit als Basis für weitere Infektionsstudien mit *L. monocytogenes* von J774A.1 und primären Makrophagen.

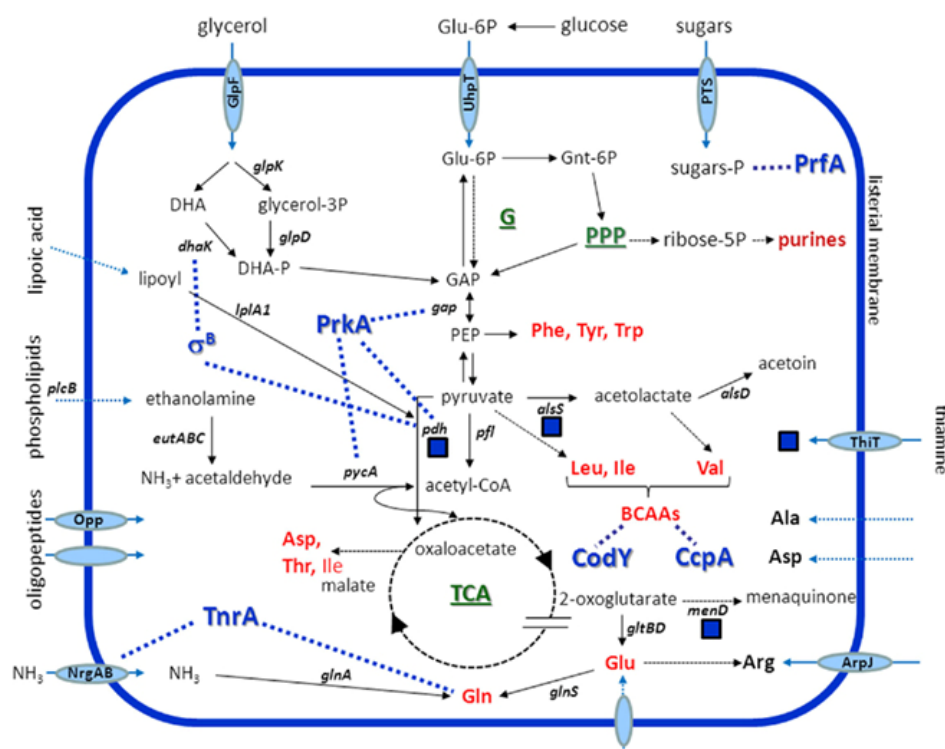


Abbildung 1.25: Modell des intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* in Makrophagen (aus Fuchs *et al.*, 2012). Schlüssel: **blaues Kästchen:** Cofaktor Thiamin; **gestrichelte Linien:** vermutete Interaktion; **blauschattierte Gene:** vermutete Interaktion mit PrkA; **rot:** *de novo* biosynthetisierte AS; **grün:** Stoffwechselwege; **G:** Glycolyse; **PEP:** Phosphoenolpyruvat; **P:** Phosphat.

7. Infektionsmodelle im direkten Vergleich: Primäre versus etablierte Makrophagen

Obwohl die Erforschung des intrazellulären Metabolismus von Bakterien noch relativ neu und auf diesem Feld noch vieles unbekannt ist, gibt es bereits zahlreiche Daten, die zeigen, dass intrazelluläre Pathogene spezifisch an die jeweiligen Wirtszellen angepasst sind. Offenbar haben die krankheitsauslösenden Mikroorganismen ihren Metabolismus nicht nur auf das Angebot an C- und N-Quellen in der Wirtszelle zugeschnitten, sondern auch die Expression ihrer Virulenzfaktoren optimiert. So ist es nicht verwunderlich, dass sich häufig Schnittstellen zwischen der Regulation des Metabolismus und der Expression von Virulenzfaktoren finden (Deutscher *et al.*, 2006; Eylert *et al.*; 2008; Eisenreich *et al.*, 2010). Eine mögliche Schwachstelle dieser vorausgehenden Studien könnte sein, dass die meisten Daten dieser Infektionsexperimente anhand etablierter Zelllinien erhoben wurden. Diese Zelllinien sind typischerweise transformierte Tumor-Zellen, die sich signifikant vom Metabolismus normaler, primärer Zellen unterscheiden.

Metabolismus im Vergleich - Tumorzelle versus normale Körperzelle:

Zur Aufnahme von Glucose stehen die zwei Transportmöglichkeiten über die erleichternden Glucosetransporter der GLUT-Familie und die Na⁺-abhängigen Glucose-Cotransporter der SGLT-Familie zur Verfügung (Wood and Trayhurn, 2003; Zhao and Keating, 2007). In normalen eukaryotischen Zellen findet unter sauerstoffreichen Bedingungen die Verstoffwechslung von Glucose über die Glycolyse oder den Pentose Phosphat Weg statt. Das intermediäre Pyruvat wird dann in die Mitochondrienmatrix transportiert, zu Acetyl-CoA umgewandelt und im nachgeschalteten TCA-Zyklus prozessiert. Die Energiegewinnung in Form von ATP erfolgt über die oxidative Phosphorylierung (OXPHO) über die mitochondrielle Membran. Dabei entstehen circa 36 mol ATP pro mol Glucose.

Seit den Studien von *Otto Warburg* (um 1920) ist bereits bekannt, dass in Tumorzellen ein Shift von normaler Energiegewinnung aus Glucose über OXPHO hin zur „anaeroben Gärung“ unter aeroben Bedingungen stattfindet. Dabei wird Pyruvat zum Endprodukt Lactat und nicht vorwiegend zu Acetyl-CoA abgebaut (Warburg; 1956), so dass die Energiegewinnung über TCA-Zyklus und OXPHO herunterreguliert ist (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007; Tennant *et al.*,

2007, Locasale and Cantley, 2010), womit lediglich eine Energiebilanz von 2 mol ATP pro mol Glucose erreicht wird. Die anaerobe Glycolyse ist zwar weniger effizient, aber sie kann ATP schneller bereitstellen (Pfeiffer *et al.*, 2001). Da Tumorzellen einen erhöhten Energiebedarf decken müssen, bevorzugen sie anstelle des effizienten Weges die schnelle Art der ATP-Gewinnung. Dieser sogenannte „*Warburg Effekt*“ (Warburg, 1956) führt zu einer vermehrten Aufnahme von Glucose. Ein schematischer Vergleich der Glucose-Verstoffwechslung zwischen normalen Zellen und entarteten Tumorzellen findet sich in Abbildung 1.26 und 1.27.

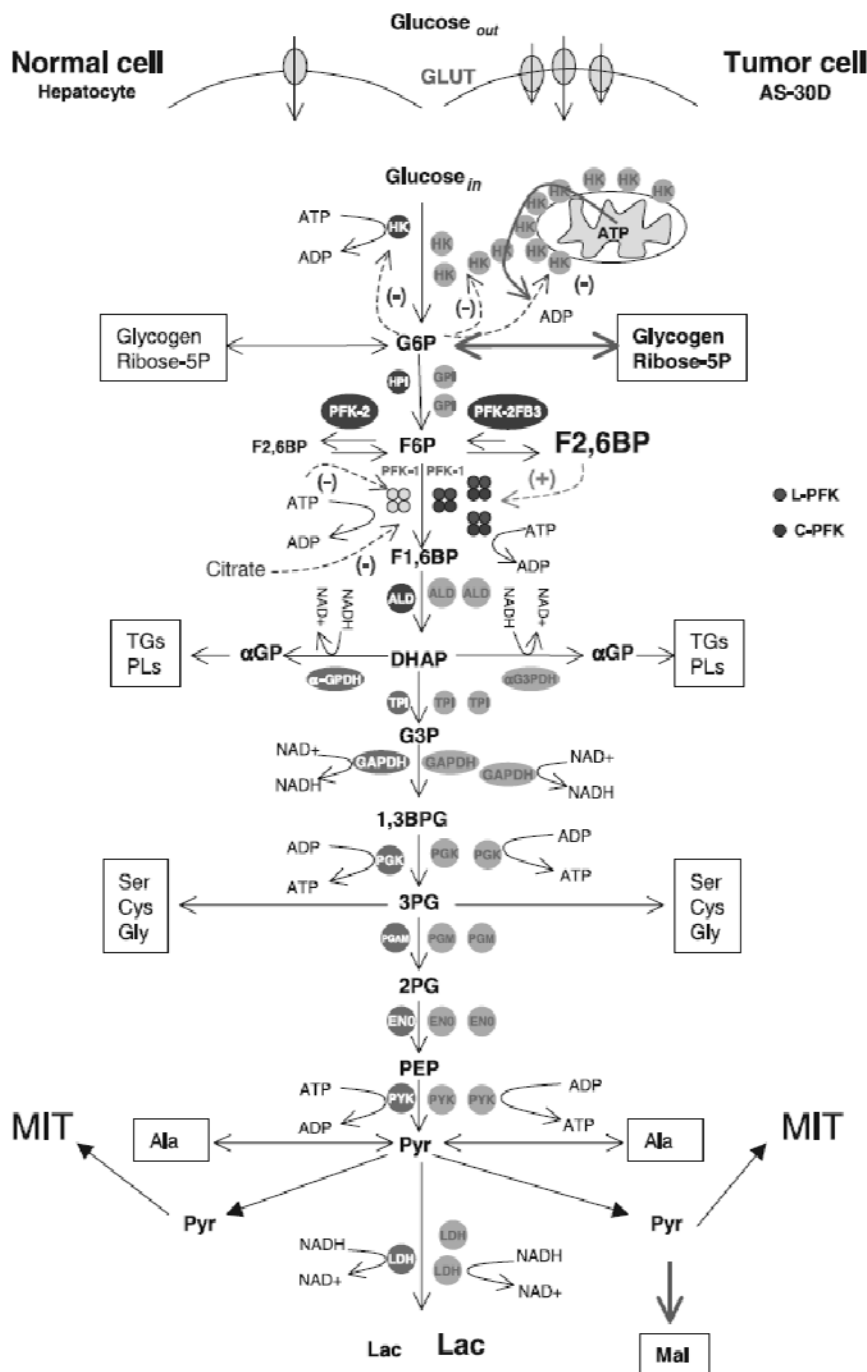
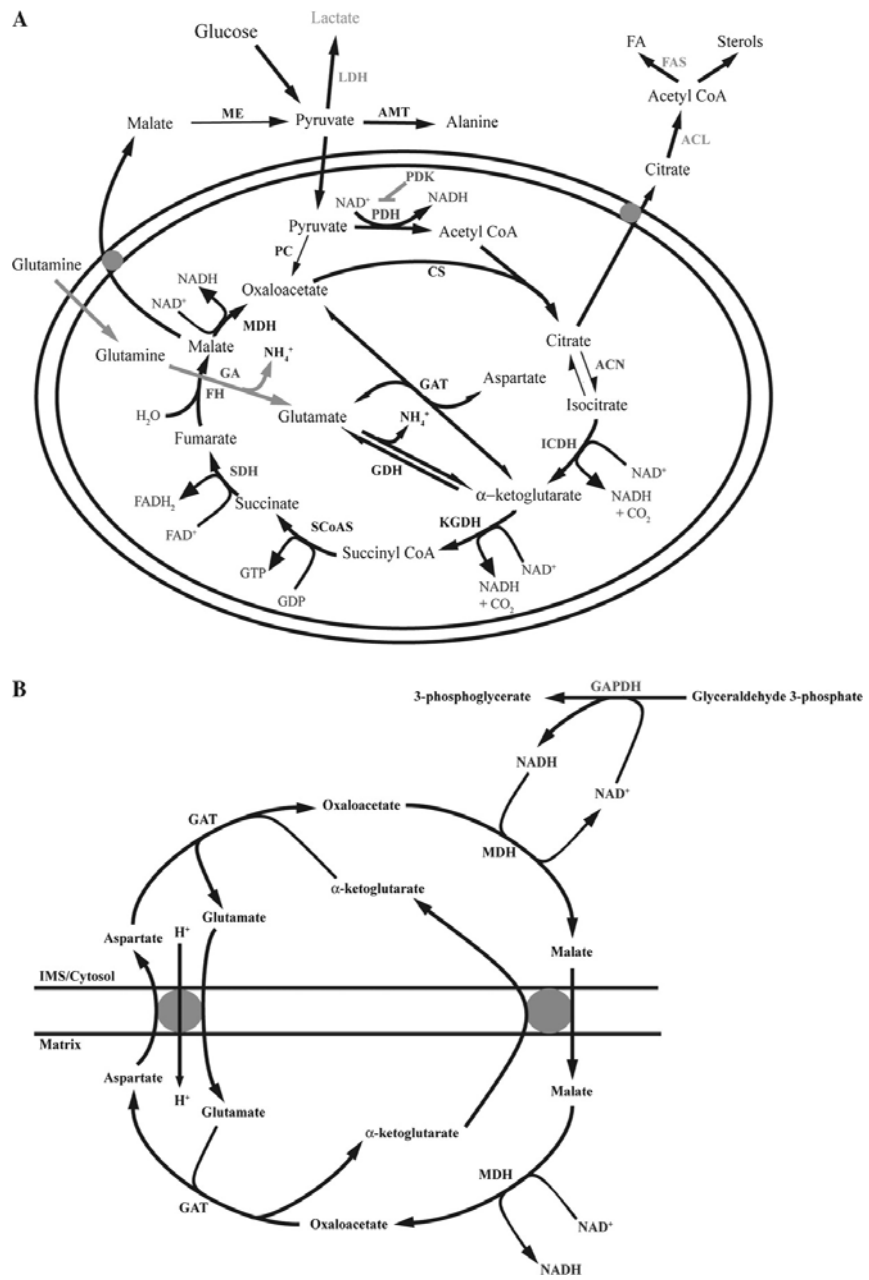


Abbildung 1.26: Vergleich des Abbaus von Glucose in normalen Zellen und Tumorzellen (aus Moreno-Sánchez *et al.*, 2007). Abkürzungen: **HK II:** Hexokinase II; **PFK-1:** Phosphofruktokinase type 1; PFK-2: type 2; **PDH:** pyruvate dehydrogenase complex; **LDH:** lactat dehydrogenase; **In Tumorzellen:** HK II ↑; PFK-1 und PFK-2FB3 (Isoform zu PFK-2) ↑.

Abbildung 1.27: **A:** TCA-Zyklus in Tumorzellen; **B:** Malat/Asp-Shuttle (aus Tennant *et al.*, 2009). *hellgrau:* aktiviert; *dunkelgrau:* reprimiert; **ACL:** Adenosin-triphosphat Citrat Lyase; **ACN:** Aconitase; **AMT:** Aminomethyl Transferase; **CS:** Citrat Synthase; **FAD:** Flavin Adenine Dinucleotid; **FAS:** Fatty Acid Synthase; **GA:** Glutaminase; **GAT:** Glutamate Acetyltransferase; **GDH:** Glutamate Dehydrogenase; **GDP:** Guanosine Diphosphate; **GTP:** Guanosine Triphosphate; **ICDH:** Isocitrate Dehydrogenase; **IMS:** Intermembrane Space; **KCDH:** α -Ketoglutarate Dehydrogenase; **MDH:** Malate Dehydrogenase; **ME:** Malic Enzyme; **PC:** Pyruvate Carboxylase; **SCoAS:** Succinyl CoA Synthase.



Zusätzlich ist in Tumorzellen auch die Glutaminolyse verstärkt (vergleiche Abbildung 1.29), somit ist auch die Aufnahme von Glutamin hochreguliert (Feron; 2009). Die Glutaminolyse ist besonders wichtig, da sie eine anaplerotische Funktion erfüllt. Sie deckt den Bedarf an α -Ketoglutarat im mitochondriendalen TCA-Zyklus, das zu OAA verstoffwechselt wird, welches wiederum zu einer verstärkten Citrat Synthase führt (DeBerardinis *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2011). Das entstehende Citrat kann über die Mitochondrien-Membran ins Cytosol transloziert werden. Dort wird es von der ATP-abhängigen Citrat Lyase (ACL) zu cytosolischem Acetyl-CoA und OAA – beide wichtig für die Synthese von AS und Fettsäuren

bzw. Lipiden – umgewandelt.

Betrachtet man die Tumorgenese und die daraus resultierenden metabolischen Anforderungen, die eine Tumorzelle leisten muss, ist dieser Switch im Stoffwechsel nachvollziehbar. Für die „Entartung“ einer normalen Zelle hin zur Tumorzelle sind 7 Stufen notwendig, von denen die meisten direkt verknüpft sind mit metabolischen Veränderungen (Abbildung 1.29; Kroemer and Pouyssegur; 2008). Während der frühen Expandierung von Tumorzellen im Gewebe kommt es zu hypoxischem Stress, dies führt zur Hochregulierung der Expression von HIF (Hypoxia-Induzierbarer Faktor) (Hsu and Sabatini; 2008). HIF stimuliert die Angiogenese durch diverse Faktoren, aber hauptsächlich durch VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). HIF ist aber nicht alleine für die metabolischen Veränderungen verantwortlich. Vielmehr ist dies durch ein ganzes Set an aktivierten Oncogenen in Kombination mit Verlusten der Tumorsuppression verursacht (Abbildung 1.28).

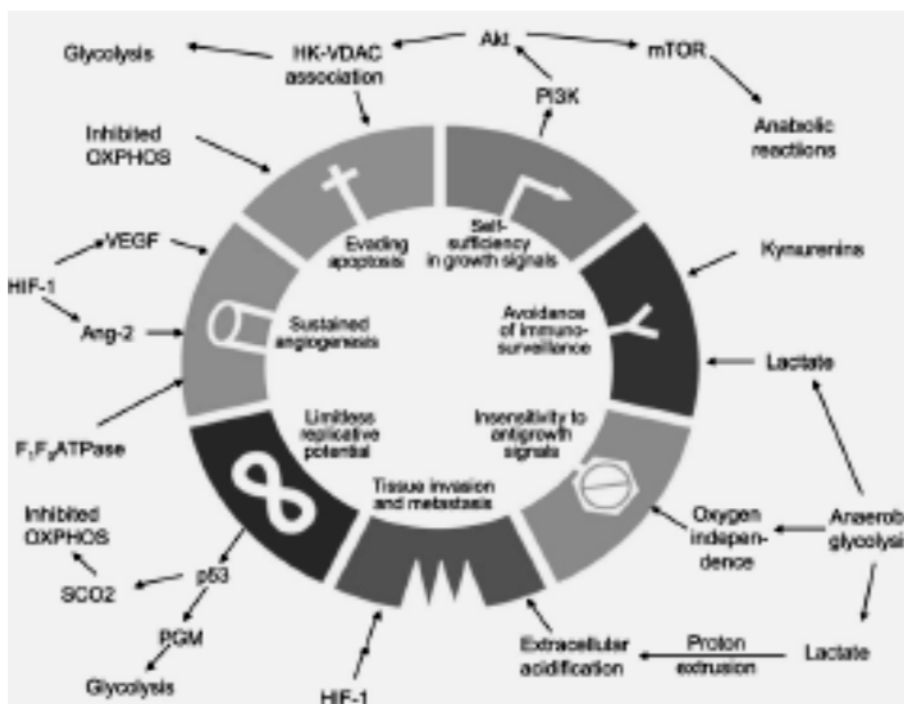


Abbildung 1.28: Die 7 Stufen zur Tumorgenese und deren Verknüpfung mit dem Metabolismus (Kroemer and Pouyssegur; 2008). Ang-2: Angiopoietin-2; GLUT: Glucose Transporter; HIF: Hypoxie-Induzierbarer Faktor; HK: Hexokinase; OXPHOS: oxidative Phosphorylierung; PGM: Phosphoglycerat Mutase; PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase; SCO2: Synthesis of Cytochrom C oxidase; VDAC: Voltage-dependent Anion channel; VEGF; Vascular Endothelial Faktor.

Neben HIF-1 gibt es noch andere Regulatoren, wie z.B. *Myc* (Gordan *et al.*, 2007; Dang *et al.*, 2008; Cervený, 2012) oder den Verlust an *p53* (*Kontrolle der Apoptose*) (Vousden and Ryan, 2009; Puzio-Kuter, 2011), deren Mutation entscheidend ist für die Tumorentstehung. Zudem spielen auch Veränderungen in AS-Sensoren, wie z.B. mTORC1 (Dunlop and Tee, 2009) neben anderen Nährstoffsensoren eine wichtige Rolle im Tumormetabolismus.

Immunantwort – Reaktion der Wirtszelle auf Infektion:

Oben genannte Faktoren haben in der normalen Zelle wichtige Funktionen zur Regulation des Metabolismus. Bei einer Infektion werden v.a. in den Zellen der Immunabwehr (wie z.B. Makrophagen), neben Cytokinen wie z.B. IFN- γ (Whitmarsh and Hunter; 2008) auch p53, Myc und HIF aktiviert, was in einer Umprogrammierung des Metabolismus der Wirtszelle resultieren könnte. Ausgelöst wird die Immunantwort durch „pathogen associated molecular pattern“ (PAMPs) (Boldrick *et al.*, 2002; Nau *et al.*, 2002; Nau *et al.*, 2003; Sansonetti, 2011), wie z.B. durch Oberflächenproteine wie Lipopolysaccharide (LPS; Lipid A) von gram-negativen Bakterien, Peptidoglycan, oder Lipoteichonsäuren von gram-positiven Bakterien (Aderem and Ulevitch, 2000). Die PAMPs aktivieren in der Regel den Transkriptionsfaktor NF- κ B, welcher in Makrophagen die Expression von immunmodulatorischen Proteinen und Peptiden induziert (Bauerle and Henkel, 1994).

Eine ganz neue Sichtweise auf die Ursachen von metabolischen Erkrankungen, wie z.B. Diabetes Typ 2 oder Fettsucht liefern Burcelin *et al.* (2012). Wie aktuelle Studien belegen, können eine genetische Disposition und Umweltfaktoren allein nicht die Häufung solcher Krankheiten in der heutigen Gesellschaft erklären. Vielmehr ist dies ein Resultat aus Veränderungen des bakteriellen Milieus durch eine fettreiche Nahrung, welches zu häufigeren Erkrankungen des Darmtraktes durch Infektion mit pathogenen Bakterien führt. Diese lösen wiederum eine Immunantwort aus, was in einem veränderten Metabolismus der Zielzelle endet. Durch chronische Exposition mit pathogenen Bakterien kommt es so durch permanente Beeinflussung des Metabolismus der Darmzellen unter Anderem zu Insulinresistenzen (Burcelin *et al.*, 2012).

Wie dieses aktuelle Beispiel demonstriert, ist es besonders wichtig die Interaktionen zwischen Wirtszelle und pathogenem Bakterium zu betrachten und dabei speziell die Modifikationen im Wirtszellmetabolismus zu beleuchten.

Es ist naheliegend, dass Tumorzellen – folglich etablierte Zelllinien, wie Caco-, HeLa- oder J774A.1-Zellen eingeschlossen – anders auf eine Infektion reagieren, als primäre, unmodifizierte Zellen, da diese bereits in den möglichen Angriffspunkten von Virulenzfaktoren dereguliert sind. Um diese Hypothese zu testen, wird in vorliegender Arbeit das bereits etablierte Infektionsmodell J774A.1 (eine murine Mausmakrophagen-Tumorzelllinie) mit infiziert *L. monocytogenes* mit Infektions-experimenten von primären Mausmakrophagen mit *L. monocytogenes* verglichen.

8. Metabolomics und Metabolit-Profilung

“The [metabolic] profile will give you knowledge and information rather than just data.”

(Bruce Hammock,
University of California, Davis; Schmidt, 2004)

“Genomics and proteomics tell you what might happen, but metabolomics tells you what actually *did* happen.”

(Bill Lasley
University of California, Davis; Schmidt, 2004)

Ein weiteres wichtiges Einsatzgebiet der GC/MS-Analytik und der NMR-Spektroskopie ist das Metabolit-Profilung (Dettmer *et al.*, 2007; Titziani *et al.*, 2009). Neben der Charakterisierung von Phänotypen (Ausprägung aller Merkmale im Zusammenspiel) durch Proteom-, Genom- und Transkriptomanalysen liefert die Qualifizierung und Quantifizierung der Metabolite (= das Metabolom; Oliver *et al.*, 1998) einer Zelle, bzw. von Zelltypen (Verwaest *et al.*, 2011) oder sogar von ganzen Organismen unter klar definierten Bedingungen einen tieferen Einblick in den Informationsfluss vom Gen zum Protein und dessen dynamische Vernetzung (Abbildung 1.29). Hervorzuheben ist z.B. das Vorkommen von sogenannten *stillen Phänotypen*, die eine Deletion im Genom tragen und trotzdem eine gleiche Wachstumskurve wie der Wildtyp (WT) aufweisen. In diesem Falle kann das komplexe Zusammenspiel an Genen eine Deletion in einem Gen „maskieren“, also ausgleichen (Griffin, 2004). Des Weiteren werden viele Gene nicht auf transkriptioneller Ebene kontrolliert und nicht jedes Gen codiert ein Protein, so dass eine Analyse des Phänotypen neben Proteomics-, Genomics- und Transkriptomicsdaten auch die Daten des relativ neuen Feldes der Metabolomics-Studien erfordert.

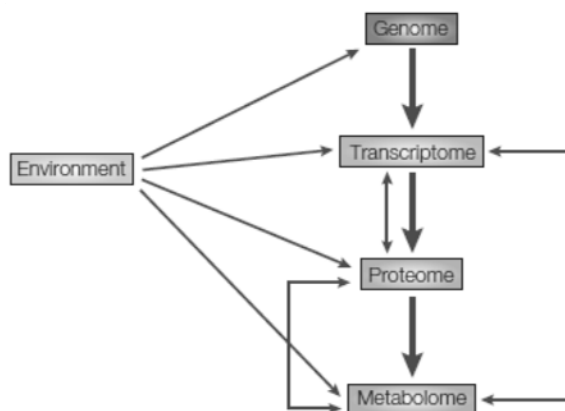


Abbildung 1.29: Das biologische Netzwerk der 4 „-ome“ Domänen (aus Griffin and Shockcor, 2004).

Das Metabolom ist somit dem resultierenden Phänotyp am nächsten, da es das System zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt als das Genom, Transkriptom oder Proteom definiert

(Urbanczk-Wochaniak *et al.*, 2003). Das Gleichgewicht der Metabolite ist ein sehr empfindliches und dynamisches System, das sehr stark von Umweltfaktoren, wie z.B. dem Tag-Nacht-Rhythmus oder der Nährstoffzufuhr beeinflusst wird (Green *et al.*, 2008; Liebeke *et al.*, 2011).

In der Praxis haben sich über die Jahre mehrere Strategien etabliert (siehe Tabelle 1.4). Die Methode der Wahl in dieser Arbeit ist das Metabolit-Profiling, der Fokus liegt hierbei auf der Extraktion der Methanol-löslichen Metabolite.

Tabelle 1.4: Metabolomics-Strategien (nach Dettmer *et al.*, 2007).

Strategie	Definition
<i>Metabolomics:</i>	Analyse aller in einer Probe vorkommenden Metabolite
<i>Metabolic Profiling:</i>	gezielte Analyse einer Gruppe von Metaboliten (z.B. Aminosäuren)
<i>Metabolic Fingerprinting:</i>	Klassifizierung von Proben ohne Identifizierung einzelner Metabolite
<i>Flux Analysis:</i>	Erfassung dynamischer Zusammenhänge (durch Messung von Intermediaten)

Die Wahl des Extraktionsmittels und der Vorgehensweise ist der ausschlaggebende Faktor dafür, welche Art von Metabolite und in welcher Konzentration diese aus der Zelle extrahiert werden. Die große Herausforderung stellen neben der Diversität der Metabolite – bekannt sind mittlerweile 733 verschiedene Metabolite in *Saccharomyces cerevisiae* (Famili *et al.*, 2003), im Pflanzenreich sogar bis zu 200.000 (Fiehn *et al.*, 2001) – auch die sehr großen Konzentrationsunterschiede einzelner Metabolite in der Dimension von über neun Potenzen (von pM bis hin zu mM) dar (Dunn *et al.*, 2005).

9. Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, retrospektiv wichtige Schnittstellen zwischen aktiven Stoffwechselwegen und Virulenzfaktoren in professionell-fakultativen Pathogenen zu rekonstruieren und identifizieren, sowie die bereits etablierte und universell einsetzbare Methode des „Isotopolog-Profilings“ (Eisenreich *et al.*, 1993, Eylert, 2009), speziell in Hinsicht auf spezifische Metabolite der unterschiedlichen pathogenen Bakterien zu erweitern. Dabei kommen als bioanalytische Methoden sowohl NMR-Spektroskopie als auch GC/MS-Analytik zum Einsatz um Isotopolog- und Metabolit-Profile zu gewinnen.

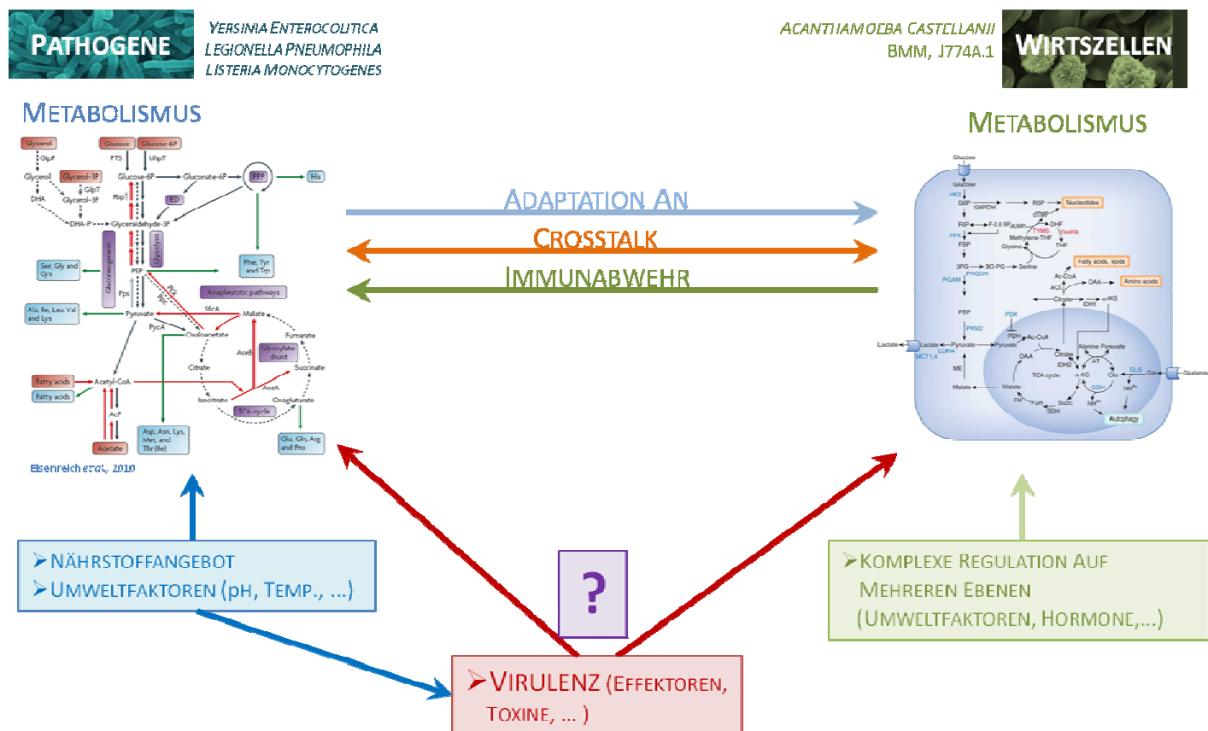


Abbildung 1.30: Zielsetzung – Identifizierung von Schnittstellen zwischen Metabolismus und Virulenz pathogener Bakterien.

Die Methodik des Isotopolog-Profilings soll neue Erkenntnisse über die Physiologie von *Yersinia enterocolitica* erbringen. Im Speziellen sollen dabei die $^{13}\text{CO}_2$ -fixierende Eigenschaft von PEPC, sowie die Nutzung von Glutamin als Vorstufe für proteinogene Aminosäuren betrachtet werden. Im besonderen Fokus stehen dabei die Synthesewege der Effektorproteine von *Y. enterocolitica* (YOPS). Anhand dieser neuen Erkenntnisse soll eine Basis zur Entwicklung neuer antiyersinieller Medikamente geschaffen werden.

Durch den Einsatz verschiedener ^{13}C -markierter Substrate soll der *in vitro*-Metabolismus von *Legionella pneumophila* noch weiter charakterisiert werden. Dabei soll mit Einsatz von

positionell markierter Glucose die Art des Kohlenhydratmetabolismus identifiziert werden. Des Weiteren wird getestet, welche Rolle die eukaryoten-ähnliche Glucoamylase A im Stärkeabbau inne hat und zu welchem Grad der Fettsäuremetabolismus in der Produktion des intrazellulären Speicherpolymers PHB beiträgt. Aufgeklärt werden soll zudem die Rolle von Glucose und Serin in den unterschiedlichen Lebensphasen von *L. pneumophila*. Anhand Infektionsstudien von *Acanthamoebae castellanii* mit *L. pneumophila* soll der *in vivo*-Metabolismus von *Legionella* geklärt werden.

Durch die Analyse von vergleichenden Infektionsstudien mit ^{13}C -markierten Substraten im Infektionsmedium soll getestet werden, ob sich primäre Makrophagen hinsichtlich ihrer metabolischen Antwort auf eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* von transformierten, neoplastischen Zelllinien unterscheiden. Des Weiteren soll anhand dieser *in vivo*-Infektionsmodelle beleuchtet werden, ob eine listerielle Manipulation des primären Stoffwechsels in beiden Wirtszellsystemen geschieht.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Materialien

1.1. Geräte

Fraktionssammler GC/MS	LKB (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Gas Chromatograph GC-2010; Mass Spectrometer QP-2010 Plus; Auto Injektor AOC-20i; Auto Sampler AOC-20s; Säule Equity TM-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm Filmdicke (SUPELCO, Bellafonte, PA, USA); Pumpe RV-3 (Edwards)
Gefriertrockner	Alpha 1-4 (Firma Christ, Osterode, Deutschland); Vakuumpumpe RC 5 (Vakuubrand GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
Glasperlen	Glass beads: 0,25 - 0,55 mm (Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland)
Inkubatorhaube für Tischschüttler	Certomat R (Firma B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland)
Magnetrührer	IKAMAG RCT (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) + Alublock aus Institutswerkstatt
NMR	AV360 (Avance-I-Konsole Magnet: Ultrashield 360 MHz), AV500 (Avance-I-Konsole; Magnet: Ultrashield 500 MHz; Probe head: SEI 500 S2 5 mm; inverse Z-gradient), AV500C (Avance-III-Konsole Magnet: Ultrashield PLUS 500 MHz Probe head: 5 mm CPQNP ¹ H/ ¹³ C/ ³¹ P/ ¹⁹ F/ ²⁹ Si, Z-gradient), DRX 500 (DRX Konsole; Magnet: Cryomagnet BZH 500 MHz) (BRUKER, Karlsruhe, Deutschland)
Ribolyser	Hybaid (Kalletal, Deutschland)
Rotationsverdampfer	Membran-Vakuumpumpe (Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, Deutschland); Rotavapor-Re (Büchi, Flawil, Schweiz) + Wasserbad (Kotterman KG, Hänigsen, Deutschland)
Thermostat	IKATRON ETS-D4 fuzzy (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland)
Tischschüttler	Certomat R (Firma B. Braun Biotech International, Melsungen, Deutschland)
Tischzentrifuge	Centrifuge 5412 (Eppendorf Gerätebau Netheler Hinz GmbH, Oldenburg in Holstein, Deutschland)
Trockenschrank	Wärmeschrank E28 (Firma Binder, Tuttlingen, Deutschland)
Ultraschallbad	USC 300T (VWR, Leuven, Belgien)
Vortex-Schüttler	Reax 2000 (Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim, Deutschland)
Waage (1 mg - 120 g)	SBA 32 (Scaltec Instruments, Heiligenstadt, Deutschland)

Waage (5 g - 2,22 kg) sartorius laboratory (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland)

1.2. Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland) und Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen. Die für Extraktionen eingesetzten Lösungsmittel besitzen mindestens HPLC-Reinheitsgrad.

1.3. Markierte Verbindungen

[1,2- ¹³ C ₂]Glucose	Cambridge Isotope Laboratories (Andover, USA)
[U- ¹³ C ₃]Serin	ISOTEC Inc. (Miamisburg, USA)
[U- ¹³ C ₅]Glutamin	ISOTEC Inc. (Miamisburg, USA)
[U- ¹³ C ₆]Glucose	ISOTEC Inc. (Miamisburg, USA)
CDCl ₃	Euriso-Top (Gif sur Yvette Cedex, Frankreich)
D ₂ O (99,0 Atom-% ² H)	Firma Merck (Darmstadt, Deutschland)
NaH ¹³ CO ₃	ISOTEC Inc. (Miamisburg, USA)
U- ¹³ C-Fettsäuren	ISOTEC Inc. (Miamisburg, USA)
U- ¹³ C-Stärke	ISOTEC Inc. (Miamisburg, USA)

1.4. Verwendete Software

Adobe Illustrator CS4	Adobe Systems GmbH (München, Deutschland)
ChemDraw Ultra 12.0	CambridgeSoft (Cambridge, USA)
GC/MS Postrun	GC/MS Solution Release 2.50 SU3 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan)
MestreNova	MestreLab (Santiago de Compostela, Spanien)
Microsoft Office 2007	Microsoft (Unterschleißheim, Deutschland)
NMR Suite 5.1	ChenomX (Edmonton, Canada)

2. *Yersinia enterocolitica*

Sowohl die Anzucht der Bakterien, als auch die Durchführung der Markierungsexperimente fand am Robert-Koch-Institut in Wernigerode in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Gottfried Wilharm, insbesondere durch Frau Julia Hofmann statt.

2.1. Verwendete *Yersinia enterocolitica* Stämme

WA-314 **Wildtyp** (WT): WAP, Serotyp O:8, Biotyp 1B (Heesemann and Laufs; 1983)

Δ yscM1 (Dittmann *et al.*, 2007) Primer:
5'-CATATGAAAATCAATACTCTTCAATCG-3' und
5'-GTCGACTCAGCCGTCAGCCG-3' (Schmid *et al.*, 2009)

Δ yscM2 (Dittmann *et al.*, 2007) Primer:
5'-CATATGGGGAGCATTATGAAAAATAAACG-3'
und 5'-GTCGACTTAAAGCTTTTGCATTTTCCGTGTC-3'
(Schmid *et al.*, 2009)

WA-314 ohne pYV **Δ ppc**: Serotyp O:8, Biotyp 1B (Wilharm *et al.*, 2004) Primer:
5'-GAATTCAATGAACGAACAATATTCCGCAATGC-3' und
5'-GCCGCCGCTTAGCCGGTATTACGCATACCTG-3'

EcoRI-NotI-Schnittstelle (Schmid *et al.*, 2009)

2.2. Verwendete Kulturmedien

2x YT-Medium:

1. 900 mL H₂O dest. in 1 L Messkolben
2. Zugabe von 16 g/L Trypton, 10 g/L Hefeextrakt, 5 g/L NaCl unter Rühren
3. Einstellen auf pH 7 durch Zugabe von ca. 0,2 mL 1M NaOH; auf Endvolumen von 1 L auffüllen
4. 15 min bei 121 °C autoklavieren

F12-Medium (pH 7,4):

8,56 g/L F12-Powder (siehe Tabelle 2.1)

0,146 g/L L-Glutamin

1,802 g/L D-Glucose

0,110 g/L NaHCO₃

add. auf 1 L mit H₂O bidest. und steril filtrieren

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des F12-Powder zur Anzucht von *Yersinia enterocolitica*.

F12-Powder Mixture	
Zusammensetzung	Konzentration (mg/L)
Aminosäuren	
Glycin	7,5
L-Alanin	8,9
L-Argininhydrochlorid	211
L-Asparagin (freie Base)	13
L-Asparaginsäure	13,3
L-Cysteinhydrochlorid	36
L-Glutaminsäure	14,7
L-Glutamin	146
L-Histidinhydrochlorid-H ₂ O	21
L-Isoleucin	4
L-Leucin	13,1
L-Lysinhydrochlorid	36,5
L-Methionin	4,5
L-Phenylalanin	5
L-Prolin	34,5
L-Serin	10,5
L-Threonin	11,9
L-Tryptophan	2,04
L-Tyrosin	5,4
L-Valin	11,7
Vitamine	
Biotin	0,0073
Cholinchlorid	14
D-Calciumpantothenat	0,5
Folsäure	1,3
Niacinamid	0,036
Pyridoxinhydrochlorid	0,06
Riboflavin	0,037
Thiaminhydrochlorid	0,3
Vitamin B12	1,4
i-Inositol	18

F12-Powder Mixture	
Zusammensetzung	Konzentration (mg/L)
Salze	
Calciumchlorid	44
Kupfersulfat	0,0025
Eisensulfat	0,834
Magnesiumchlorid	122
Kaliumchlorid	223,6
Natriumbicarbonat	1176
Natriumchlorid	7599
Natriumphosphat dibasisch	142
Zinksulfat	0,83
Andere Zusätze	
Hypoxanthin	4
Linolsäure	0,084
Liponsäure	0,21
Phenolrot	1,2
Putrescin x 2 HCl	0,161
Natriumpyruvat	110
Thymidin	0,7

2.3. Anzucht und Markierungsexperimente mit *Y. enterocolitica*

Die Herstellung der Mutanten $\Delta yscM1$, $\Delta yscM2$ und Δppc und die Anzuchten erfolgen in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Wilharm (RKI-Wernigerode) wie in Schmid *et al.* (2009) beschrieben.

Für die Übernachtskultur werden 20 mL 2xYT Medium angeimpft und im Schüttler bei 27°C über Nacht inkubiert. Zusätzlich erfolgt bei den Mutanten eine Addition von Kanamycin bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/mL. Am darauffolgenden Tag werden zwei Waschschrte mit 20 mL F12 Zellkulturmedium (mit unmarkiertem NaHCO₃, Glutamin und Glucose versehen) durchgeführt. Im Anschluß nach jedem Reinigungsschritt wird bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die Pellets werden nun in 5 mL F12-Medium (unmarkiert) resuspendiert.

Für die Vorkulturen wird eine einheitliche optische Dichte OD₅₉₅ von 0,2 eingestellt mit unmarkiertem F12-Medium (supplemetiert mit 50 mM HEPES) und für 2 ¼ h bei 27°C und 190 rpm inkubiert. Um die Sekretion von „Yersinia Outer Proteins“ (YOPS) in der frühen exponentiellen Wachstumsphase zu unterbinden, erfolgt eine Inkubation von 1,5 h bei 37°C mit 0,2 mM CaCl₂. Durch die erhöhte Temperatur von 37°C wird sowohl die Synthese des

Typ-III-Sekretionssystem, als auch die Sekretion von YOPS (letztere wird jedoch durch die hohe CaCl_2 Konzentration im Medium gehemmt) hochreguliert (Schmid *et al.*, 2009).

Für das Markierungsexperiment werden die Vorkulturen bei 10 000 rpm und 4°C zentrifugiert. Anschließend werden die Bakterienpellets in F12-Medium resuspendiert. Es werden verschiedene Experimente angesetzt, die sich sowohl in der CaCl_2 und EGTA Konzentration, als auch in der Zugabe der markierten Vorstufen ($[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$, $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ bzw. $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$) unterscheiden (siehe Tabelle 2.2).

Tabelle 2.2: Übersicht der Markierungsexperimente mit *Y. enterocolitica*.

Versuche mit CaCl_2					
35 mL	F12-Medium	35 mL	F12-Medium	35 mL	F12-Medium
50 mM	HEPES	50 mM	HEPES	50 mM	HEPES
0,2 mM	CaCl_2	0,2 mM	CaCl_2	0,2 mM	CaCl_2
14 mM	$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$	10 mM	$[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$	2 mM	$[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$
Versuche mit EGTA					
35 mL	F12-Medium	35 mL	F12-Medium	35 mL	F12-Medium
50 mM	HEPES	50 mM	HEPES	50 mM	HEPES
5 mM	EGTA	5 mM	EGTA	5 mM	EGTA
10 mM	MgCl_2	10 mM	MgCl_2	10 mM	MgCl_2
14 mM	$\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$	10 mM	$[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$	2 mM	$[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$

Das Markierungsexperiment läuft für 2 h bei 37°C im Schüttler (190 rpm). Die Experimente mit CaCl_2 werden danach geerntet, abzentrifugiert (bei 10.000 rpm und 4°C), autoklaviert und bei -20°C für den Transport gelagert.

Bei den Versuchen mit EGTA ist eine verstärkte Sekretion von YOPS ins Medium vorhanden (Schmid *et al.*, 2009), so können auch die YOPS für die Analytik gewonnen werden. Die Abtrennung von bakteriellem Zellprotein und YOPS erfolgt durch differentielle Zentrifugation bei 1.000 rpm und 4°C für 10 min. Das autoklavierte Pellet wird bei -20°C bis zum Transport nach Garching eingelagert. Der Überstand wird ein zweites Mal zentrifugiert (1.000 rpm, 4°C). Anschließend werden 36 mL aus dem Überstand entnommen. Die Fällung der YOPS erfolgt durch Zugabe von 4 mL Trichloressigsäure über Nacht bei 4°C. Abschließend werden die Yops durch Zentrifugation bei (10.000 rpm bei 4°C für 30 min) aufkonzentriert und zweimal mit Aceton gewaschen (jeweils abzentrifugiert bei 10.000 rpm, 4°C, 30 min). Das trockene Pellet wird autoklaviert und analysiert.

3. *Acanthamoeba castellanii*

Die Anzucht und die Markierungsexperimente von *A. castellanii* wurden am Robert-Koch-Institut Berlin von der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Klaus Heuner, insbesondere von Frau Dr. Vroni Herrmann und Frau Dr. Eva Schunder durchgeführt.

3.1. Verwendete Amöbenkultur

Als Infektionsmodell für *L. pneumophila* wurde der *Acanthamoeba castellanii*-Neff-Stamm mit der American Type Culture Collection (ATCC) Nummer 30100 verwendet.

3.2. Verwendete Kulturmedien

Tabelle 2.3: Zusammensetzung PYG-Amöben-Kulturmedium.

PYG ATCC712	
Na ₃ -Citrat	1 g
Proteose Pepton	20 g
Hefeextrakt	1 g
0,4M MgSO ₄ •7H ₂ O	10 mL
0,25M Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	10 mL
0,25M KH ₂ PO ₄	10 mL
0,05M CaCl ₂ •2H ₂ O	8 mL
ad H ₂ O _{bidest}	940 mL
autoklavieren und abkühlen lassen	
0,005M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ •6H ₂ O (sterilfiltriert)	10 mL
2M Glucose (sterilfiltriert)*	50 mL

*für Markierung siehe Text Abschnitt (II.4.4.)

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Infektionspuffers für *A. castellanii* mit *L. pneumophila* (Eylert *et al.*; 2010).

Infektionspuffer	
Na ₃ -Citrat	1 g
0,4M MgSO ₄ •7H ₂ O	10 mL
0,25M Na ₂ HPO ₄ •7H ₂ O	10 mL
0,25M KH ₂ PO ₄	10 mL
0,05M CaCl ₂ •2H ₂ O	8 mL
ad H ₂ O _{bidest}	952 mL
0,005M Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ •6H ₂ O (sterilfiltriert)	10 mL

3.3. Anzucht und Markierung von *A. castellanii*

In vitro ¹³C-Markierung von *A. castellanii* (vormarkiert)

Für einen aussagekräftigen Vergleichswert zu *in vivo*-Infektionsstudien mit *L. pneumophila* ist es notwendig, *A. castellanii* auch vormarkiert (mit [U-¹³C₆]Glucose) anzuzüchten. Vorkulturen für den Markierungsversuch werden in zwei mittleren Zellkulturflaschen (a 40 mL) für drei Tage bei RT in PYG ATCC712 (unmarkiert) inkubiert.

Die Hauptkulturen mit einem Volumen von 50 mL werden 1 : 10 aus den Vorkulturen angeimpft. Die Inkubation erfolgt für 3 d bei RT. Für die Markierung wird das PYG-Medium abgeschüttet, 2-mal mit 10 mL Infektionspuffer gewaschen und 50 mL mit 2 g/L (10 mM) [U-¹³C₆]Glucose supplementierter Infektionspuffer auf die Zellen gegeben. Die Amöben werden für 24 h bei 37°C liegend kultiviert, anschließend werden sie 2-mal mit Infektionspuffer gewaschen. Nachdem man die Zellen 4 h bei 37°C adhären hat lassen (entspricht der 2 h Adhäsion und der 2 h Infektion im Infektionsexperiment), wird erneut mit unmarkiertem Infektionspuffer gewaschen. Es erfolgt eine weitere Inkubation in 50 mL unmarkiertem Infektionspuffer bei 37°C für 22 h. Die Zellernte erfolgt durch Zugabe von Natriumazid (Endkonzentration 10 mM), durch das die Amöben von der Kulturflaschenoberfläche werden. Die Zellsuspension wird in Falcons überführt und bei 1.000 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Zellpellet wird mehrfach mit Infektionspuffer gewaschen und autoklaviert.

4. *Legionella pneumophila* Paris

Die Anzucht von *Legionella pneumophila* Paris und die Durchführung der Markierungsexperimente geschah am Robert-Koch-Institut Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Klaus Heuner, vor allem durch Frau Dr. Vroni Herrmann und Frau Dr. Eva Schunder.

4.1. Verwendete Stämme von *L. pneumophila* Paris

Tabelle 2.5: Verwendete *L. pneumophila* Stämme.

Stamm	Beschreibung / Deletion	Quelle
<i>LpP WT</i>	Virulentes Patientenisolat, Serogruppe 1	Cazalet <i>et al.</i> , 2004
<i>LpP Δzwf</i>	Deletion in Gen <i>lpp0483</i> (<i>zwf</i> = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase)	Heuner <i>et al.</i> , 2002; Brüggemann <i>et al.</i> , 2006; Eylert <i>et al.</i> , 2010
<i>LpP Δketo</i>	Deletion in Gen <i>lpp1555</i> (acetyl-CoA-C-acetyltransferase) Forward Primer: 5'-ACTGGTACCAACGTATGACATGTTACG-3' Reverse Primer: 5'-TATCCGCGGTATGAATGGAATCTGGT-3'	Blädel, 2008; Herrmann, 2012
<i>LpP ΔgamA</i>	Deletion in Glucoamylase A Forward Primer: 5'-GGAATACATCGCACATCATTGGC-3' Reverse Primer: 5'-CAGGGACAGATTATGAGCCATG-3'	Herrmann <i>et al.</i> , 2011; Herrmann, 2012
<i>LpP ΔrpoN</i>	Deletion in <i>rpoN</i> = Regulator (+) von Klasse II Flagellen Genen	Albert-Weissenberger <i>et al.</i> , 2010
<i>LpP ΔfleQ</i>	Deletion in <i>fleQ</i> = Regulator (+) von Klasse II Flagellen Genen Forward Primer: 5'-CCGTTATAATGATTACCGAGTG GA-3' Reverse Primer: 5'-TCCCAGTTAAGCGAATCCGTGAT-3'	Albert-Weissenberger <i>et al.</i> , 2010

4.2. Verwendete Kulturmedien

4.2.1. Verwendete Kulturmedien *in vitro*

Tabelle 2.6: Zusammensetzung von CDM- (chemisch definiertes Medium) und AYE (ACES-buffered Yeast Extract)-Flüssigmedien zur Anzucht von *Legionella pneumophila*.

Zusammensetzung	CDM Konzentration [mg/L]	AYE
ACES (N-(2-acet- amido)-2-amino- ethanesulfonamid acid)	10.000	10.000
Alanin		560/440*
Arginin	350	260/140*
Asparagin		-/100*
Aspartat	510	530/160*
Cystein	400	400 -/20*
Glutamat	600	940/660*
Glutamin		-/20*
Glycin		300/100*
Histidin	150	130/40*
Isoleucin	470	300/180*
Leucin	640	410/300*
Lysin	650	460/190*
Methionin	200	80/60*
Phenylalanin	350	260/200*
Prolin	115	200/80*
Serin	650	160/130*
Threonin	330	160/110*
Tryptophan	100	-/50*
Tyrosin	400	120/80*
Valin	480	350/220*
NH ₄ Cl	315	
NaCl	50	10*
CaCl ₂	25	
KH ₂ PO ₄	1.180	
MgSO ₄	70	
Eisenpyrophosphat	250	250
Ca-Ionen		1,3*
Fe-Ionen		0,5*
Mg-Ionen		7,3*
K-Ionen		319,5*
Na-Ionen		49*

Cl-Ionen	38*
Sulfat	9*
Phosphat	327*
<hr/> addieren auf 1 L mit H ₂ O _{bidest} einstellen auf pH 6,8 mit 1N KOH steril filtrieren <hr/>	
*berechnet aus Analysen des Hefe Extraktes (Aminosäuren werden als Summe von freien und proteingebundenen Aminosäuren angegeben)	

Tabelle 2.7: Zusammensetzung BYCE-Medium zur Plattenanzucht von *L. pneumophila*.

BYCE	
ACES (N-(2-acet- amido)-2-amino- ethanesulfonamid- acid	10 g
Hefeextrakt	10 g
<hr/> add. auf 1 L mit H ₂ O _{bidest.} <hr/> mit 1 N KOH auf pH 6,8 <hr/>	
Aktivkohle	2 g
Agar	15 g
<hr/> autoklavieren und abkühlen lassen <hr/>	
in je 10 mL H ₂ O _{bidest} lösen, sterilfiltriert zugeben: <hr/>	
L-Cystein	0,4 g
Eisennitrat	0,25 g
ggf. Antibiotika	

4.2.2. Verwendete Kulturmedien *in vivo*

Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien PYG ATCC712 und Infektionspuffer findet sich in Abschnitt 3.2. (Tabellen 2.3 und 2.4).

4.3. **Metabolomics-Experimente von *L. pneumophila* in vitro**

Um den Metabolismus von *Legionella pneumophila* Paris WT und Mutanten zu untersuchen, werden die *Legionella* Stämme unmarkiert kultiviert. Dazu werden Vorkulturen in 3-4 mL AYE-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Für die Hauptkultur werden jeweils 250 mL AYE mit 1 mL Vorkultur angeimpft und bei einer OD₆₀₀ von 1,9 mit Natriumazid abgetötet, gewaschen und anschließend sofort bei -20°C eingefroren. Der Transport erfolgt auf Trockeneis.

4.4. **Markierungsexperimente von *L. pneumophila* in vitro**

Für die ¹³C-Markierungsexperimente werden jeweils Vorkulturen der verschiedenen *Legionella pneumophila* Stämme in 3-4 mL AYE-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttler kultiviert. Für die Hauptkulturen wird das CDM- oder das AYE-Medium mit entweder 2 g/L [U-¹³C₆]Glucose (10 mM), 2 g/L [1,2-¹³C₂]Glucose (10 mM), 0,3 g/L [U-¹³C₃]Serin (3 mM) oder 0,1 g/L [U-¹³C]Stärke (steril filtriert) bzw. [U-¹³C]Fettsäure-Mix supplementiert.

Für die Versuche in AYE-Medium werden 250 mL Medium mit 1 mL Vorkultur angeimpft, bei den Versuchen in CDM-Medium wird 4 mL Vorkultur benötigt. Die Vorkultur für die CDM-Versuche muss pelletiert und in CDM resuspendiert zugegeben werden. Die Markierung findet bei 37°C unter Schütteln statt. Die Zellernte erfolgt bei gewünschter OD₆₀₀, durch Zugabe von 10 mM Natriumazid, anschließender Zentrifugation bei 4°C und 3.600 g für 15 min und 3 maligem Waschen des Pellets mit kaltem H₂O_{bidest}.

In den Testreihen für die Wachstumsabhängigkeit der Verstoffwechslung von Glucose oder Serin (*LpP* WT und *Δketo*) werden die jeweiligen ¹³C-markierten Substanzen erst zu definierten Zeitpunkten dazugegeben, bzw. nach Erreichen bestimmter OD₆₀₀-Werte (Zeitpunkt 1 ≡ OD=<1; Zeitpunkt 2 ≡ OD=1; Zeitpunkt 3 ≡ OD=1 - 1,5; Zeitpunkt 4 ≡ OD=1,5 - 1,9; Zeitpunkt 5 ≡ OD=1,9) findet die Zellernte statt (siehe Abbildung 2.1).

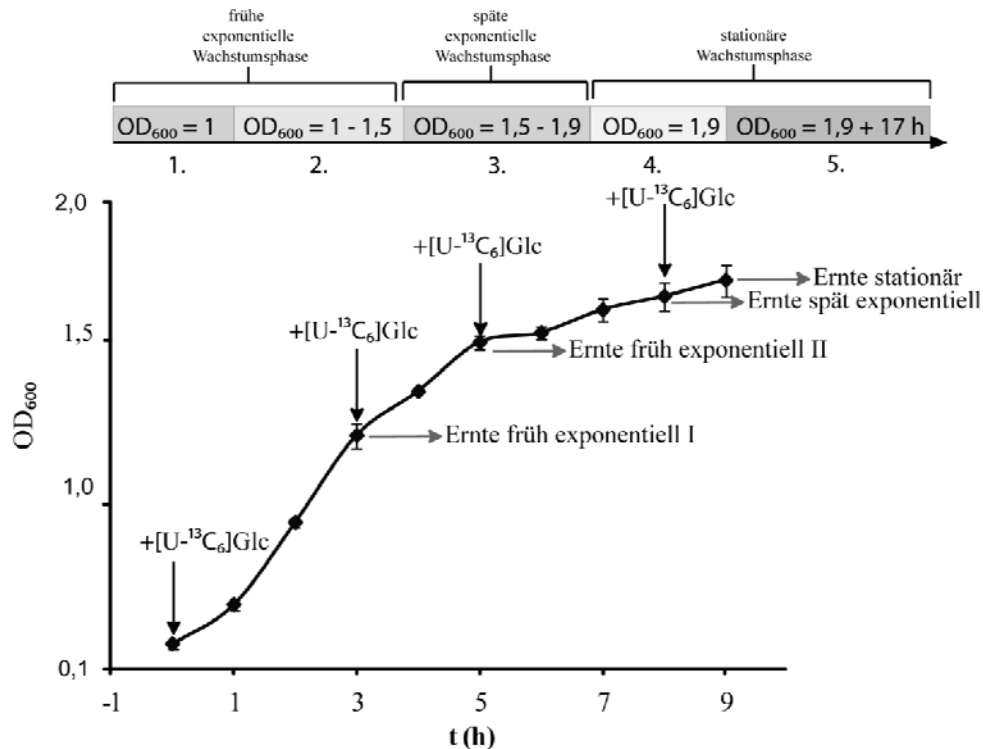


Abbildung 2.1: Zeitpunkte der Zugabe von ^{13}C -markierten Substanzen oder der Ernte der Zellen bei den OD-Versuchen.

4.5. Markierungsexperimente von *L. pneumophila in vivo* in *A. castellanii*

Für die Infektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* wird zunächst eine Vorkultur von *A. castellanii* in einer Zellkulturflasche mit 10 mL PYG ATCC712-Medium bei Raumtemperatur (RT) für 3 Tage liegend inkubiert. Die Amöben werden zwei mal, jeweils nach drei Tagen Liegend-Inkubation bei RT in größere Zellkulturflaschen (zunächst 2 Flaschen je 40 mL, dann 12 Flaschen je 50 mL im Verhältnis 1 : 10) passagiert.

Drei Tage vor Infektion werden die *Legionellen* kultiviert, indem entsprechende Stämme auf BYCE-Platten ausgestrichen und bei 37°C inkubiert werden.

Die Amöben werden einen Tag vor der Infektion vormarkiert und in PYG ATCC712-Medium supplementiert mit 2 g/L $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ passagiert. Die Markierung findet für 22 h bei 37°C statt. Nun werden die Amöben auf die Infektion vorbereitet. Dazu wird vorsichtig das PYG ATCC712-Medium abgekippt, anschließend werden die Zellen 2-mal mit 10 mL Infektionspuffer gewaschen und überführt in 50 mL Infektionspuffer mit einer folgenden Inkubationszeit von 2 h bei 37°, in der die Amöben wieder an die Zellkulturflasche

adhärieren. Parallel werden die *Legionellen* in Infektionsmedium resuspendiert, dabei wird eine OD₆₀₀ von 1 eingestellt (Multiplicity of Infection (MOI) von 100 entspricht dabei 10⁹ LpP/mL). Zu jeder *A. castellanii*-Kultur wird 1 mL *Legionella*-Suspension zugegeben und für 2 h bei 37°C infiziert. Danach wird die Amöbenkultur 2-mal mit 10 mL Infektionspuffer gewaschen und für 22 h bei 37°C inkubiert.

Nach der Kontrolle des Infektionsfortschritts im Mikroskop erfolgt die Zellernte durch Zugabe von 10 mM Natriumazid (Endkonzentration). Die Amöben werden von der Zellkulturflaschenoberfläche abgeklopft, in 50 mL Röhrchen überführt und für 2 h bei -80°C schockgefroren. Die Auftrennung in die verschiedenen Fraktionen erfolgt durch differentielle Zentrifugation zunächst bei 600 g für 15 min bei 4°C (das erste Pellet ergibt eine Mischfraktion aus Amöben-Membranen und Legionellen), dann bei 3.600 g für 15 min bei 4°C (das zweite Pellet ergibt die *Legionellen*-Fraktion, im Überstand sind die cytosolischen Proteine von *A. castellanii* enthalten; der Überstand wird zunächst sterilfiltriert, die cytosolischen Proteine werden dann mit 10 % TCA bei 4°C über Nacht ausgefällt und durch Zentrifugation bei 4.600 g und 4°C für 30 min aufkonzentriert). Alle Pellets werden 3-mal mit H₂O_{bidest} gewaschen und autoklaviert.

Von Frau Dr. Eva Schunder wurden zur Kontrolle der Fraktionierung Western blots durchgeführt (siehe Abbildung 2.2).

Bei der Fraktionierung nach Infektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* WT (siehe Abbildung 2.2. A) detektierte sowohl der eingesetzte Antikörper gegen Amöbenproteine (α -A.c. Primärantikörper; Verhältnis 1 : 200 in TBS/ 1% Milch) als auch der Sekundäre Antikörper α -Kaninchen (Verhältnis 1 : 2000 in TBS/ 1% Milch) in beiden Amöbenfraktionen Amöbenproteine, während die Legionellenfraktion frei von Kontamination durch *A. castellanii* war. Als Kontrolle dienten ein *Legionella* Lysat und 0,5% sowie 5% einer uninfizierten *A. castellanii* Cytosolfraktion. Mit dieser differentiellen Zentrifugation konnte somit bewiesenermaßen die Kontaminationsrate der Fraktionen auf 0,5 - 5 % minimiert werden.

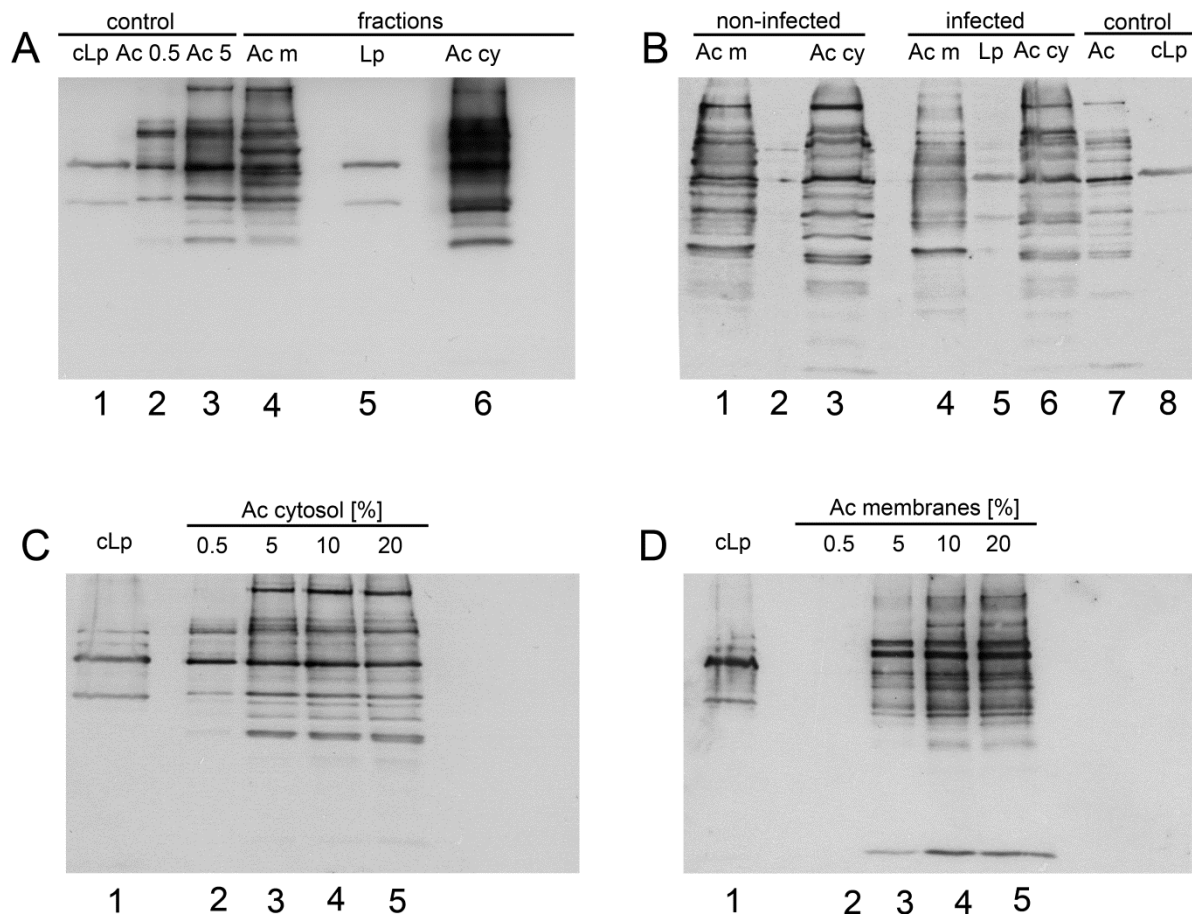


Abbildung 2.2: Western blots: (A) Fraktionierung nach Infektion von *A. castellanii* mit *L. pneumophila* WT (B) Fraktionierung von uninfizierten (1-3) bzw. mit *LpP* WT infizierten *A. castellanii*. Als Kontrolle dienen *A. castellanii* (7) und *LpP* (8) Lysat. (C) Auftragung verschiedener Konzentrationen uninfizierter *A. castellanii* Cytosolfractionen. (D) Auftragung verschiedener Konzentrationen uninfizierter *A. castellanii* Membranfraktionen. **Schlüssel:** cLp, *L. pneumophila* WT Lysat; Ac 0.5, uninfizierte *A. castellanii* Cytosolfraktion 0.5%; Ac 5, uninfizierte *A. castellanii* Cytosolfraktion 5%; Ac m, *A. castellanii* Membranfraktion; Lp, *L. pneumophila* WT Fraktion; Ac cy, *A. castellanii* Cytosolfraktion; Ac, *A. castellanii* Lysat (Abbildung erstellt von Frau Dr. Eva Schunder).

5. *Legionella oakridgensis*

Die Anzucht von *Legionella oakridgensis* und die Ausführung der Markierungsexperimente geschah am Robert-Koch-Institut Berlin in der Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Klaus Heuner, durch Frau Kerstin Rydzewski.

Für die Metabolomics-Studien und die ^{13}C -Analysen wurde der Stamm *L. oakridgensis* ATCC33761 (Kühlturmisolat; Orrison *et al.*, 1983) verwendet und parallel zu den Anzuchten und Markierungsexperimenten von *L. pneumophila* Paris durchgeführt (siehe Abschnitt II 4.2.1., 4.3 mit 4.4).

6. J774A.1 Makrophagen

Die Anzucht und Markierungsexperimente erfolgten am Max von Pettenkofer-Institut in der Abteilung für Bakteriologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durch Herrn Dr. Andreas Götz.

6.1. Verwendete J774A.1 Makrophagen

Die für die ^{13}C -Analytik verwendeten J774A.1 Makrophagen stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ).

6.2. Verwendete Kulturmedien und Puffer

Tabelle 2.8: RPMI-1640 Medium zur von Makrophagen-Anzucht.

RPMI-1640	
<u>Zusammensetzung</u>	<u>mg/L</u>
Glycin	10
L-Arginin	200
L-Asparagin	50
L-Aspartat	20
L-Cystein	20
L-Glutamat	20
L-Glutamin	300
L-Histidin	15
L-Hydroxyprolin	20
L-Isoleucin	50
L-Leucin	50
L-Lysinhydrochlorid	40
L-Methionin	15
L-Phenylalanin	15
L-Prolin	20
L-Serin	30
L-Threonin	20
L-Tryptophan	5
L-Tyrosin	20
L-Valin	20
Biotin	0,2
Cholinchlorid	3
D-Calciumpanthothenat	0,25
Folsäure	1
i-Inositol	35
Niacinamid	1

para Aminobenzoessäure	1
Pyridoxinhydrochlorid	1
Riboflavin	0,2
Thiamin (Hydrochlorid)	1
Vitamin B12	0,005
Calciumnitrat	100
Magnesiumsulfat	100
Kaliumchlorid	400
Natriumbicarbonat	2000
Natriumhydrogenphosphat	6000
D-Glucose	2000
Glutathion	1
Phenolrot	5

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Puffer PBS und RIPA.

PBS-Puffer		RIPA Puffer	
NaCl	8 g	NaCl	25 mM
			150
KCl	0,2 g	Tris-HCl pH 7,6	mM
Na ₂ HPO ₄	1,44 g	NP-40	1%
KH ₂ PO ₄	0,24 g	Natriumdeoxycholate	1%
pH-Wert auf 7,4 einstellen mit HCl		SDS	0,10%
H ₂ O _{bidest} ad 1L			
autoklavieren			

6.3. Anzucht von J774A.1

Die J774A.1 Makrophagen werden bei 37°C und einer 5%igen CO₂-Atmosphäre in RPMI-1640 Medium (Roswell Park Memorial Institute), das mit 10% Hitze-inaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS, Biochrom KG, Berlin) angereichert ist, kultiviert. Eine Passagierung der Zellen mit einer Verdünnung von 1 : 3 erfolgt zwei mal pro Woche.

6.4. Markierungsexperimente mit uninfizierten J774A.1

Zur Durchführung der ^{13}C -Markierungsexperimente von J774A.1 werden jeweils 1×10^6 Zellen in Zellkulturflaschen mit RPMI-1640 Medium ausgesät und für 24 h bei 37°C in einer 5%igen CO_2 -Atmosphäre inkubiert. Dabei gibt es vier unterschiedliche Versuchsbedingungen:

- 1: + IFN- γ (20 ng/mL) - Insulin
- 2: + IFN- γ (20 ng/mL) + Insulin (10 μM)
- 3: - IFN- γ - Insulin
- 4: - IFN- γ + Insulin (10 μM)

Nach diesem Inkubationsschritt sind die Zellen auf eine Dichte von 2×10^8 angewachsen (\rightarrow Ansatzpunkt für Infektionsexperimente; siehe Kapitel II.8).

Nun findet eine Passagierung in neues Medium statt, unter Zugabe von entweder 10 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]Glucose oder 2 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]Glutamin. Bei den Experimenten mit markierter Glucose enthält das Medium keine unmarkierte Glucose, im Falle von markiertem Glutamin ist ebenfalls kein unmarkiertes Glutamin, jedoch 10 mM unmarkierte Glucose präsent. Die Markierungsdauer beträgt 8 h.

Die Zellernte beginnt mit einem Waschschrift mit eiskaltem PBS-Puffer (Tabelle 2.9.). Dann erfolgt die Zelllyse mit 1 mL eiskaltem $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, supplementiert mit 0,1% TritonX-100, 10 mM Natriumazid, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Tetracyclin und 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Chloramphenicol bei 4°C für 10 min. Die lysierten Zellen werden in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 25 000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Er enthält die cytosolischen Proteine und wird zur ^{13}C -Analyse für J774A.1 verwendet. Das Pellet wird mehrmals mit RIPA-Puffer gewaschen und ebenfalls in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es enthält die Makrophagen-Membranen und wird für die Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* verwendet um die Verunreinigung durch die Makrophagen-Bestandteile im Listerien Pellet rechnerisch zu ermitteln und abzuziehen. Dazu wird der Faktor X (=“Spillover“-Faktor) aus dem Quotienten von Makrophagen-Pellet zu Makrophagen-Lysat errechnet. Dieser Quotient stellt die differentielle Turn-over-Rate von Kohlenstoff in den unterschiedlichen Zellfraktionen (cytosolische Proteine im Lysat und Zellbestandteile, wie z.B. Zellwand-Proteine im Pellet) dar. Da der Eintrag von ^{13}C in die unterschiedlichen Zellfraktionen nicht 1:1 ist, muss dieser Faktor für die einzelnen Versuchsbedingungen

separat ermittelt werden. Die Messwerte des Listerien-Pellets in den Infektions-Experimenten werden um diesen „Spill-over“-Faktor korrigiert. Dafür wird ein erwarteter Makrophagen-Pellet-Wert aus dem Makrophagen-Lysat-Wert mit dem Faktor X ausgerechnet und von dem gemessenen Listerien-Pellet-Wert abgezogen (Kapitel II.8).

7. Primäre Mausmakrophagen

Die Isolierung der primären Mausmakrophagen aus dem Knochenmark der Maus erfolgte am Max von Pettenkofer-Institut in der Abteilung für Hygiene und Medizinischen Mikrobiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Jürgen Heesemann durch Frau Anette Schulz.

Zur Ausdifferenzierung zu CD11b+, CD11c- und F4/80-Makrophagen werden die gewonnenen Zellen auf DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, siehe Tabelle 2.X), supplementiert mit 10 ng/L M-CSF (Macrophage colony-stimulating factor), 8-10 d inkubiert, wobei nach 3-4 d frisches Medium zugegeben wird.

Die ¹³C-Markierungs- und Infektionsversuche mit *L. monocytogenes* erfolgen nach dem selben Protokoll wie in Abschnitt II 6. und 8. für J774A.1 Makrophagen aufgeführt, mit zwei Ausnahmen: Erstens ist die Anfangszelldichte mit 2×10^6 Zellen höher, da sich die primären Zellen weniger schnell vermehren. Zweitens ist das Medium immer mit 10 µM Insulin supplementiert, da Vorversuche erwiesen, dass sich die Glucoseaufnahme in primären Zellen mit dieser Konzentration an Insulin am Besten stimulieren lässt. Auf die J774A.1 hat dies jedoch kaum Einfluss.

8. *Listeria monocytogenes*

Die Anzuchten der Bakterien und die Infektionsexperimente mit primären und J774A.1 Makrophagen erfolgten am Max von Pettenkofer-Institut in der Abteilung für Bakteriologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durch Herrn Dr. Andreas Götz.

Verwendeter *Listeria monocytogenes* Stamm:

Der verwendete *Listeria monocytogenes* Stamm ist EGD-e (WT, Serovar 1 /2,a) wie in Mackaness (1964) beschrieben.

Markierungsexperimente in vivo:

Die Infektionen von J774A.1 und primären Mausmakrophagen mit *L. monocytogenes* erfolgen nach demselben Protokoll (Ausnahmen siehe Kapitel II 6.4. und 7.)

Die Anzuchten und Vorkulturen finden nach dem Protokoll in Kapitel II.6.4. und 7. statt.

Nach dem Hochziehen der Zellen erfolgt die Infektion mit *L. monocytogenes* mit einer MOI von 10 (eine höhere MOI würde die primären Makrophagen in den Zelltod treiben). Zur Kontrolle dient eine Infektion mit UV-inaktivierten (30 min) *Listerien*. Nach einer Infektionsdauer von 60 min werden die extrazellulären Bakterien mit 50 µg/mL Gentamycin für 30 min abgetötet. Anschließend wird das Infektionsmedium gegen RPMI Medium (supplementiert mit 10% FCS, 50 µg/ mL Gentamycin, +/- 10 µM Insulin und ¹³C-markiertes Substrat) ersetzt. Die weitere Versuchsdurchführung der Markierung und Zellernte findet wie in Kapitel II.6.4 bzw. II.7. statt. Zur Analyse des Metabolismus von J774A.1 und primären Makrophagen wird der Überstand (cytosolische Makrophagen-Proteine, bakterienfrei (getestet mit Kontrollausstrichen)) verwendet. Zur Bestimmung des intrazellulären Metabolismus von *L. monocytogenes* ist eine interne Kalibrierung aufgrund der Verunreinigung durch Makrophagen-Protein notwendig. Dazu werden die Messwerte des Listerien-Pellets mit dem „Spill-over“-Faktor (Kapitel II.6.4.).

9. NMR-Messungen

Die Besonderheit der NMR-Spektroskopie, nur solche Atome mit einem Kernspin $\neq 0$ zu detektieren (Lottspeich; 2006), hat sich in ^{13}C -Tracerstudien als eine sehr wertvolle Messmethodik bewiesen (Eisenreich and Bacher, 2007). Aufgrund der geringen Sensitivität der Messmethode ist das Einsatzgebiet der NMR-Spektroskopie in der vorliegenden Arbeit auf *in vitro*-Studien von *Legionella pneumophila* Paris (das Trockengewicht der Probe muss dabei mindestens bei 200 mg liegen) limitiert.

9.1. ^{13}C -NMR: Probenvorbereitung

9.1.1. Rohextrakte

Die lyophilisierte Probe wird mit 100%igem Methanol p.a. im Verhältnis 10 mL/100 mg Trockengewicht für 1 h bei 60°C unter Rückfluss gekocht. Danach wird die Probe abfiltriert. Der Methanolextrakt wird bei niedrigem Druck zur Trockene eingengt. Der Rückstand wird anschließend in 880 μL D_2O , 100 μL KPO-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.10.) und 20 μL TSP-Standard (1 M) gelöst, wobei davon ein Volumen von 560 μL für die NMR-Messung entnommen wird.

Tabelle 2.10: Zusammensetzung des KPO-Puffers.

KPO Puffer	
KH_2PO_4	68,05 mg
K_2HPO_4	87,09 mg
D_2O	ad 5 mL
pH = 7,2	

Das nach der Extraktion mit MeOH verbleibende Zellpellet wird mit Dichlormethan p.a. im Verhältnis 10 mL pro 100 mg Trockenmaterial für 60 min bei 38°C im Rückfluss extrahiert. Anschließend wird der Extrakt abfiltriert, das Filtrat bei niedrigem Druck zur Trockene eingengt und in 1 mL CDCl_3 aufgenommen. Ein Volumen von 560 μL wird zur NMR-Spektroskopie verwendet (^1H - und ^{13}C -NMR-Messungen), um die unpolaren Metabolite zu charakterisieren. Der Rückstand im Filter wird zur weiteren Extraktion der proteinogenen Aminosäuren über Nacht bei RT getrocknet.

9.1.2. Aminosäuren

Zunächst findet eine saure Hydrolyse zur Gewinnung der proteinogenen Aminosäuren statt. Dafür werden zum getrockneten Filtrerrückstand des Dichlormethanextraktes 25 mL 6 M HCl p.a. und 2 mL Thioglycolsäure gegeben. Die Suspension wird 24 h lang bei 120°C unter Rückfluss gekocht, die Heiz- und Abkühlphase finden dabei unter Stickstoffbegasung statt. Anschließend wird die Lösung filtriert, der Rückstand verworfen und das Filtrat mehrmals einrotiert (nach wiederholter Zugabe von $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$), bis HCl und Thioglycolsäure vollständig entfernt werden.

Nun erfolgt die Reinigung und Fraktionierung der Aminosäuren. Das eingeeengte Hydrolysat wird in 10 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ aufgenommen und auf eine Säule, die mit 50 g DOWEX (50Wx8, 200 – 300 mesh, 2,5 – 30 μm , H^+ -Form; Firma Serva, Heidelberg, Deutschland) gefüllt ist, aufgetragen. Die Säule wird zunächst mit 200 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, gefolgt von einem Gradienten aus 0 – 3 M HCl (Gesamtvolumen 2 L) und anschließend mit 1 L 3 M HCl entwickelt. Das Eluat wird dabei durch einen Fraktionssammler in 20 mL Portionen fraktioniert. Aminosäurenenthaltende Fraktionen werden mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert. Die Entwicklung der Dünnschichtchromatographieplatten (TLC Cellulose F Platten der Firma Merck, Darmstadt, Deutschland) findet in DC-Kammern, gefüllt mit Laufmittel (Mischungsverhältnis = n-Butanol : Eisessig : Wasser = 50 : 20 : 30) statt. Die Anfärbung erfolgt mittels Ninhydrin (0,3 g Ninhydrin auf 100 mL Butanol p.a.) bei 105°C für 5 min. Fraktionen mit gleichen Aminosäuren werden gesammelt und bei niedrigem Druck bis zur Trockene eingeeengt. Zur NMR-Messung wird die trockene Probe in D_2O aufgenommen.

9.2. ^{13}C -NMR-Spektroskopie

Die Messungen wurden an verschiedenen Messgeräten durchgeführt. Für Vorabtests wurde ein AV 360 der Firma Bruker () eingesetzt. Für die Aufnahme der ^1H -Spektren wurde ein AV 500 Gerät der Firma Bruker (bei einer magnetischen Flussdichte von T? und einer ^1H -Resonanzfrequenz von 500,13 MHz) gewählt. Die Messung der ^{13}C -Spektren fand zum einen an einem DRX 500 NMR von Bruker, bei einer magnetischen Flussdichte von 11,75 T und einer ^{13}C -Resonanzfrequenz von 125,77 MHz (Messung bei 300 K in 5 mm NMR-Röhrchen) und zum anderen an einem AV 500C NMR von Bruker mit einem für ^{13}C hochempfindlichen sogenannten Kryo-Probenkopf statt. Alle Messungen wurden mit „Bruker-Standardparametern“ durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mithilfe

der Software MestreNova.

9.2.1. Ermittlung der relativen ^{13}C -Anreicherung ($\%^{13}\text{C}_{\text{rel}}$)

Aus dem Quotienten der Integrale einer ^{13}C -markierten Probe und einem Standard mit natürlichem ^{13}C -Gehalt (1,1%), die mit dem gleichen Messgerät unter denselben Bedingungen gemessen wurden, lässt sich mit Gleichung 1 die relative ^{13}C -Anreicherung pro C-Atom im Molekül berechnen.

$$\%^{13}\text{C}_{\text{rel}} = \frac{^{\text{c}}\text{I}^* \times 1}{^{\text{c}}\text{I} \times f} \times 100\% \quad (\text{Gleichung 1})$$

$\%^{13}\text{C}_{\text{rel}}$: Relative ^{13}C -Anreicherung

$^{\text{c}}\text{I}^*$: Integralintensität des ^{13}C -Signals einer künstlich angereicherten Probe im ^{13}C -NMR-Spektrum

$^{\text{c}}\text{I}$: Integralintensität des ^{13}C -Signals eines unmarkierten Standards im ^{13}C -NMR-Spektrum

f: Kalibrierungsfaktor = kleinstes Ereignis für $^{\text{c}}\text{I}^*/^{\text{c}}\text{I}$ in einer Probe

9.2.2. Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung

Schnittstelle zwischen ^1H -NMR und GC/MS:

Bei gut aufgelösten ^1H -Spektren und eindeutiger Zuordnung der Signale mit einfachen Kopplungen, kann aus den Integralen der ^1H - ^{13}C Kopplungssatelliten die absolute ^{13}C -Anreicherung pro C-Atom nach Gleichung 2 berechnet werden.

$$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}} = \frac{^{\text{H}}\text{I}_{\text{S}}}{^{\text{H}}\text{I}_{\text{S}} + ^{\text{H}}\text{I}_{\text{Z}}} \times 100\% \quad (\text{Gleichung 2})$$

$^{\text{H}}\text{I}_{\text{S}} = ^{\text{H}}\text{I}_{\text{S1}} + ^{\text{H}}\text{I}_{\text{S2}}$: Summe der Integrale der beiden ^{13}C -Satelliten eines H-Atom-Signals im ^1H -NMR-Spektrum

$^{\text{H}}\text{I}_{\text{Z}}$: Zentralsignal-Integral des entsprechenden Protons im ^1H -NMR-Spektrum

Nicht immer sind die ^1H - ^{13}C -Kopplungssatelliten im ^1H -Spektrum zweifelsfrei zuzuordnen. Alternativ findet sich hier die elegante Möglichkeit, die NMR-spektroskopischen Daten mit

den ermittelten GC/MS-Daten zu koppeln. Aus den GC/MS Analysen lässt sich ein ^{13}C -Overall-Excess (in mol%, d.h. gemittelte prozentuale Markierung pro C-Atom, siehe Kapitel II.11) berechnen. Von diesem Wert ist bereits die natürliche Abundanz von 1,1% abgezogen und jener muss bei NMR-Berechnungen wieder um diesen Wert erhöht werden.

Eine exemplarische Darstellung der Verknüpfung von NMR- und Massendaten findet sich in Abbildung 2.3.

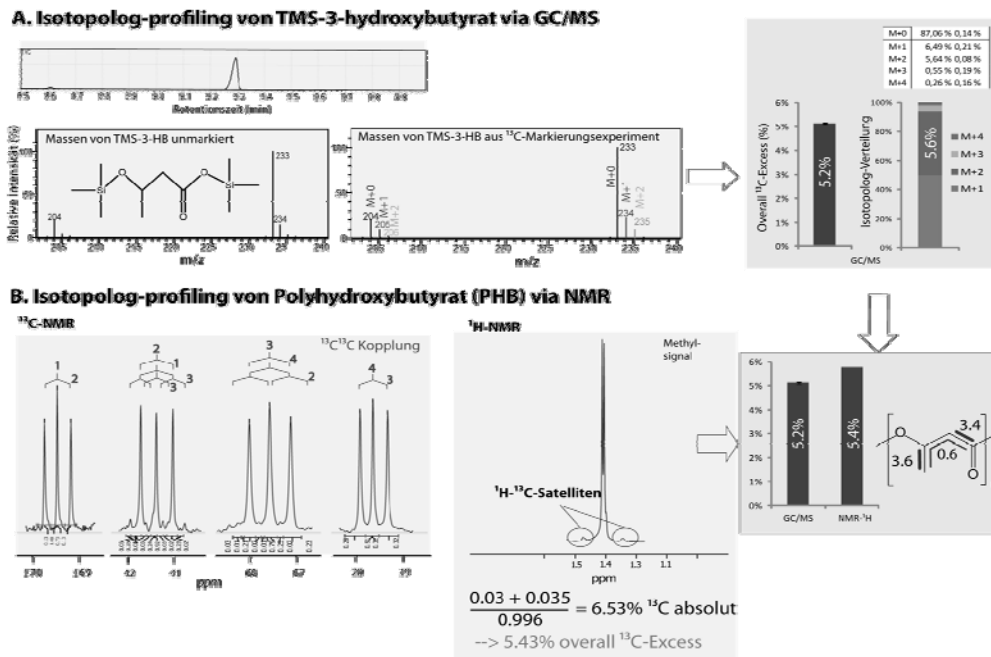


Abbildung 2.3: Verknüpfung von NMR- und Massendaten am Beispiel PHB.

Eine Kombination von Gleichung 1 und 2 ergibt die absolute ^{13}C -Anreicherung eines bestimmten C-Atoms in einem Molekül (Gleichung 3).

$$\%^{13}\text{C}_{\text{absX}} = \frac{^c\text{I}_X^* \times \%^{13}\text{C}_{\text{abs}}}{^c\text{I}_X + ^c\text{I}^*/^c\text{I}_{\text{Std}}} \times 100\%$$

(Gleichung 3)

$\%^{13}\text{C}_{\text{absX}}$: Absolute ^{13}C -Anreicherung eines beliebigen C-Atoms in einem ^{13}C -markierten Molekül

- $^{\circ}I_X^*$: Integral eines ^{13}C -Signals im ^{13}C -NMR-Spektrum der markierten Probe
- $^{\circ}I_X$: Integral des entsprechenden ^{13}C -Signals im ^{13}C -NMR-Spektrum eines unmarkierten Standards
- $\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$: Absolute ^{13}C -Anreicherung eines bestimmten protonentragenden C-Atoms C_X , bestimmt entweder aus dem ^1H -Spektrum nach Gleichung 2, oder aus den Massendaten
- $^{\circ}I^*$: Integral von C_X im ^{13}C -NMR-Spektrum der markierten Probe
- $^{\circ}I_{\text{Std}}$: Integral des entsprechenden C_X - ^{13}C -Signals im ^{13}C -NMR Spektrum einer entsprechenden Standardsubstanz

9.2.3. Quantitative positionelle $\%^{13}\text{C}$ -Bestimmung über $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung

Durch den Vergleich der Integrale des Kopplungssatelliten ($^{\circ}I_S$) mit der Summe der Integrale des gesamten Signals ($^{\circ}I_S + ^{\circ}I_Z$) kann der prozentuale Anteil der $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung errechnet (nach Gleichung 4) und somit die prozentuale ^{13}C -Anreicherung positionell bestimmt werden.

$$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C} = \frac{^{\circ}I_S}{^{\circ}I_S + ^{\circ}I_Z} \times 100\% \quad (\text{Gleichung 4})$$

$^{\circ}I_S$: Integral der ^{13}C -Satelliten im ^{13}C -NMR-Spektrum

$^{\circ}I_Z$: Integral des Zentralsignals im ^{13}C -NMR-Spektrum

Eine quantitative Bestimmung des ^{13}C -Überschusses an einer bestimmten Position im Molekül erfolgt, indem man die $\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplung (aus Gleichung 4) auf die absolute ^{13}C -Anreicherung (aus Gleichung 2) bezieht (siehe Gleichung 5).

$$\text{mol } \% = \%^{13}\text{C}^{13}\text{C} \times \%^{13}\text{C}_{\text{abs}} \quad (\text{Gleichung 5})$$

$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$: $^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ -Kopplungen eines C-Atoms im ^{13}C -NMR-Spektrum

$^{13}\text{C}_{\text{abs}}$: Absolute ^{13}C -Anreicherung des entsprechenden C-Atoms (errechnet aus Gleichung 2 oder aus den Massendaten)

9.3. Metabolomics-¹H-NMR

9.3.1. Probenvorbereitung – Zellaufschluss und Extraktion

Für das Metabolitprofiling werden jeweils 30 mg einer unmarkierten, lyophilisierten Bakterienprobe in ein 1,5 mL Ribolysergefäß eingewogen. Es erfolgt eine Zugabe von ca. 500 μ L Glasperlen (als Maß dient dabei ein Eppendorfgefäß) und von 1 mL 100%igem Methanol p.a..

Nun verläuft der mechanische Zellaufschluss im Ribolyser für 3 mal 20 sec mit einer Geschwindigkeit von 6,5 m/s. Nachdem die Proben auf Eis abgekühlt sind, werden diese bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand werden 200 μ l für die GC/MS-Analytik (\rightarrow siehe Kapitel II. 11.3.) entnommen, der restliche Überstand wird im N₂-Strom getrocknet. Die trockene Probe wird nun in 560 μ L D₂O, 30 μ L KPO-Puffer und 10 μ L TSP-Standard (0,1 M; Zusammensetzung siehe Kapitel II 10.1.1) aufgenommen, 560 μ L davon werden in ein NMR-Röhrchen zur Messung überführt. Die Endkonzentration des TSP-Standards in der Probe beträgt 2 mM.

9.3.2. Messung und Auswertung

Die Ribolyserextrakte werden am AV500 NMR der Firma Bruker mit Wasserunterdrückung gemessen. Das Probenset umfasst dabei neben 3 biologischen Replikaten auch jeweils 3 technische Replikate. Jede Probe wurde 3-mal gemessen.

Durch ein Screening über alle Spektren, durchgeführt von Frau Birgit Keil, mithilfe des Programms MestreNova, konnten biologische und technische „Ausreißer“ in den Messreihen identifiziert werden. Diese wurden sowohl bei der Peakbestimmung im NMR, als auch bei der GC/MS Analytik nicht in das Datenset mit aufgenommen. Für die Auswertung wurde exemplarisch jeweils ein Spektrum pro Probe mit guter Reproduzierbarkeit ausgesucht.

Eine Zuordnung der Signale erfolgt mithilfe der Spektraldatenbank des ChenomX-Profilers. Das Programm errechnet anhand der zugegebenen TSP-Konzentration die Menge (in mM) der jeweiligen identifizierten Substanz in der Probe (in 560 μ L). Ein Signal-alignment findet manuell über Justierung der Signalintensitäten der Bibliotheks-Signale an die gemessenen Signale in der Probe statt. (Abbildung 2.4)

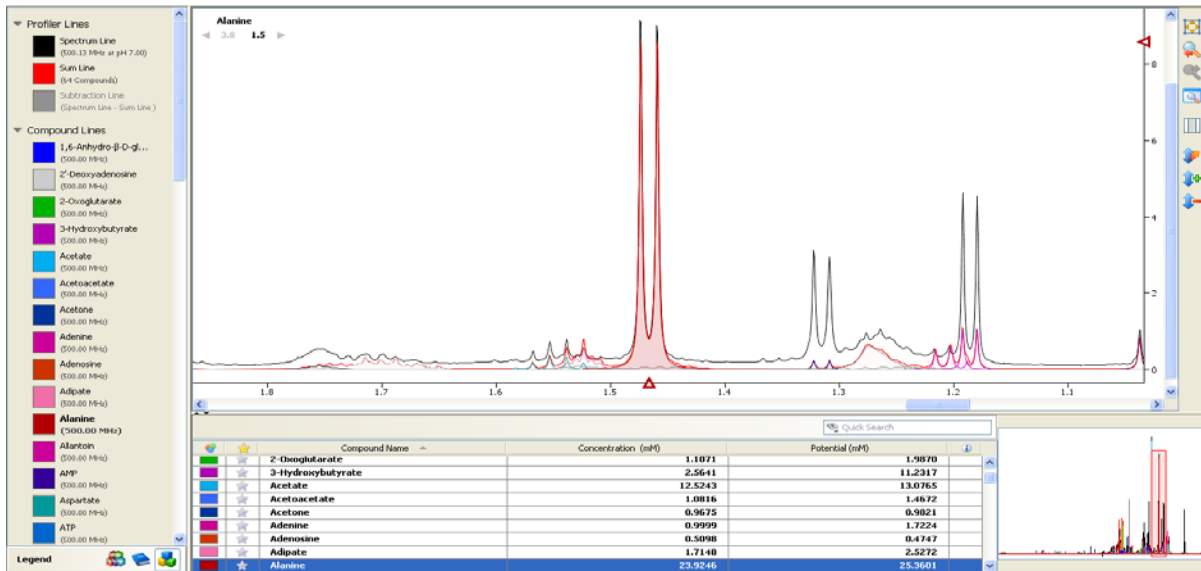


Abbildung 2.4: Screenshot einer exemplarischen Auswertung (*Lp ΔrpoN*) am ChenomX-Profiler (als Signalbeispiel ist hier Alanin gewählt).

10. Gaschromatographie/Massenspektrometrie

Um Substanzen mit sehr polaren funktionellen Gruppen wie Hydroxy- oder Aminogruppen gaschromatographisch auftrennen zu können, müssen diese erst durch geeignete Derivatisierung in weniger polare Substanzen umgewandelt werden (Hesse *et al.*, 2005). Polymere, wie zum Beispiel Polyhydroxybutyrat (PHB) oder Alginat müssen zunächst durch eine Hydrolyse in ihre Monomere gespalten werden. Im Massenspektrometer werden dann anschließend die Moleküle durch Elektronenstoß ionisiert und die entstehenden Fragmente detektiert (Hesse *et al.*; 2005).

10.1. ¹³C-Isotopologanalysen: Probenvorbereitung und Messung

10.1.1. Aminosäuren und PHB

Zunächst findet eine saure Hydrolyse der Bakterienprobe statt. Durch jene erhält man neben den proteinogenen Aminosäuren auch das Monomer von PHB, das 3-Hydroxybutyrat (3-HB), welches spezifisch von *Legionella* als Energie- und C-Speicher gebildet wird (Brüggeman *et al.*, 2006). Dazu wird ungefähr 5 mg Probe in ein 1,5 mL Autosamplerglas gegeben, mit 500 µL 6 M HCl versetzt und für 24 h bei 105°C hydrolysiert. Anschließend wird die HCl im Heizblock bei 70°C unter N₂-Zufuhr getrocknet. Zum Rückstand werden 200 µL 50%iger Eisessig gegeben und im Ultraschallbad für 3 min vollständig gelöst.

Die Aufreinigung erfolgt über einen Kationenaustauscher. Dazu wird eine 1 mL Pipettenspitze mit 300 μL neutral-gewaschenem Kationenaustauscher (DOWEX 50W X8 200 – 400 mesh (34 – 74 μm) H^+ -Form) ausgestattet, als Fritte dient dabei etwas verdichtete Glaswolle. Die Säule wird einmal mit 1 mL 70%igem Methanol p.a. und 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gewaschen. Nach dem Auftragen der Probe auf die Säule wird diese nun zunächst 2-mal mit 1 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ entwickelt, wobei 3-HB bereits eluiert und in einem 2 mL Eppendorfcup aufgefangen wird. Die Aminosäuren werden aus ihrer Bindung zum Kationenaustauscher durch Zugabe von 1 mL 4 M Ammoniaklösung verdrängt und werden ebenfalls in einem Eppendorfgeläß (1,5 mL) separat aufgefangen.

Zur Vorbereitung der Derivatisierung werden 1 mL aus der 3-HB-Fraktion und 200 μL aus der Aminosäuren-Fraktion jeweils in ein 1,5 mL Autosamplerglas pipettiert und unter N_2 -Strom bei 70°C getrocknet.

3-Hydroxybutyrat:

Die Derivatisierung des 3-HBs erfolgt mittels 100 μL MSTFA (*N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamid mit 1% Trimethylchlorosilan) bei 40°C für 30 min unter leichtem Schütteln.

Zunächst wird anhand eines SCAN-Laufs gescreent, ob die Probe 3-HB enthält (als Referenz dient dabei ein Chromatogramm von hydrolysiertem PHB (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Im SCAN-Lauf werden alle auftretenden Massen detektiert, üblicherweise setzt man einen Threshold von 100 ein. Anschließend wird die Probe 3-mal im SIM-Lauf (SIM = Single Ion Monitoring) gemessen. In dieser Methode werden nur gezielte m/z -Verhältnisse detektiert, die man in das Messprogramm einträgt, üblich ist hierbei ein Threshold von 0. Durch die Ionisation wird das derivatisierte 3-HB in mehrere Fragment-Ionen aufgetrennt. Für die spätere Berechnung der ^{13}C -Anreicherung ist die Eingabe geeigneter Fragment-Massen entscheidend. Dazu wird in der SIM-Methode ein Messfenster von $M - 1$; M ; $M + 1$; ...; $M + n$; mit M : Molekülmasse des Fragments und n : Anzahl der C-Atome im Fragment gewählt. Silyliertes 3-HB eluiert von der Säule mit einer Retentionszeit von 9 min (bei 120 °C Ofen-Temperatur). Das untersuchte Hauptfragment ist das vollständig silylierte Monomer 3-HB (2-TMS) abzüglich der Masse 15 $[\text{M}-15]^+$ mit einer Masse von m/z 233 (unmarkiert). (Abbildung 2.5.). Die GC/MS Parameter für den SCAN und SIM-Lauf finden sich in Tabelle 2.11.

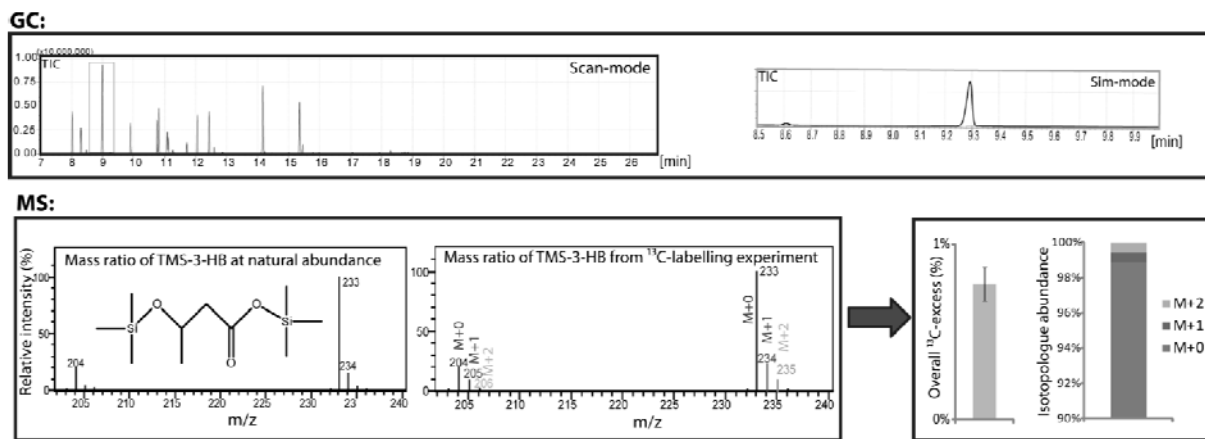


Abbildung 2.5: SCAN- und SIM-Chromatogramme einer markierten Probe.

Tabelle 2.11: GC/MS Mess-Parameter für 3-HB.

	SCAN-Mode	SIM-Mode
Injektor:	260°C	260°C
Interface:	260°C	260°C
Temperaturprogramm:	70°C (3 min) – 260°C (5°C/min)	70°C (3 min)(5°C/min) – 150°C (0 min) – 280°C (2 min)
Druckprogramm:	3,0 mL / min	3,0 mL / min
Total Flow:	16,1 mL / min	16,1 mL / min
Start – Ende:	7 -27 min	8,5 – 10 min
Detector Volts:	automatisch aus aktuellen Tuning Parametern	automatisch aus aktuellen Tuning Parametern
Split:	1:10	1:5
Solvent Cut:	5 min	5 min
Sampling Rate:	0,5 s	0,5 s
Micro Scan width:	0,2 s	0,2 s
Massen-Fragmente (m/z):	90,00 – 400,00	231,1; 232,1; 233,1; 234,1; 235,1; 236,1; 237,1; 238,1; 239,1

Aminosäuren:

Die Derivatisierung der Aminosäuren erfolgt bei 70°C mit 50 µL MTBSTFA (*N*-Methyl-*N*-(*tert*-Butyldimethylsilyl)trifluoroacetamid mit 1% Trimethylchlorosilan) und 50 µL wasserfreiem Acetonitril. Durch die *tert*-Butyldimethylsilyl-Gruppe werden die Carbonsäuren- und Aminogruppen der Aminosäuren geschützt. Die Ionisation im MS führt dazu, dass die derivatisierten Aminosäuren, wie schon bei 3-HB erwähnt, in unterschiedlich große Fragmente gespalten werden. Dabei gibt es charakteristische Bruchstellen im derivatisierten Molekül (Abbildung 2.6. aus Eylert, 2009). Die Retentionszeiten und untersuchten Massen-Fragmente der derivatisierten Aminosäuren sind in Tabelle 2.12. aufgelistet. Ein Beispiel für ein Chromatogramm im SIM-Lauf findet sich in Abbildung 2.7., die GC/MS Mess-Parameter sind in Tabelle 2.13. aufgelistet.

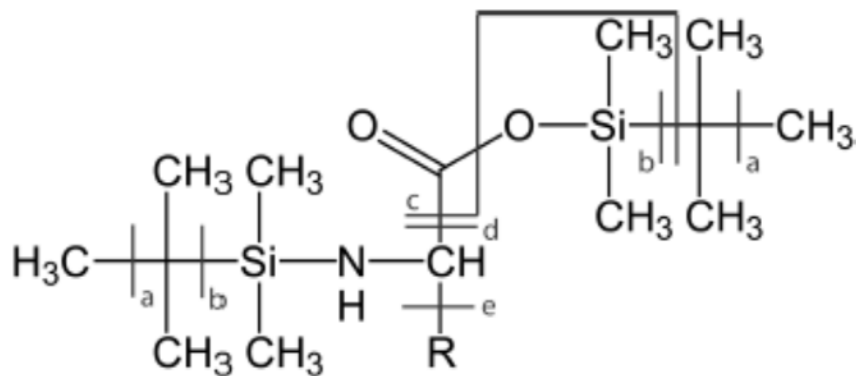


Abbildung 2.6: Derivatisierte Aminosäure mit charakteristischem Fragmentierungsmuster im MS (Eylert, 2009). Schlüssel: detektierte Fragmente: a: $[M - 15]^+$ (15 \equiv Methylgruppe); b: $[M - 57]^+$ (57 \equiv Tertbutylgruppe); c: $[M - 85]^+$ (85 \equiv Tertbutylgruppe inklusive CO); d: $[M - 159]^+$ und (159 \equiv C(O)-TBDMS Ion); e: $[f302]^+$ (\equiv doppelt silyliertes C1-C2-Fragment); M = Molekülmasse.

Tabelle 2.12: Fragmente der Aminosäuren im SIM-Lauf (modifiziert nach Eylert, 2009). Unter den Fragmenten sind die Messfenster für die jeweilige mögliche ^{13}C -Markierung angegeben.

AS	RZ	[M - 15] ⁺	[M - 57] ⁺	[M - 85] ⁺	[M - 159] ⁺	Seitenkette	[302] ⁺
Ala	6,6		260 259 ... 265	232 231 ... 236	158 157 ... 163		
Gly	6,9		246 245 ... 250	218 217 ... 221			
Val	8,4		288 287 ... 295	260 259 ... 266	186 185 ... 192		302 301 ... 305
Leu	9,0	344 343 ... 350	302 301 ... 306	274 273 ... 281	200 199 ... 2007		302 301 ... 305
Ile	9,5	344 343 ... 350	302 301 ... 306	274 273 ... 281	200 199 ... 2007		302 301 ... 305
Pro	10,0		286 285 ... 294	258 257 ... 264	184 183 ... 192		
Ser	13,3		390 389 ... 395	362 361 ... 366	288 287 ... 292		302 301 ... 305
Thr	13,8		404 403 ... 410	376 375 ... 381	302 301 ... 306	159 158 ... 163	302 301 ... 305
Phe	14,7		336 335 ... 347	308 307 ... 310	234 233 ... 244	91 90 ... 99	302 301 ... 305
Asp	15,5		418 417 ... 424	390 389 ... 395	316 315 ... 321		302 301 ... 305
Glu	17,0		432 431 ... 438	404 403 ... 410	330 329 ... 336		302 301 ... 305
Lys	18,3		431 430 ... 438		329 328 ... 335		
His	17,0		440 439 ... 447		339 338 ... 345	196 195 ... 203	
Tyr	10,7		466 465 ... 478	438 437 ... 448	364 365 ... 373	221 220 ... 230	302 301 ... 305

Tabelle 2.13: GC/MS-Einstellungen zur Messung von Aminosäuren im SIM-Lauf.

Injektor:	260°C
Interface:	260°C
Temperaturprogramm:	150°C (3 min) → 280°C (3 min); Gradient: 7°C/min
Druckprogramm:	70,4 kPa (3 min) → 150 kPa (3 min); Gradient: 4,4 kPa/min
Total Flow:	10,7 ml/min
Split-Ratio:	1 : 10
Detector Volts:	automatisch aus aktuellen Tuning Parametern
Solvent Cut:	5 min
Sampling Rate:	0,5 s
Micro scan width:	0,2 s

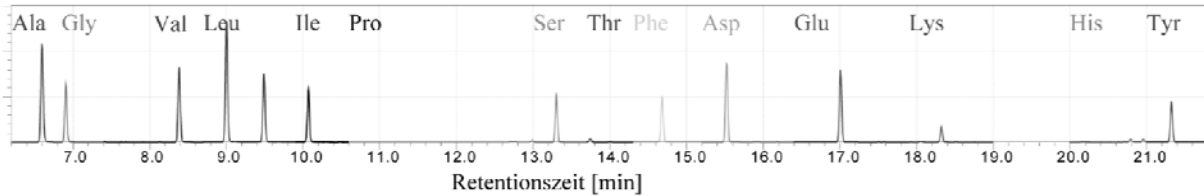
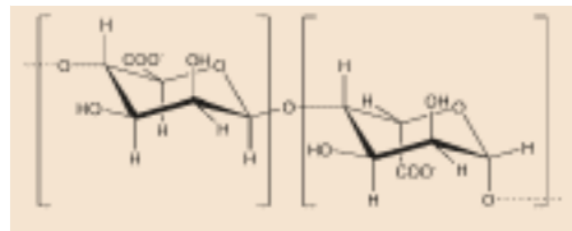


Abbildung 2.7: Chromatogramm einer markierten *Legionella*-Probe im SIM-Lauf.

10.1.2. Alginat

Alginat ist ein Polysaccharid aus den beiden Monomeren α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure, welche 1,4-glykosidisch miteinander verknüpft sind (siehe Abbildung 1.8). Die Synthese von Alginat zur Produktion von Biofilmen und einer damit einhergehenden Adhäsion ist ein typischer Virulenzfaktor von *Pseudomonas aeruginosa* (Hacker and Heesemann, 2005).

Abbildung 2.8: Struktur von Alginat (aus Baldwin and Kiick, 2010).



Extraktion:

Zur Analyse von Alginat muss dieses zunächst aus der Bakterienprobe extrahiert, in dessen Monomere aufgespalten und mit einer geeigneten Derivatisierung zur GC/MS-Analytik aufbereitet werden. Die Extraktion des Alginats fand an der Technischen Universität Braunschweig im Institut der Mikrobiologie in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Max Schobert statt.

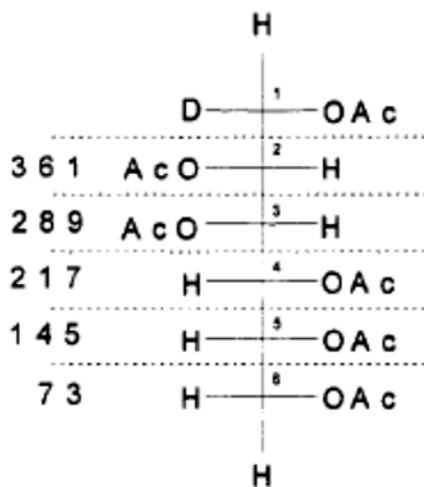
Das Alginat wird aus 10 Plattenkulturen von *Pseudomonas aeruginosa* auf *Pseudomonas* Isolationsagar gewonnen (Inkubation für 24 h bei 37°C). Der entstandene Biofilm wird isoliert, im Verhältnis 1 : 16 mit 0,9%iger NaCl-Lösung suspendiert, für 30 min mit 1.300 rpm bei RT zentrifugiert und anschließend sterilfiltriert (Porengröße: 0,2 μ m). Das Pellet wird mit etwas eiskaltem, vergälltem Ethanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem weiteren Filtrationsschritt wird das Pellet 2-mal mit vergälltem, 1-mal mit

absolutem, eiskalten Ethanol gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Das trockene Präzipitat wird in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,5) mit 2 mM MgCl₂ gelöst (Endkonzentration 2,5 mg/mL). Dazu wird 5 U/mL Benzonase gegeben und für 4 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei 37°C über Nacht mit einer Zugabe von 12,5 µg/mL Proteinase K. Anschließend findet die Aufreinigung mittels Dialyse gegen 2-mal 5 L H₂O_{bidest} statt. Abschließend wird die Probe lyophilisiert.

Probenvorbereitung für die GC/MS-Analytik:

Die trockene Probe wird mit 200 µL 4 M TFA (Trifluoressigsäure; 300 µL/mL) für 4 h bei 100°C inkubiert und anschließend bei 70°C im N₂-Strom getrocknet. Anschließend wird 50 µL Natriumborhydridlösung (100 mg/mL) zugegeben und bei 37°C für 90 min inkubiert. Nun wird die Probe unter N₂-Strom bei RT getrocknet, mit 2 mL Eisessig : Methanol (1 : 200) resuspendiert und 4-mal mit 1 mL Eisessig-Methanol bei 35°C im Rotationsverdampfer eingengt.

Die Probe bei 60°C im N₂-Strom getrocknet und zur Derivatisierung mit 100 µL Pyridin und 100 µL Essigsäureanhydrid über Nacht bei 105°C inkubiert. Die derivatisierte Probe wird bis zur Messung bei 105°C gelagert. Zunächst findet ein Screening der Probe mittels der Alginat-SCAN-Methode statt. Das Injektionsvolumen für den SIM-Lauf kann dann anhand des SCAN-Laufs gewählt werden. Die Messparameter für SCAN- und SIM-Lauf sind in Tabelle 2.14 aufgelistet. Die Messung findet aufgrund der Derivatisierung in Form von Hexaacetaten statt. Im SIM-Lauf werden dabei 3 Fragment-typen gemessen: Ein 1C-Fragment (M = 73), ein 3C-Fragment (M = 217) und ein 5C-Fragment (M = 361), siehe Abbildung 2.9. Die



Herausforderung bei der Auswertung besteht darin, dass bisher kein vollständiges Fragment detektierbar ist, so dass immer alle drei Fragmente betrachtet und kombiniert werden müssen.

Abbildung 2.9: Fragment-Ionen für Mannitol-Hexaacetate (modifiziert nach Higgins *et al.*, 1994).

Tabelle 2.14: SCAN- und SIM-Mode für Alginat.

	SCAN-Mode	SIM-Mode
Injektor:	260°C	260°C
Interface:	260°C	260°C
Temperaturprogramm:	150°C (3 min) – 260°C (3min)	150°C (3 min) – 260°C (3 min)
Druckprogramm:	1,11 mL / min	1,11 mL / min
Total Flow:	15,2 mL / min	15,2 mL / min
Start – Ende:	7 - 19 min	11 - 14 min
Detector Volts:	automatisch aus aktuellen tuning Parametern	automatisch aus aktuellen tuning Parametern
Split:	1:10	1:5
Solvent Cut:	3 min	8 min
Sampling Rate:	0,5 s	0,5 s
Micro Scan width:		0,2 s
Massen-Fragmente (m/z):	50,00 – 600,00	73: 72; 73; 74; 75; 76 217,05: 216,05; 217,05; 218,05; 219,05; 220,05; 221,05; 22,05 361,1: 360,1; 361,1; 362,1; 363,1; 364,1; 365,1; 366,1; 367,1; 368,1

10.2. ¹³C-Isotopologanalysen: Berechnung und Darstellung der Ergebnisse

Zur Berechnung des ¹³C-Überschusses eines Metaboliten und zur Bestimmung des Isotopologmusters (m+1, m+2, ..., m+n mit n = Anzahl der C-Atome im Molekül) werden die Rohdaten, die man durch Integration der Peaks im Chromatogramm (siehe Abbildung 2.7) erhält, in ein Excel-Sheet kopiert. Dabei ist das Excel-Macro mit einer Matrix programmiert, die nach den Annahmen von Pickup und McPherson (1976) und den daraus abgeleiteten Regeln von Lee *et al.* (1991) den ¹³C-Überschuss berechnet (nach Eylert, 2009).

Diese sogenannte *Abundance Matrix* (Braumann; 1966; Korzewka *et al.*, 1990) stellt einen Bezug zwischen den Massen Isotopomer Verteilungen und der individuellen relativen Isotop-Anreicherung her. Der gemessene Metabolit wird bei der Berechnung als ein Gemisch von Substanz und derivatisierende Bestandteile definiert, wodurch der Einfluss des

Derivatisierungsmittels herausgerechnet werden kann. Ebenso wird bei der Berechnung die natürliche Anreicherung von ^{13}C mit 1,1% berücksichtigt und bei der Darstellung der Excess-Werte herausgerechnet, wodurch der rein künstlich hinzugefügte Anteil an ^{13}C dargestellt wird. Als Referenz für die Rechnung dient ein unmarkierter, derivatisierter Standard, dessen Rohdaten parallel zur Probe erhoben wurden.

Die Berechnung der absoluten ^{13}C -Anreicherung (^{13}C -Excess in mol%) erfolgt nach Gleichung 6, wobei m+1 für das Isotopomer angereichert mit einem ^{13}C , m+2 für das Isotopomer, das 2 ^{13}C -Atome anstelle von ^{12}C enthält und m+n (n = Anzahl der C-Atome im untersuchten Molekül) für ein vollmarkiertes Isotopomer steht.

$$[(m+1) + (m+2) * 2 + (m+3) * 3 + \dots(m+n) * n] / n = \text{mol\%}$$

(Gleichung 6)

XY-Notation:

Zur Darstellung der Markierungsmuster wird ein Code mit 4 Variablen gewählt, die XY-Notation (Römisch-Margl *et al.*, 2007). Das C-Gerüst des analysierten Moleküls wird dabei durch einzelne Platzhalter mit den unterschiedlichen Variablen dargestellt.

1: ^{13}C -Atom

0: ^{12}C -Atom

X: unbekannt, ^{12}C oder ^{13}C möglich

Y: bekannte Anzahl an ^{13}C , aber Position unbekannt; Anzahl der ^{13}C -Atome in einem Molekül werden außerhalb geschweifeter Klammern (hochgestellt) angegeben

Im Falle von 3-HB, das aus 4 C-Atomen besteht, bedeutet zum Beispiel ein Ereignis $\{11YY\}^1$, dass sich an C₁- und C₂-Position jeweils ein ^{13}C -Atom befindet, zudem ist noch ein drittes ^{13}C -Atom im Molekülgerüst präsent, es ist jedoch nicht bekannt, ob an Position 3 oder 4.

10.3. Metabolomics

Probenvorbereitung und Derivatisierung:

Die Probenvorbereitung erfolgt wie in Kapitel II 10.1.3. beschrieben. Die aus dem Ribolyseransatz entnommenen 200 μL werden in ein Autosamplerglas überführt, 10 μL eines 5 mM Norvalinstandards (0,5 mM Endkonzentration in der GC/MS-Probe) werden zugegeben und unter N_2 -Strom getrocknet.

Die Derivatisierung der Metabolomics-Proben erfolgt in zwei Schritten. Zunächst wird zu den trockenen Proben 100 μL einer 24 mM Methoxyamin-Hydrochlorid/Pyridin-Lösung (20 mg Methoxyamin pro 1 mL Pyridin) pipettiert und für 90 min bei 40°C im Schüttler inkubiert. In dieser Reaktion werden Aldehyde und Ketone zu thermisch stabileren Methoximen umgewandelt.

Danach wird die Probe erneut im N_2 -Strom eingengt und mit 100 μL MSTFA für 30 min bei 45°C unter Schütteln (190 rpm) derivatisiert, hierbei reagieren Alkohole und Amine zu Silylether bzw. Silylamine und Säuren zu Silylestern.

Probenmessung:

Die GC/MS-Messparameter für polare Metabolite findet sich in Tabelle 2.15.

Tabelle 2.15: SCAN-Mode-Einstellungen zu Messung polarer Metabolite.

Injector:	260°C
Interface:	260°C
Temperaturprogramm:	70°C (5 min) \rightarrow 310°C (1 min); Gradient von 5°C/min
Druck:	3,0 mL/min
Total Flow:	10,7 mL/min
Detector Volts:	automatisch aus aktuellen Tuning Parametern
Event time:	0,5 s
Scan Speed:	1250
Start – Ende (Zeit):	7 – 60 min
Start – Ende (m/z)	50,00 – 600,00

Auswertung und Quantifizierung:

Im Datensatz der Metabolomicsproben von *Legionella* befinden sich jeweils drei biologische Replikate, aus denen jeweils auch drei technische Replikate erstellt wurden. Vorab fand ein Screening der Proben durch Übereinanderlegen der Chromatogramme im GC/MS Postrun Programm statt. Es wurden nur solche Proben, die eine signifikante Reproduzierbarkeit aufwiesen in den Probensatz mit einbezogen.

Eine Zuordnung der Peaks erfolgt mithilfe der NIST Mass Spectral Library und gemessenen Standards. Die Peaks werden einzeln integriert, dabei wird für weitere Konzentrationsangaben auf die ermittelte Fläche Bezug genommen.

Eine relative Quantifizierung der Metabolite wird anhand der gemessenen Area des internen Standards Norvalin gewährleistet. Dafür werden alle detektierten Metabolite bzw. deren Area auf den internen Standard normalisiert und mit dessen Konzentration in der Probe (0,5 mM) verrechnet.

Ebenso wird die relative Abnahme bzw. Zunahme der Konzentration eines Metaboliten (in Prozent) in den Mutanten und *L. oakridgensis* relativ zum WT von *L. pneumophila* berechnet.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Modellorganismus der extrazellulären Infektion – *in vitro*-Studien mit *Yersinia enterocolitica*

Yersinia enterocolitica ist in der Umwelt weit verbreitet und gehört in Europa zu den häufigsten Darminfektionserregern. Vor allem die psychrotolerante Eigenschaft (Bottone, 1997) macht *Y. enterocolitica* zu einem Problemfaktor in der lebensmittelverarbeitenden Industrie. Da *Y. enterocolitica* einen biphasischen Lebenszyklus besitzt, ist eine Regulation der Virulenz erforderlich. Dafür sind die Virulenzfaktoren, wie die Sequenz der Effektorproteine (YOPS) oder das T3SS, plasmidcodiert. *In vitro* wird ein virulentes Stadium, das mit massiver Produktion von YOPS einhergeht, durch eine Temperatur von 37°C und niedrige Ca²⁺-Bedingungen (durch Zugabe von EDTA) simuliert (*LCR*-Phänotyp) (Higuchi *et al.*, 1959; Goguen *et al.*, 1984; Schmid *et al.*, 2009). Eine Besonderheit von *Y. enterocolitica* ist die Vermeidung der Phagozytose. Dies wird durch die Injektion von YOPS, die eine ganze Signalkaskade in der Wirtszelle auslösen, erreicht (Cornelis *et al.*, 1998; Aepfelbacher *et al.*, 1999). Gerade durch ihre wirtszellmodulierenden Eigenschaften haben die YOPS eine herausragende Rolle im Infektionsmodell. Somit sind sie für diese Arbeit von besonderem Interesse, vor allem da noch relativ wenig über deren Synthese bekannt ist.

Eine wichtige Funktion in der negativen Regulation der YOPS-Sezernierung haben die beiden homologen *YscM*-Gene (Stainier *et al.*, 1997; Schmid *et al.*, 2009). Sie können unter anderem mit mehreren Chaperonen interagieren und als Komplex an das Enzym PEPC binden (siehe Kapitel 1.3.2. und 1.6.2.), wobei *YscM1* unter *in vitro*-Bedingungen PEPC inhibiert (IC₅₀ = 4 µM, K_i = 1 µM; Schmid *et al.*, 2009).

Die Mutanten *Δppc*, *ΔyscM1* und *ΔyscM2* wurden gewählt, um den Einfluss der Virulenzfaktoren auf den Glucose- und Glutamin-Stoffwechsel, die CO₂-Fixierung über PEPC und die differentiellen Syntheseraten an proteinogenen AS sowohl in bakteriellem, zellulärem als auch in sezerniertem YOPS aufzudecken. Dazu wurden *in vitro* ¹³C-Perturbationsstudien mit NaH¹³CO₃, [U-¹³C₆]Glucose und [U-¹³C₅]Glutamin unter verschiedenen CaCl₂-Bedingungen im Arbeitskreis von Herrn Dr. Gottfried Wilharm, insbesondere von Frau Julia Hoffmann (Robert Koch-Institut, Wernigerode) durchgeführt. Die Probenpräparation und Analyse erfolgte anschließend im Rahmen dieser Arbeit.

1.1. Der Glucose-Stoffwechsel – *in vitro*-Studien mit [U-¹³C₆]Glucose

1.1.1. ¹³C-Einbauraten in proteinogene Aminosäuren

CaCl₂-Experimente – avirulente Phase:

Unter Ca²⁺-reichen Bedingungen zeigen Wildtyp und die Mutanten $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ eine gleiche *de novo*-Syntheserate der glucogenen Aminosäuren Serin (25-38%), Glutamat (23-28%), Alanin (24-26%) und Aspartat (19-22%). Glycin ist im WT mit ca. 15% um den Faktor 2-3 stärker markiert als in $\Delta yscM1/2$ (4-6%) (Abbildung 3.1. und Tabelle A.1 im Anhang). Vergleichbar höhere ¹³C-Einbauraten finden sich im WT auch in den AS Isoleucin (WT: 14%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 4-7%), Threonin (WT: 13%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 2-5%), Tyrosin (WT: 11%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 2-4%), Valin (WT: 7-11%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 2-6%) und Phenylalanin (WT: 9%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 1-3%). In der Mutante Δppc ist hauptsächlich ein ¹³C-Einbau in Serin (26-29%) und in Alanin (23%) mit vergleichbaren Raten wie im WT zu sehen. Auffällig ist der relativ geringe ¹³C-Überschuss in Aspartat (6%) und Glutamat (ca. 10%), den AS mit TCA-Zyklus-Intermediaten als Vorstufen (Abbildung 3.1. und Tabelle A.1). Dies ist bedingt durch den Mangel an PEPC (PEPC-Rkt siehe Kapitel I.3).

EGTA-Experimente – virulente Phase:

Unter niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen im Medium und bei 37°C wird das virulente Stadium des biphasischen Lebenszykluses von *Y. enterocolitica* simuliert. Im zellulären Protein werden vergleichbare ¹³C-Einbauraten in die glucogenen Aminosäuren erzielt wie in der avirulenten Phase. Die Mutanten $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ weisen dabei ähnliche ¹³C-Excess-Werte auf wie der WT in Glutamat (18-27%), Alanin (23-27%) und Aspartat (16-20%) (Abbildung 3.1. und Tabelle A.2 im Anhang). Daneben sind Serin und Glycin im WT (Ser: 34-35%, Gly: 10-14%) um den Faktor 1,75 bzw. 2,3 höher markiert als in den $\Delta yscM1/2$ Mutanten (Ser: 20%, Gly: 3-6%). Im WT findet ebenfalls ein stärkerer ¹³C-Einbau in den AS Isoleucin (WT: 11%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 4-7%), Threonin (WT: 10-11%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 2-3%), Tyrosin (WT: 7%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : ~1%), Valin (WT: 4-7%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 2-6%) und Phenylalanin (WT: 4-7%, $\Delta yscM1/2$ und Δppc : 1-3%) statt. Dies ist verglichen mit den CaCl₂-Versuchen leicht reduziert. Wie schon in den CaCl₂-Experimenten beobachtet, ist in der Mutante Δppc bei Glu (10%) und Asp (5%) eine im Vergleich zum WT und $\Delta yscM1/2$ geringe ¹³C-Einbaurate zu sehen (siehe Abbildung 3.1.

und Tabelle A.2), was an der deletierten PEPC-Reaktion liegt.

Aus den EGTA-Versuchen können aus dem Überstand die ins Medium sezernierten YOPS mithilfe von Trichloressigsäure ausgefällt und separat analysiert werden. Aufgrund der geringen Probenmenge geben lediglich die AS Ala, Asp, Glu, Gly und Ser aussagekräftige Messwerte (Abbildung 3.1 und Tabelle A.3 im Anhang). Auffällig sind die relativ geringen ^{13}C -Einbauraten in den YOPS des WTs. Es werden *de novo* die glucogenen AS Ser (9-20%), Asp (12%), Ala (9%), Glu (2-7%), Gly (5%) im WT aus ^{13}C -Glucose synthetisiert. Ähnliche Markierungsraten werden in der Mutante Δppc mit Ser (20-24%), Ala (15%), Gly (6%), niedriger in Asp (3-9%) und kaum in Glu (0,3%) erreicht. Somit ist der Einbau in Serin und Alanin im Vergleich zum WT verstärkt. Der niedrige ^{13}C -Einbau in Asp und Glu erklärt sich über die Deletion der anaplerotischen Reaktion durch die PEPC. Die YOPS der beiden $\Delta yscM$ Mutanten sind in Ala (25-28%), Asp (15%), Ser (25-34%) und Gly (5%) ähnlich hoch markiert wie das zelluläre Protein. Im Vergleich zu zellulärem Protein findet eine 2- bis 3-fach niedrigere *de novo*-Synthese an Glutamat (~2%) zur Produktion von YOPS statt. Dementsprechend list es naheliegend, dass die Syntheseraten an Glu nicht zur massiven Produktion an YOPS ausreichen, sondern vielmehr direkt Glu oder Gln aufgenommen und in das Outer Protein assimiliert werden muss, wie die Studien mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$ bestätigen werden.

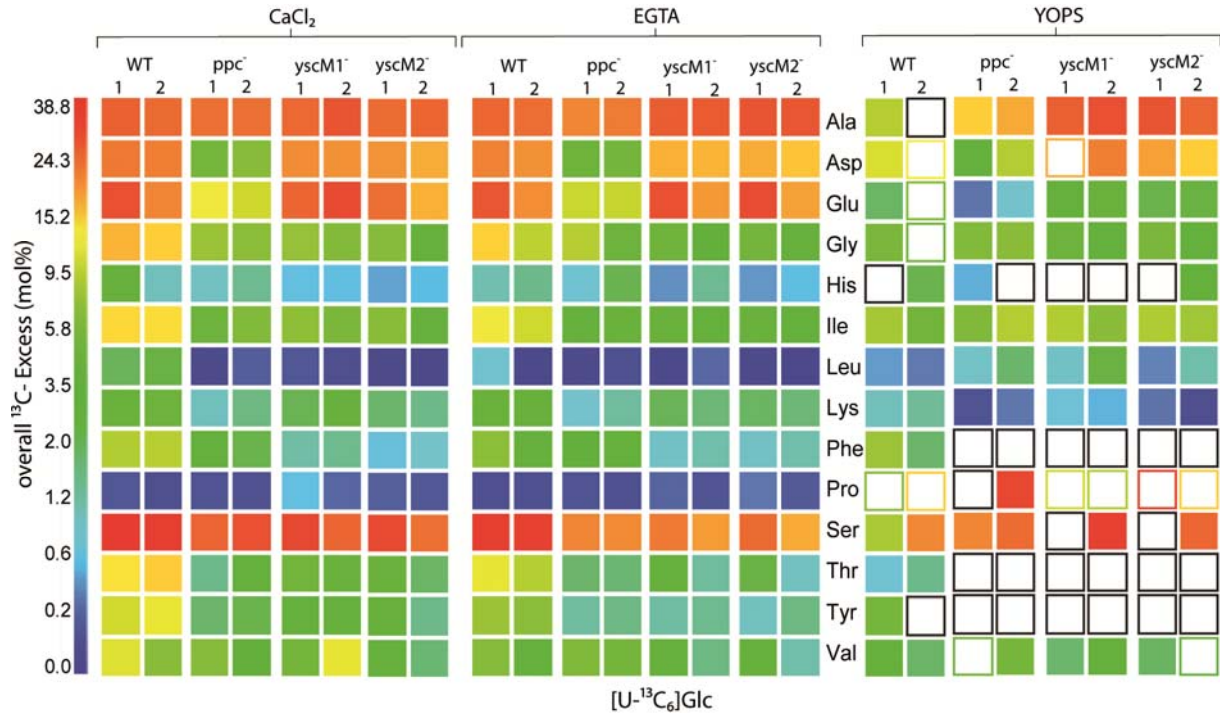


Abbildung 3.1: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von *Y. enterocolitica* und sezernierter YOPS in Anwesenheit von 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologisches Replikate durchgeführt. Die Werte sind in quasi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. AS mit weißen, bunten (entspricht dem errechneten ^{13}C -Excesswert) Kästchen weisen hohe S.D. ($> 1\%$) auf. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 1 aufgelistet.

1.1.2. Isotopologmuster

Die proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Ser und Gly von *Y. enterocolitica* sind in der Isotopolog-Zusammensetzung in der avirulenten und virulenten Phase gleich (Abbildung 3.2.). Dementsprechend sind die *de novo*-Synthesewege für zelluläres Protein und die YOPS in den unterschiedlichen Phasen des Lebenszyklus gleich, nicht jedoch die Syntheseraten (siehe oben). Die beiden ΔyscM -Mutanten haben ähnliche Isotopolog-Profile, wie der Wildtyp. Signifikante Unterschiede treten bei der Δppc -Mutante auf.

Serin: Glucose wird über die Glycolyse und den PPP-Weg zu $[\text{C}_3]$ -3-Phosphoglycerinaldehyd abgebaut, welches zum einen in $[\text{C}_3]$ -Serin (Abbildung 3.2 und 3.3) resultiert und zum anderen weiter über $[\text{C}_3]$ -PEP zu $[\text{C}_3]$ -Pyruvat verstoffwechselt wird.

Alanin: Aus dem vollmarkierten Pyruvat entsteht einerseits [¹³C₃]-Alanin (Abbildung 3.2 und 3.3) und andererseits [¹³C₂]Acetyl-CoA, wobei letzteres in den TCA-Zyklus eingeschleust wird. Der geringe Anteil an M+2-Markierung geht auf die Aktivität des Malic-Enzyms zurück (siehe Abbildung 3.3).

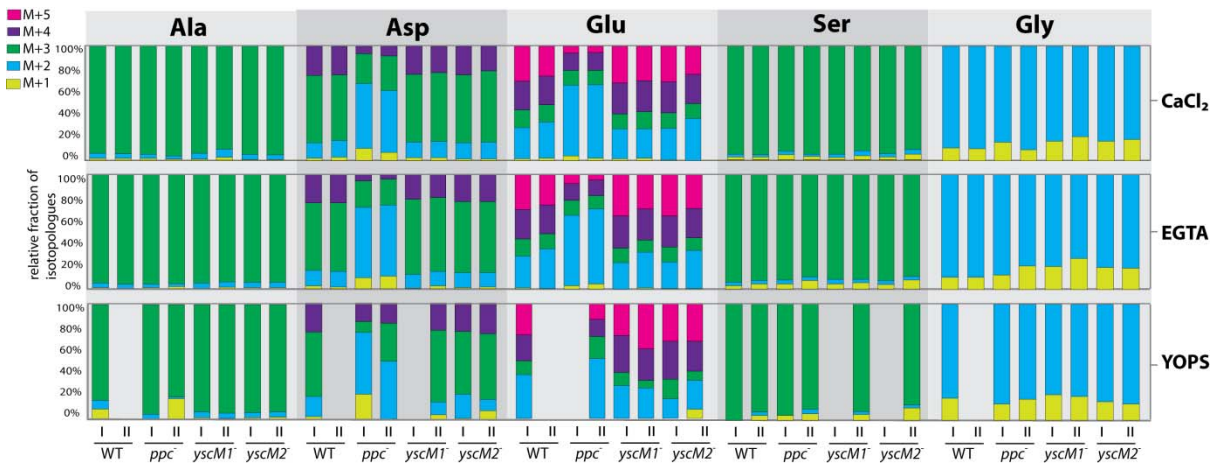


Abbildung 3.2: Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Ser und Gly von zellulärem- und sezerniertem Effektor-Protein (YOPS) von *Y. enterocolitica* unter CaCl₂- und EGTA-Bedingungen in Anwesenheit von 10 mM [U-¹³C₆]Glucose.

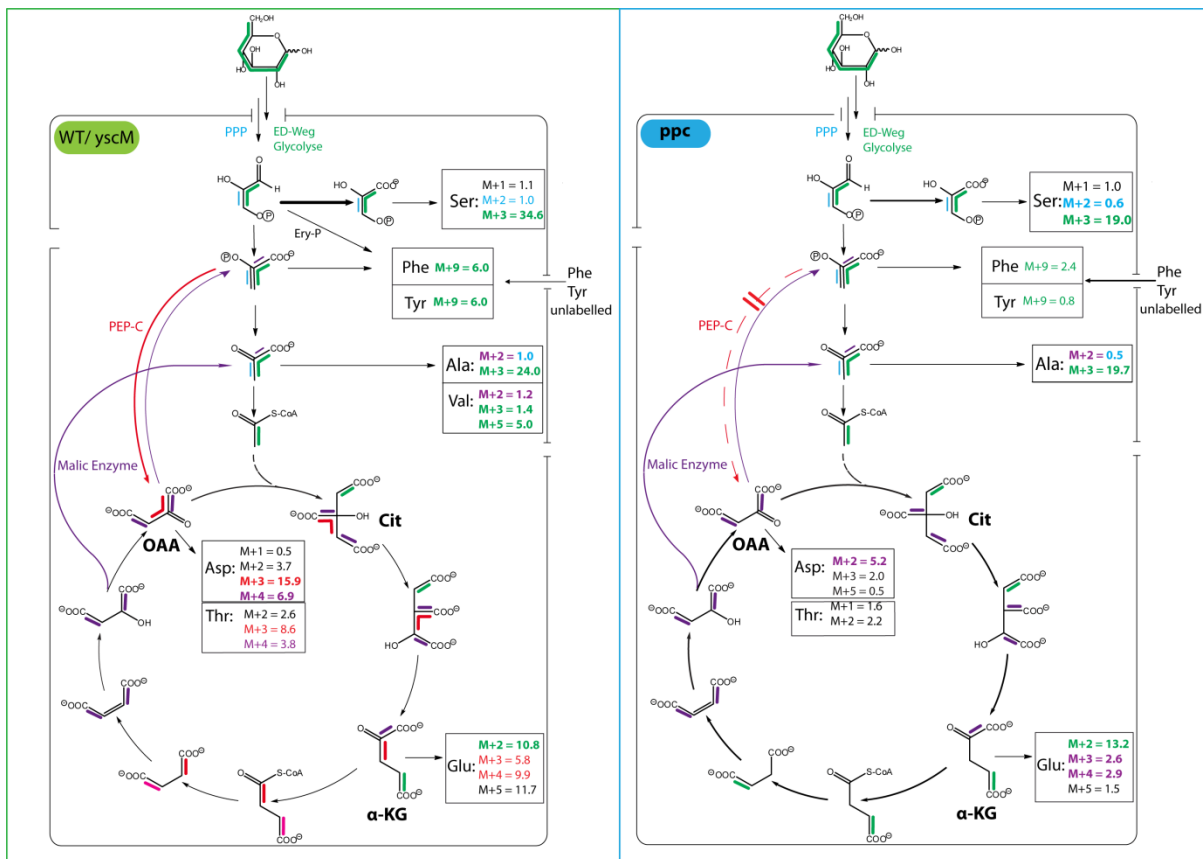


Abbildung 3.3: Verstoffwechslung von Glucose in *Y. enterocolitica* WT, Δ*yscM1/2* und Δ*ppc* (Zahlenwerte sind exemplarisch aus zellulärem Protein).

Aspartat: Im WT und in den $\Delta yscM$ -Mutanten sind die Isotopologe $[^{13}\text{C}_3]> [^{13}\text{C}_4]> [^{13}\text{C}_2]$ vorhanden (Abbildung 3.2). Dabei entsteht die 3-fach Markierung über die PEPC-katalysierte Carboxylierung von $[^{13}\text{C}_3]$ -PEP zu $[^{13}\text{C}_3]$ -OAA (Abbildung 3.3). Die 2-fach Markierung resultiert, durch den Eintritt von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus (Abbildung 3.3). Die Vollmarkierung wird durch erneutes Durchlaufen des TCA-Zyklus (Recycling) und durch Übertragung von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA auf $[^{13}\text{C}_3]$ OAA gebildet. In der Δppc -Mutante manifestiert sich die Deletion des PEPC-Enzyms. In dieser Mutante ist hauptsächlich eine M+2-Markierung vorhanden, welche durch den Eintritt von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus verursacht wird (Abbildung 3.3). Die $[^{13}\text{C}_3]$ - und $[^{13}\text{C}_4]$ -Isotopologe sind lediglich relativ gering vorhanden und entstehen durch Shuffling und Recycling.

Glutamat: Auch im Glutamat-Profil ähneln sich WT und die beiden $\Delta yscM$ -Mutanten. Hierbei treten $[^{13}\text{C}_5]> [^{13}\text{C}_2]> [^{13}\text{C}_4]$ -Isotopologe auf (Abbildung 3.2). Das durchmarkierte Glutamat entsteht durch die Übertragung von $[^{13}\text{C}_2]$ Acetyl-CoA auf $[^{13}\text{C}_3]$ OAA. Die M+2- und M+4-Markierung entstehen durch das Einschleusen von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus auf unmarkiertes OAA, bzw. durch Recycling von $[^{13}\text{C}_2]$ -OAA (Abbildung 3.3). Die 3-fach-Markierung tritt auf, wenn unmarkiertes Acetyl-CoA auf $[^{13}\text{C}_3]$ OAA übertragen wird. In der Δppc -Mutante ist vorwiegend $[^{13}\text{C}_2]$ -Glu vorhanden, das durch den Eintritt von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus hervorgerufen wird (Abbildung 3.3).

Glycin: Das Isotopolog-Profil von Glycin spiegelt nicht eins zu eins das von Serin wieder. Die Vollmarkierung kann durch die Umwandlung von 3-fach-markiertem Ser zu 2-fach-markiertem Gly entstehen. Der vergleichsweise hohe Anteil an Einfach-Markierung ist so jedoch nicht erklärbar und könnte durch die Glycinsynthase-Aktivität verursacht sein (siehe CO_2 -Fixierung in Kapitel III.1.2).

1.2. CO₂-Fixierung in *Y. enterocolitica* - *in vitro*-Studien mit NaH¹³CO₃

1.2.1. ¹³C-Inkorporationsrate aus NaH¹³CO₃

CaCl₂-Experimente – avirulente Phase:

Die Aminosäuren Ala, Pro, Tyr, Ser, His, Lys, Phe und Val sind unter allen Versuchsbedingungen für WT und Mutanten relativ gering (<0,5%) ¹³C-markiert. Der ¹³C-Überschuss in Ile ist in Δppc etwas niedriger als im WT und den beiden $\Delta yscM1/2$ Mutanten. Aspartat ist die AS mit der höchsten ¹³C-Einbaurrate (ca. 4%) im WT und in den beiden $\Delta yscM1/2$ Mutanten, gefolgt von Thr und Glu (Abbildung 3.4 und Tabelle A.4). Dies liegt an der CO₂-fixierenden Eigenschaft von PEPC. Dementsprechend sind diese AS in der Δppc -Mutante nicht markiert. Hervorzuheben ist die relativ hohe ¹³C-Markierung im Glycin, die sowohl im WT als auch in den Mutanten und in der Δppc -Mutante sogar stärker als im WT vorhanden ist (Abbildung 3.4 und Tabelle A.4).

EGTA-Experimente – virulente Phase:

Die ¹³C-Einbauraten in die Aminosäuren des zellulären Proteins entsprechen denen im avirulenten Zustand (siehe Abschnitt oben). Etwas anders stellt sich dies für die sezernierten YOPS dar. In WT und den beiden $\Delta yscM1/2$ Mutanten findet sich gegenüber dem zellulären Protein eine erhöhte ¹³C-Einbaurrate in Asp (5 bis 6%) und in Ala (~1%), wobei die ¹³C-Inkorporation in das Asp der $\Delta yscM1/2$ -Mutanten höher ist als im WT. Gleichzeitig nimmt der ¹³C-Überschuss im Glutamat ab (auf <0,5%). Besonders interessant ist die vergleichsweise hohe ¹³C-Einbaurrate sowohl im WT als auch in allen Deletionsmutanten in Glycin (4 bis 6%) bei simultan niedrigem Einbau in Serin (Abbildung 3.4).

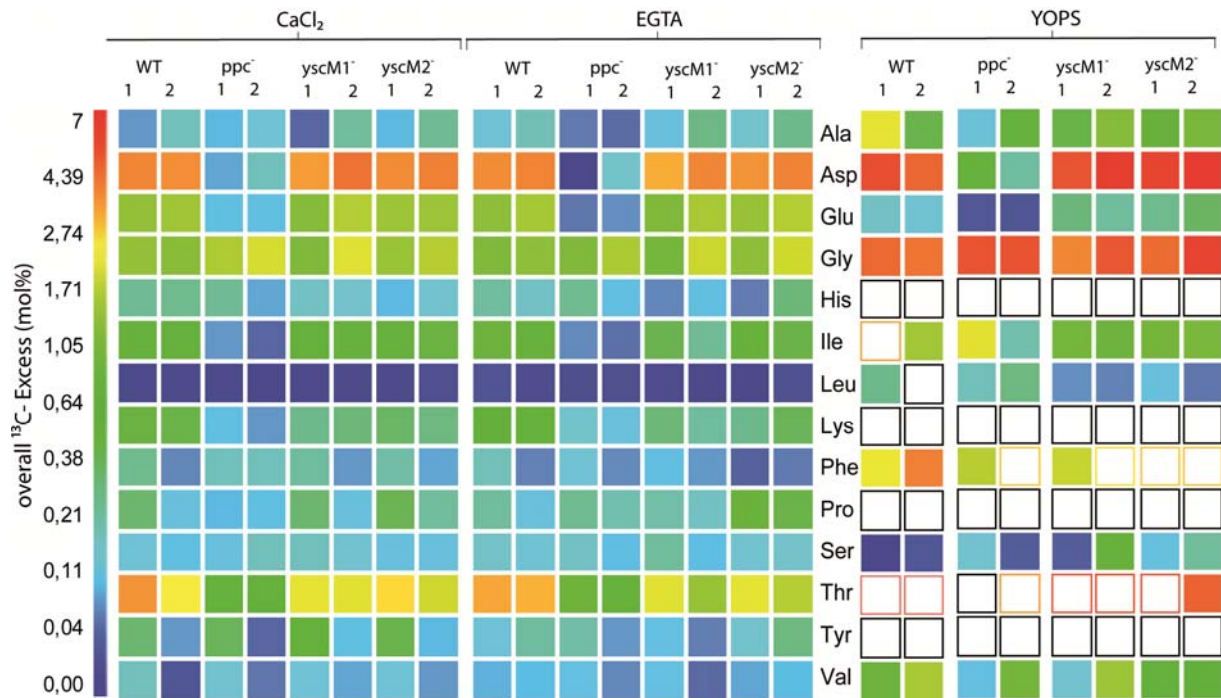


Abbildung 3.4: Overall-¹³C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von *Y. enterocolitica* und sezernierter YOPS in Anwesenheit von 14 mM NaH¹³CO₃. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologisches Replikat durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ¹³C-Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. AS mit weißen, bunt-umrahmten (entspricht dem errechneten ¹³C-Excesswert) Kästchen weisen hohe S.D. (> 1%) auf. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 1 aufgelistet.

Durch die Fixierung von ¹³CO₂ über das im Medium vorhandene NaH¹³CO₃ wird ein markierter C1-Baustein in die Metabolite eingetragen. Dabei ist die ¹³C-Einbaurrate in den YOPS vergleichsweise höher für Ala, Asp, Gly und Val und niedriger in Glu als bei dem zellulären Protein (Abbildung 3.4). Dementsprechend sind die betroffenen Biosynthesewege der einzelnen AS unterschiedlich aktiv für zelluläres und sezerniertes Protein.

1.2.2. Isotopologmuster

Der Eintrag von ¹³CO₂ verursacht ausschließlich eine M+1-Einfachmarkierung in den proteinogenen Aminosäuren. Durch einen Vergleich der einzelnen Fragment-Ionen kann die Position der Einfachmarkierung bestimmt werden. In allen markierten AS befindet sich die ¹³C-Anreicherung in der Säuregruppe (*data not shown*). Aspartat und Glutamat besitzen zwei Säuregruppen (Abbildung 3.4), wobei durch den TCA-Zyklus eine Teilsymmetrisierung (da das Intermediat Fumarat, welches ein Inversionszentrum besitzt, achiral ist, sind die C1- und C4-Atome bei der Reaktion zu Malat chemisch äquivalent) auftritt, so dass immer nur jeweils

eine Säuregruppe markiert ist (prozentuale Aufteilung siehe Abbildung 3.5).



Abbildung 3.5: M+1-Markierungsmuster in a) Glutamat, b) Threonin und c) Aspartat. Der schwarze Punkt repräsentiert ein ^{13}C -Atom im Molekülgerüst (modifiziert nach Breier, 2012).

1.3. Der Glutamin-Stoffwechsel – *in vitro*-Studien mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$

1.3.1. ^{13}C -Einbaurate aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$

Zelluläres Protein:

Sowohl im WT als auch in den Mutanten findet sich ein Eintrag von ^{13}C aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$ in die Aminosäuren der Glutamat- und Aspartat-Familie. Exogenes markiertes Glutamin wird zur Synthese von zellulärem Protein aufgenommen und via Glutaminolyse zu Glutamat umgewandelt. Dies findet verstärkt im WT und in Δppc , vor allem im avirulenten Zustand statt (Glu: 14-25%). Vergleichsweise leicht gedrosselt ist die ^{13}C -Einbaurate in Glutamat bei $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ (10-11%). Entsprechend zur Markierung im Glutamat, findet sich eine ^{13}C -Anreicherung auch in Prolin (0,4-1%). Glutamat kann als $\alpha\text{-KG}$ in den TCA-Zyklus eintreten. Dementsprechend findet sich auch eine Markierung in Asp zu 3% in WT und $\Delta yscM1/2$ und zu 6% in Δppc und in Thr (1-2%). Die weitere Verstoffwechslung im TCA-Zyklus zu Asp ist in der Mutante Δppc circa doppelt so aktiv (Werte siehe Tabelle A.7 und A.8 im Anhang; Abbildung 3.6).

Im virulenten Zustand finden sich leicht erniedrigte ^{13}C -Einbauraten in allen markierten AS (Tabelle A.8, Abbildung 3.6).

Eine Gluconeogenese aus Glutamin, und damit eine *de novo*-Synthese von Ser findet unter diesen Umgebungsbedingungen nicht statt.

Effektorproteine:

Während der virulenten Phase kommt es zu einer massiven Produktion an YOPS. Dies spiegelt sich wieder in den sehr hohen ^{13}C -Einbauraten von nahezu 90% in Glu, aber auch in Asp (WT und $\Delta yscM$ -Mutanten: 4-5%; Δppc : 8%), Ala (1-1,5%) und Gly (4-5%) (Tabelle A.9 im Anhang, Abbildung 3.8). Die Glutaminolyse ist somit der Hauptlieferant an Glu für die Synthese von YOPS. Daneben findet noch ein Eintrag von ^{13}C -Markierung über α -KG in den TCA-Zyklus und somit in Asp statt. Neben einer vermuteten erhöhten Glycinsynthese-Aktivität (M+1-Markierung in Gly) findet auch eine erhöhte *de novo*-Synthese von Ala aus Pyruvat statt. Eine Gluconeogenese aus Glutamin findet unter diesen Bedingungen nicht statt.

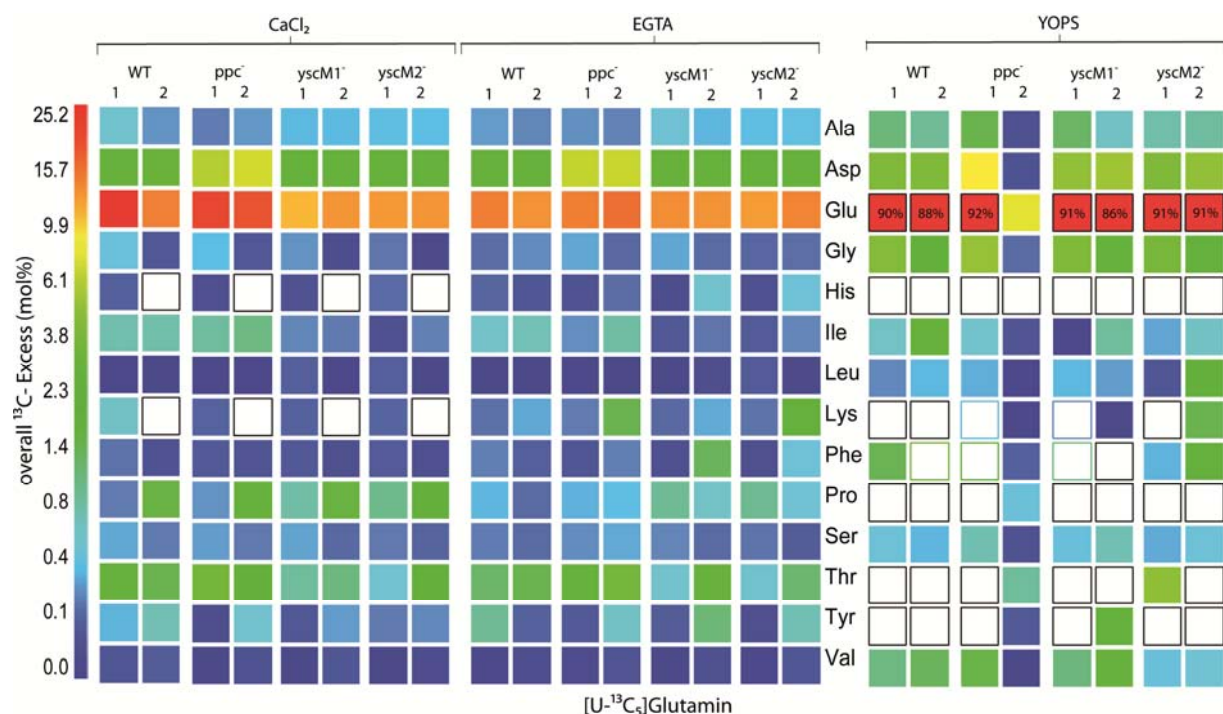


Abbildung 3.6: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von *Y. enterocolitica* und sezernierter YOPS in Anwesenheit von 2 mM [U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologisches Replikat durchgeführt. Die Werte sind in quasi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. AS mit weißen, bunten (entspricht dem errechneten ^{13}C -Excesswert) Kästchen weisen hohe S.D. (> 1%) auf. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 1 aufgelistet.

1.3.2. Isotopologmuster

Durch die Zugabe von [U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin werden vor allem die proteinogenen AS Asp, Glu, Pro und Thr markiert, d.h. die AS mit direkten Vorstufen aus dem TCA-Zyklus. Zusätzlich ist in das Gly der Effektorproteine eine verstärkte ^{13}C -Einbaurate in Form von einer

Einfachmarkierung an der Säuregruppe zu sehen. Dies wird vermutlich durch eine erhöhte Glycinsynthase-Aktivität aufgrund massiver Produktion an YOPS verursacht. Zudem ist generell ein erhöhter Einbau aus Glutamin in den YOPS, aufgrund der rapiden Synthese der Effektorproteine, feststellbar, so dass zusätzlich mehr $^{13}\text{CO}_2$ bei der Synthese von Asp im TCA-Zyklus (Abbildung 3.11) anfällt, welches wiederum in Glycin fixiert werden könnte.

Glutamat: Die Isotopologmuster von WT, $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ weisen im zellulären Protein hauptsächlich $^{13}\text{C}_5$ - und $^{13}\text{C}_3$ -Isotopologe auf (Abbildung 3.7.; CaCl_2 und EGTA). Glutamin wird dementsprechend in die Zellen aufgenommen und via Glutaminolyse zu Glutamat umgewandelt ($^{13}\text{C}_5$ -Spezies). Des Weiteren kann Glu weiter als $^{13}\text{C}_5$ - α -KG in den TCA-Zyklus eintreten, wodurch $^{13}\text{C}_4$ -OAA und in einem weiteren Durchlaufen des TCA-Zyklus wiederum $^{13}\text{C}_3$ -Glu entsteht. Eine leicht erhöhte TCA-Zyklus-Aktivität (mehr M+3) ist in der Δppc -Mutante zu sehen. Die Isotopologmuster in den Zellproteinen sind somit von einem weiteren Umbau charakterisiert. Anders dagegen ist in den Effektorproteinen der Einbau von Glutamat aus Glutamin fast 1:1 (ca. 90%). Dementsprechend ist das Effektorproteinogene Glu fast ausschließlich M+5-markiert.

Aspartat: Die Isotopologmuster von WT, $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ zeigen im zellulären Protein hauptsächlich eine Vollmarkierung (Abbildung 3.7.; CaCl_2 und EGTA). Dies ist verursacht durch Eintrag der Vollmarkierung aus Gln über $^{13}\text{C}_5$ -Glu und weiter über $^{13}\text{C}_5$ - α -KG in den TCA-Zyklus. Dadurch entsteht $^{13}\text{C}_4$ -OAA und dementsprechend $^{13}\text{C}_4$ -Asp. Wie schon im Isotopologmuster von Glu beobachtet, findet in der Δppc -Mutante eine etwas erhöhte Recycling-Rate statt. Dadurch tritt im Asp, durch ein erneutes Durchlaufen des TCA-Zyklus, eine verstärkte M+2-Markierung auf.

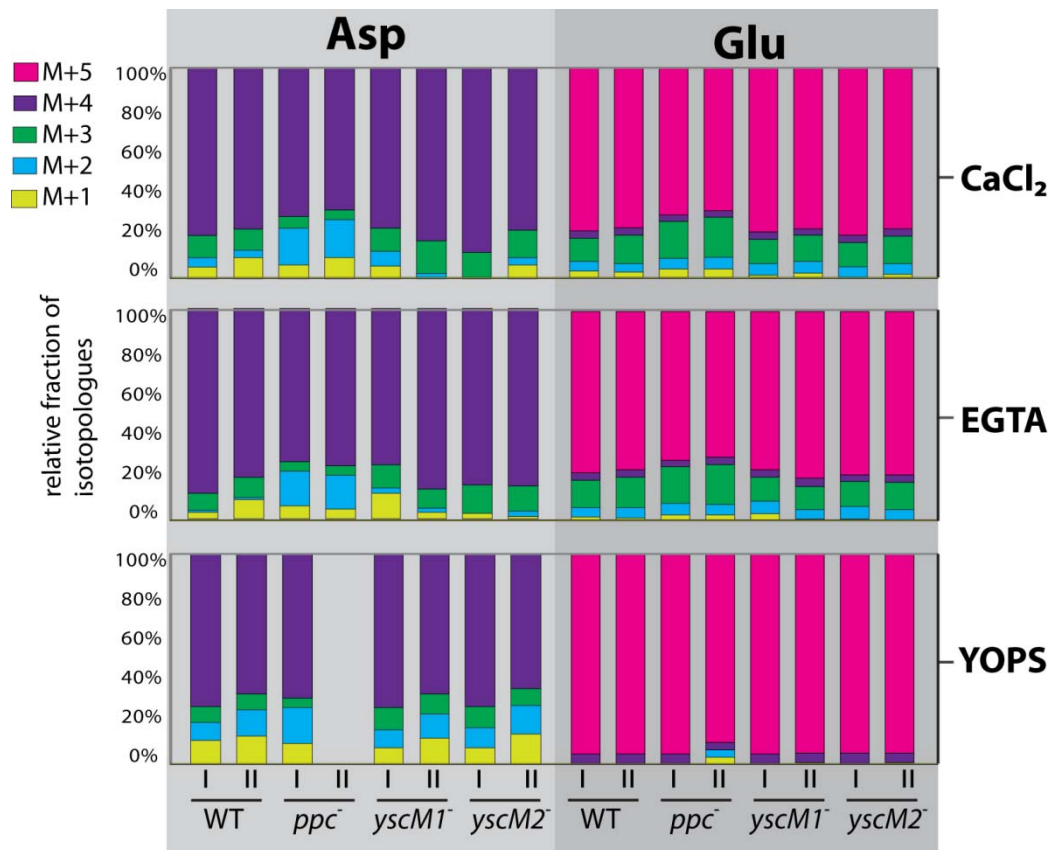


Abbildung 3.7: Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Asp und Glu von zellulärem- und sezerniertem Effektor-Protein (YOPS) von *Y. enterocolitica* unter CaCl₂- und EGTA-Bedingungen in Anwesenheit von 2 mM [U-¹³C₅]Glutamin.

1.4. Diskussion

1.4.1. Verwertung von Glucose

Die Ergebnisse für das zelluläre Protein aus den [U-¹³C₆]Glucose Experimenten unter EGTA-Bedingungen stimmen sehr gut mit bereits publizierten U-Glucose-Experimenten überein (Schmid *et al.*, 2009).

Aus den ¹³C-Excess-Werten und den Isotopologmustern der proteinogenen AS der CaCl₂- und EGTA-Versuche lassen sich die Reaktionsnetzwerke des zentralen Kohlenstoffmetabolismus in *Y. enterocolitica* in den verschiedenen Lebenszyklusphasen, sowie die Biosynthesewege der YOPS-Produktion rekonstruieren.

Die Isotopolog-Profile belegen einen gleichbleibenden Kohlenstoffmetabolismus für das zelluläre Protein (Zellmembranen und andere Zellbestandteile) in den unterschiedlichen simulierten Lebensphasen von *Y. enterocolitica*. Ein ¹³C-Einbau aus [U-¹³C₆]Glucose findet

vor allem in Serin und Alanin im WT und in allen Mutanten statt. Dabei wird der markierte C6-Zucker über die Glycolyse, oder den ED-Weg hin zu [$^{13}\text{C}_3$]-3-PGA, bzw. [$^{13}\text{C}_3$]-Pyruvat und dementsprechend zu [$^{13}\text{C}_3$]Ser und [$^{13}\text{C}_3$]Ala abgebaut (Abbildung 3.8). Ebenfalls hohe ^{13}C -Inkorporationsraten sind in Asp und Glu im WT und den Mutanten $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ zu beobachten. Das Aspartat-Isotopolog-Profil belegt dabei eine entscheidende Rolle der anaplerotischen Funktion von PEPC (M+3), aber auch eine starke TCA-Zyklus Aktivität (M+2 und M+4). Die Isotopolog-Profile des Glutamats bestärken dies. So findet sich auch im Glutamat die ^{13}C -eintragende PEPC-Reaktivität bei gleichzeitiger Zufuhr an ^{13}C in den TCA-Zyklus über [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA. Die geringen Markierungen von Asp und Glu in der Mutante Δppc besitzen eine TCA-Signatur (Abbildung 3.8). Durch die vergleichsweise niedrigen ^{13}C -Einbauraten bei Deletion der PEPC wird deutlich, welchen signifikanten Beitrag diese zum Aufrechterhalten des TCA-Zyklus hat (siehe auch Schmid *et al.*, 2009).

Die Synthese der Effektorproteine geschieht relativ massiv im virulenten Stadium und ist zur erfolgreichen Infektion des Wirtsorganismus obligat. Aus den Isotopolog-Profilen von Ala, Asp und Ser wird deutlich, dass die *de novo* Synthese aus Glucose allein nicht reicht, um den massiven Bedarf an AS zur YOPS-Produktion zu erfüllen. Durch die Deletion der homologen *yscM*-Gene geschieht eine, im Vergleich zum WT erhöhte Einbauraten in Ala und Ser. Somit wird die *de novo* Synthese aus Glucose durch diese beiden Gene im WT etwas gedrosselt. Ein signifikanter Effekt auf die YOPS-Synthese ist damit aufgedeckt.

Auffallend ist des Weiteren die geringe ^{13}C -Inkorporationsrate in Glu und Gly, aber auch in Ala und Asp - im Vergleich zum zellulären Protein des WTs (Abbildung 3.8). Dies bestärkt die These, dass die *de novo* Synthese aus Glucose nicht effizient genug ist, um die rasante Produktion an AS für die Effektorproteinsynthese zu gewährleisten. Daher werden bevorzugt unmarkierte Vorstufen, wie z.B. Aminosäuren, direkt aus dem Medium aufgenommen.

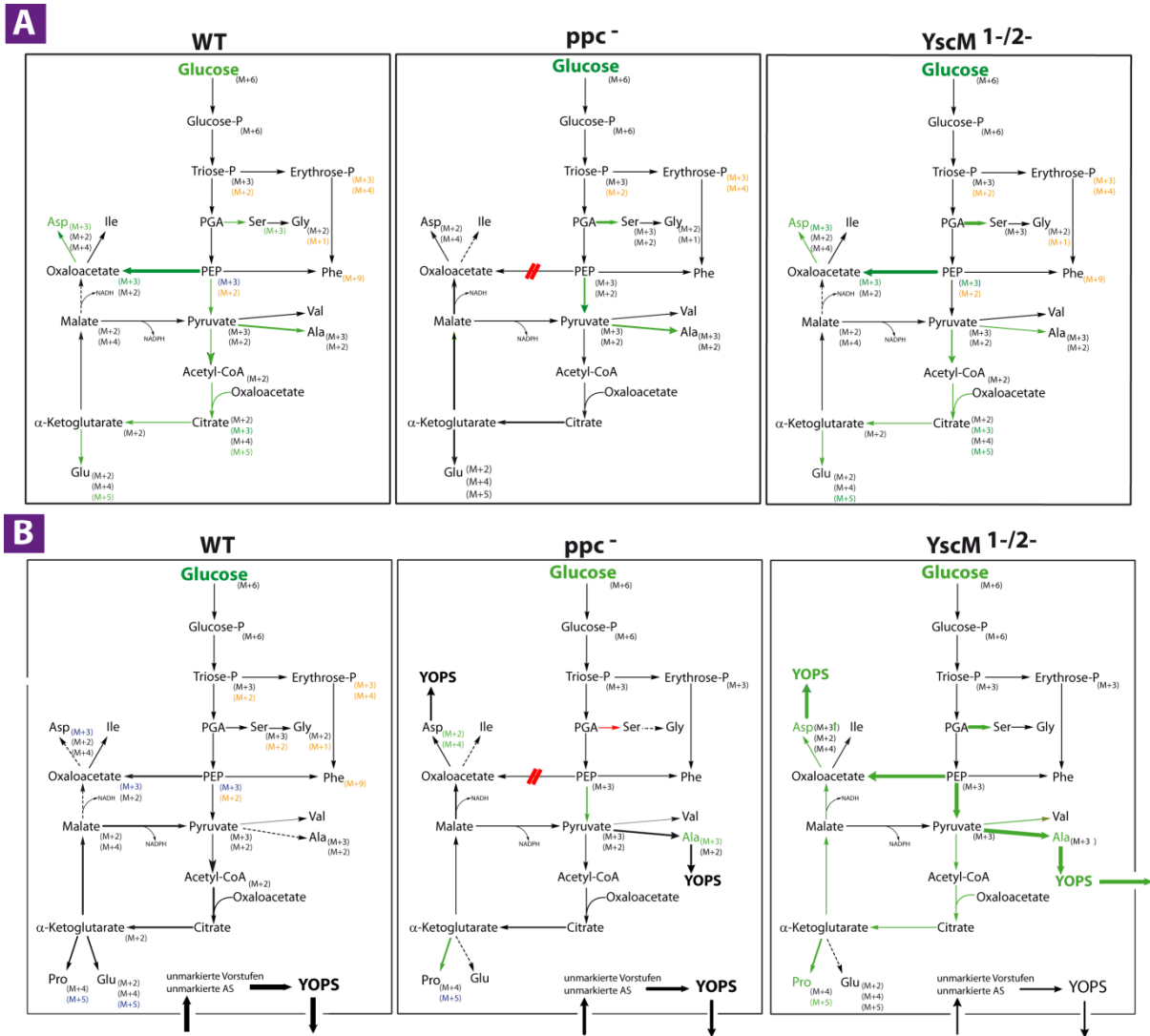


Abbildung 3.8: Reaktionsnetzwerk des (A) zentralen Kohlenstoffmetabolismus und (B) der Synthese von YOPS in *Y. enterocolitica* WT und den Deletionsmutanten $\Delta yscM1$, $\Delta yscM2$ und Δppc . Das Modell basiert auf Experimenten mit 10 mM $[U-^{13}C_6]$ Glc und $CaCl_2$ - und EGTA-Bedingungen. Grüne Pfeile markieren den erhöhten Fluss, der zu den grün hervorgehobenen Isotopologen führt.

1.4.2. CO₂-Fixierung in *Y. enterocolitica*

Zelluläres Protein:

Wie aus den ¹³C-Excesswerten abgeleitet werden kann, ist die ¹³C-Einbaurate – und damit der Grad an CO₂-Fixierung über die PEPC-Aktivität – in den beiden $\Delta yscM1/2$ -Mutanten vergleichsweise ähnlich wie im WT (Abbildung 3.9). Durch die Carboxylierung von PEP zu OAA wird ein ¹³C-markierter C1-Baustein in den TCA-Zyklus eingetragen. Dadurch entsteht einfach-markiertes Aspartat (ca. 4%), Threonin (ca. 2,5%), sowie Glutamat (ca. 1,5%) (Abbildung 3.9). Somit ist die PEPC-Aktivität ein wichtiger Beitrag zur CO₂-Fixierung und zur Anaplerose des TCA-Zyklus in *Y. enterocolitica* unter diesen Versuchsbedingungen. Sie wird zumindest in zellulärem Protein (also Zellbestandteilen) nicht von Virulenzfaktoren beeinflusst. Ebenfalls hat die Deletion von $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ keinen Einfluss auf die ¹³C-Einbaurate. Der Hauptteil der proteinogenen AS für die zellulären Bestandteile entsteht allerdings aus unmarkierten Vorstufen oder wird aus dem Medium aufgenommen und nicht über eine hohe anaplerotische Aktivität. Des weiteren hängt die Höhe der Einbauraten auch von der Markieungsdauer ab, die hier mit 2 h relativ gering ist.

Die CO₂-Fixierung über PEPC ist in der Mutante Δppc deletiert. Dementsprechend findet sich kein Eintrag von ¹³CO₂ in den TCA-Zyklus und damit auch nicht in Asp, Thr und Glu.

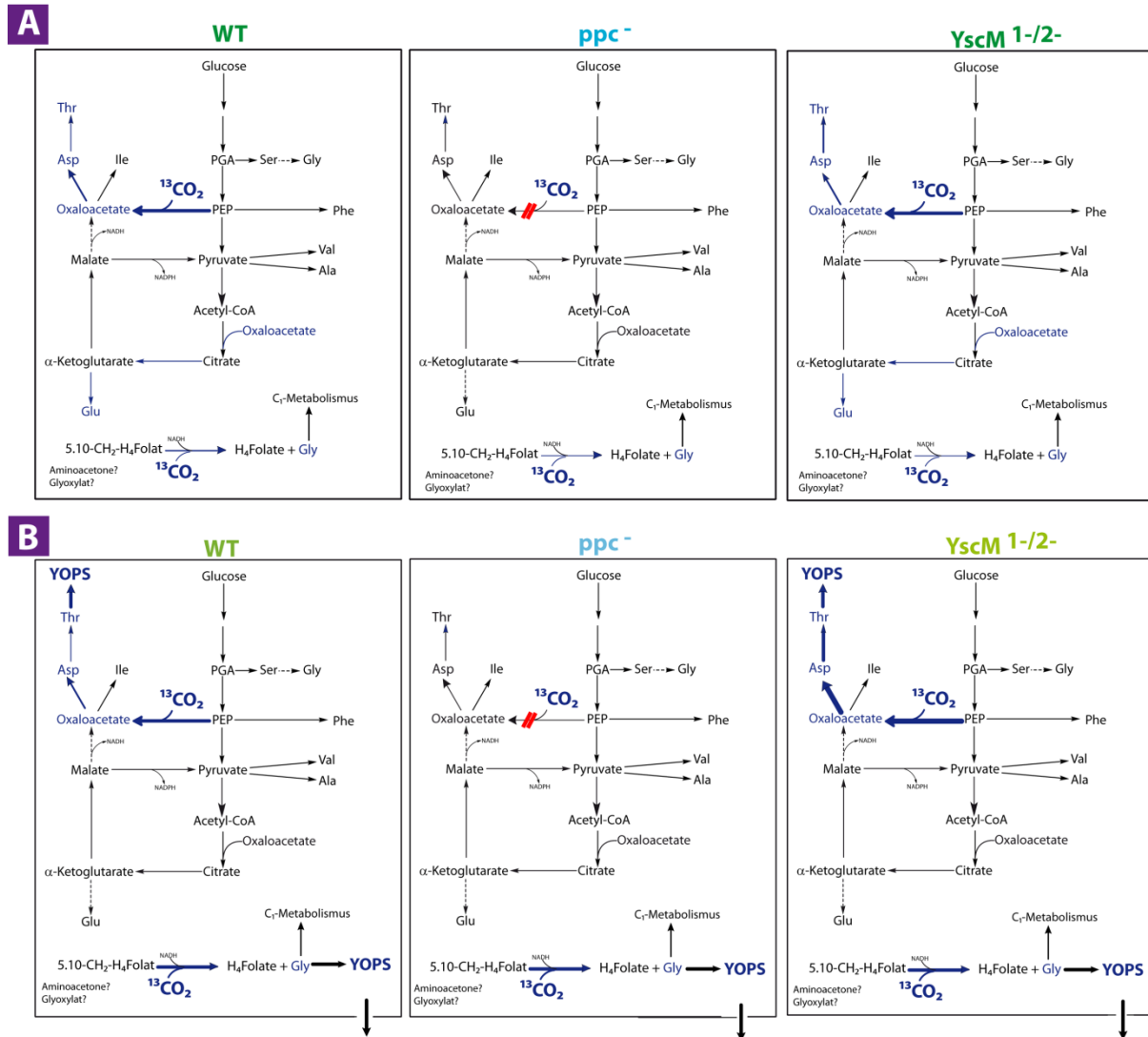


Abbildung 3.9: Grad der CO_2 -Fixierung in *Y. enterocolitica* WT und Mutanten Δppc , $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ in Anwesenheit von 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Differentielle Rate der PEPC-Aktivität in (A) zellulärem Protein und (B) YOPS. Blaue Pfeile markieren den erhöhten Fluss, der zu den blau hervorgehobenen Isotopologen führt.

In Relation zu dem unmarkierten Serin ist Glycin vergleichsweise hoch markiert, sowohl im WT als auch in den $\Delta yscM$ -Mutanten (ca. 1,3%), und sogar stärker in Δppc (ca. 2%). Dieser Befund schließt eine Glycinsynthese über Ser oder Thr aus und erfordert einen, vom TCA-Zyklus unabhängigen Biosyntheseweg. Vermutlich wird $^{13}\text{CO}_2$ über die Glycinsyntheseaktivität eingetragen. Dabei wird Kohlenmonoxyd, Ammonium, *N*5,*N*10-Methylen-tetrahydrofolat und NAD zu Glycin, Tetrahydrofolat und NAD^+ umgewandelt (Abbildung 3.10). Demzufolge wäre die Glycinsyntheseaktivität in der Δppc -Mutante vergleichsweise unter diesen Bedingungen hochreguliert. Ebenfalls denkbar wäre eine Syntheseroute aus Aminoaceton über L-2-Aminoacetoacetat oder über Glyoxylat,

die hierfür notwendigen Enzyme konnten jedoch bislang nicht in *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (KEGG-Database). Die These der Glycinsyntheseaktivität muss noch mit weiteren Versuchsreihen mit anderen markierten Vorstufen (wie z.B. [U-¹³C₃]Glycerin, [1,2-¹³C₂]Glucose, [U-¹³C₃]Pyruvat) belegt werden.

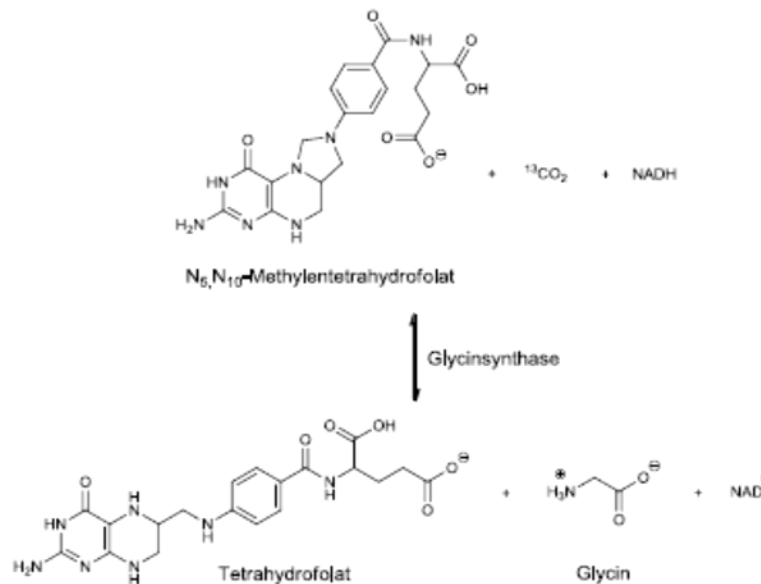


Abbildung 3.10: Glycinsynthese über die Glycinsynthase (modifiziert nach Breier, 2012).

Effektorproteine:

Wie vorausgehende Studien mit U-Glucose postulieren, erfordert die Synthese der YOPS eine hohe Rate an *de novo*-Biosynthese von AS und dementsprechend eine verstärkte anaplerotische Aufrechterhaltung des TCA-Zyklus (wie unter anderem durch die PEPC-Aktivität) (Schmid *et al.*, 2009). Dies spiegelt sich in den erhöhten ¹³C-Einbauraten in das Asp der Effektorproteine von WT und $\Delta yscM1$, bzw $\Delta yscM2$ wieder (Abbildung 3.4 und 3.9). Demzufolge ist die PEPC-Aktivität um den Faktor 1,5 höher für die Synthese der YOPS als es für das zelluläre Protein der Fall ist. Eine Deletion der homologen Yscm-Gene hat keinen Einfluss auf die PEPC-Aktivität, dementsprechend konnte keine Konnektivität zwischen den yscM-Genen und der PEPC-Aktivität unter diesen Bedingungen festgestellt werden.

Eine 3-fach höhere ¹³C-Einbaurate findet sich in Glycin sowohl im WT als auch in allen Mutanten wieder (Abbildung 3.4 und 3.9). Für die schnelle Bereitstellung der YOPS ist somit auch die CO₂-Fixierung und *de novo*-Synthese von Glycin, vermutlich über die erhöhte Glycinsynthaseaktivität, erforderlich.

Besonders auffallend ist aber die geringe und differentielle ^{13}C -Einbaurrate in Glutamat (Abbildung 3.4) im Vergleich zu zellulärem Protein. Dies ist vor allem beim WT ($\sim 0,15\%$), aber auch in den $\Delta yscM1/2$ -Mutanen ($\sim 0,3\%$) sichtbar. Dieser Befund könnte darauf hinweisen, dass zur massiven (Glutamat-)Synthese von YOPS hauptsächlich exogenes Glutamin aufgenommen wird und dies durch die Deletion von YscM-Genen leicht gedrosselt wird.

1.4.3. Glutamin-Verstoffwechslung

In guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen der $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose-}$ und $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ -Versuche sind die Resultate der Experimente mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$. Bei der Versuchsreihe mit markiertem Glutamin werden vor allem die AS der Aspartat- und Glutamat-Familie markiert. Dies ist zu erwarten, da Glutamin via Glutaminolyse zu Glutamat (und weiter zu Pro) umgewandelt werden kann. Des Weiteren kann die Vollmarkierung des Glutamats über α -KG in den TCA-Zyklus eintreten. Somit entsteht vollmarkiertes Aspartat (und dementsprechend Thr) (Abbildung 3.11).

Eine Gluconeogenese aus Glutamin findet unter diesen Umweltbedingungen in keinem der Systeme statt, da kein relevanter Eintrag von ^{13}C in Serin oder in die aromatischen AS auftritt (Abbildung 3.11).

Auffallend sind die unterschiedlichen ^{13}C -Einbaugrade in das proteinogene Glu. Hierbei treten gravierende Unterschiede zwischen zellulärem Protein und den Effektorproteinen auf. Signifikante Unterschiede gibt es jedoch auch im avirulenten Zustand zwischen WT und den $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ -Mutanten. Durch die Deletion der beiden homologen YscM-Gene wird die ^{13}C -Einbaurrate aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Gln}$ in das Glu des zellulären Proteins leicht gedrosselt. Vermutlich stimulieren im avirulenten Zustand diese beiden Gene die Glutaminaufnahme und/oder die Glutaminolyse. Dieser Effekt wird nivelliert im virulenten Zustand und zeigt sich sowohl im Zellprotein als auch in den YOPS nicht mehr.

Wie schon die Ergebnisse der Glucose-Verstoffwechslung und der CO_2 -Fixierung andeuten, sind diese Synthese-Wege über Glucose und die anaplerotische PEPC-Reaktion nicht allein verantwortlich für die schnelle Bereitstellung an YOPS. Die ^{13}C -Einbaurrate von fast 90% in das Glu der Effektorproteine belegt, dass Glutamin eine sehr gute und vermutlich die favorisierte Kohlenstoff-Quelle zur *de novo* AS-Synthese (zumindest der Glutamat-Familie) ist (Abbildung 3.11). So findet fast ein 1:1 Einbau von Glutamin in proteinogenes Glutamat bzw Glutamin statt, wobei die restlichen AS einen vergleichsweise sehr niedrigen ^{13}C -

Überschuss aufweisen. Ein weiterer Beleg für die hohe Affinität sind die Isotopologmuster, die keinen Umsatz, sondern einen direkten Einbau zeigen.

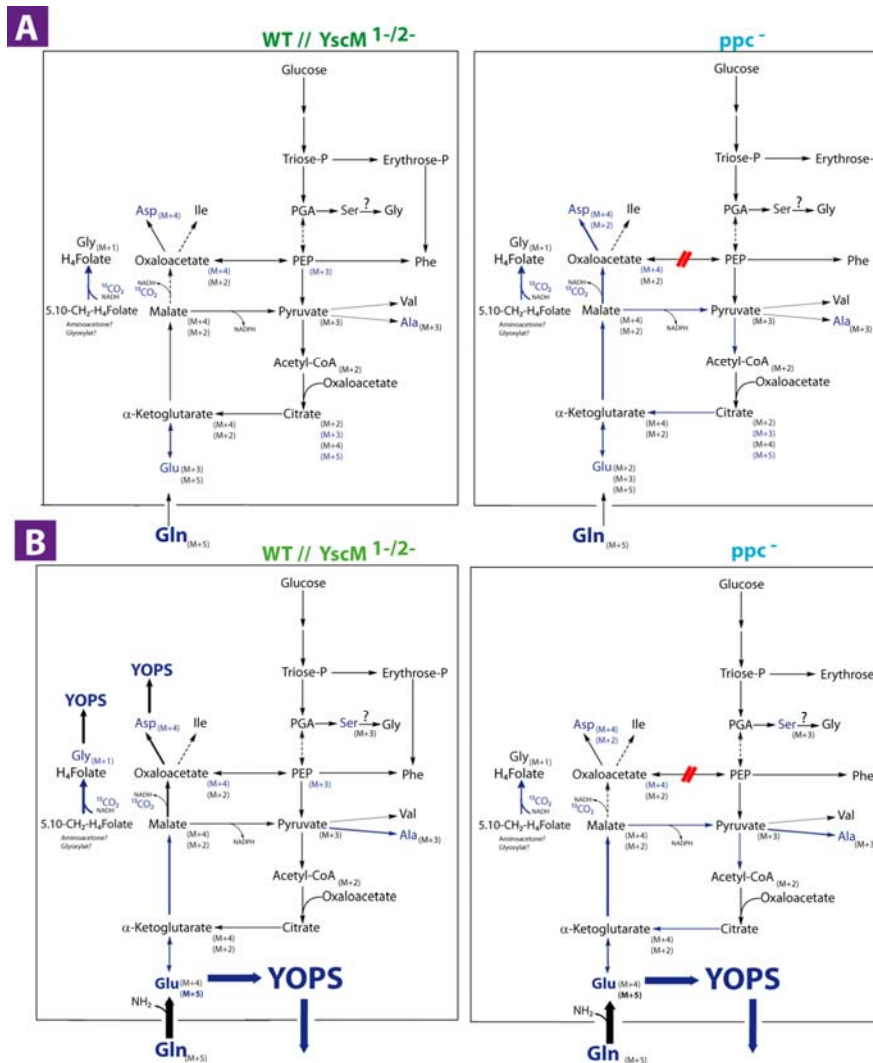


Abbildung 3.11: Grad der Glutaminolyse in *Y. enterocolitica* WT und Mutanten Δppc , $\Delta yscM1$ und $\Delta yscM2$ in Anwesenheit von 2 mM [U-¹³C₅]Gln. Differentielle Rate der Glutamin-Verstoffwechslung in (A) zellulärem Protein und (B) YOPS. Blaue Pfeile markieren den erhöhten Fluss, der zu den blau hervorgehobenen Isotopologen führt.

Vermutlich dient das exogene Glutamin nicht nur als Hauptkohlenstoff- sondern auch als Stickstoffquelle zur YOPS-Synthese. Weiterführende Versuche mit [¹⁵N]-Glutamin könnten diese Vermutung verifizieren.

1.4.4. Zusammenfassung

Als Ganzes betrachtet ergeben die einzelnen ^{13}C -markierten Vorstufen einen guten Überblick über das Stoffwechselnetzwerk und die genutzten Kohlenstoffquellen zur *de novo*-Biosynthese der zellulären proteinogenen Aminosäuren sowie der sezernierten Virulenzproteine (YOPS). Aus den Experimenten mit $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ wird klar ersichtlich, dass die anaplerotische Funktion der PEPC durch $^{13}\text{CO}_2$ -Fixierung eine wichtige Rolle in der Synthese von Asp und Glu spielt. Zudem gibt es noch einen weiteren nicht unwichtigen Weg der CO_2 -Fixierung, der zu markiertem Gly führt. Dieser ist vermutlich durch die Glycinsynthaseaktivität verursacht. Die PEPC-Aktivität in zellulärem Protein hängt dabei nicht von den untersuchten Virulenzfaktoren ab, jedoch spielt sie eine verstärkte Rolle in der schnellen Synthese der YOPS. Dies spiegelt sich auch in der Versuchsreihe mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ wieder. Auffällig ist auch hierbei die hohe PEPC-Aktivität. Mehr noch zeigen die ^{13}C -Glutamin-Versuche, dass exogenes Glutamin aufgenommen wird und zu einem relativ starken Anteil in zelluläres Protein eingebaut wird. Dabei werden vor allem die AS der Aspartat- und Glutamat-Familie markiert, d.h. Glutamat kann als Energiequelle über eine relativ hohe TCA-Zyklus Aktivität genutzt werden. Des Weiteren findet kein relevanter Grad an Gluconeogenese unter den gewählten Versuchsbedingungen statt. Besonders bemerkenswert ist zudem der Einfluss der YscM-Gene auf die ^{13}C -Einbaurate aus Glutamin in das zelluläre Protein. Da die Deletionsmutanten einen reduzierten ^{13}C -Überschuss aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$ aufweisen ist durchaus plausibel, dass beide YscM-Gene in der virulenten Phase einen stimulierenden Effekt auf die Glutaminolyse, bzw. die Aufnahme von exogenem Glutamin mit einem Einbau in das bakterielle Protein besitzen. Besonders auffällig und interessant ist der sehr hohe Einbau von exogenem Glutamin in die sezernierten Effektorproteine. Dies geschieht fast mit einer Rate von 1:1 und wird nicht von den betrachteten Virulenzfaktoren beeinflusst. Da das gemessene proteinogene Glutamat nicht weiter verstoffwechselt wird, sondern direkt eingebaut wird, ist naheliegend, dass Glutamin die Hauptkohlenstoffquelle zur Synthese von YOPS darstellt. Vermutlich ist das exogene Glutamin gleichzeitig auch die Hauptstickstoffquelle zur erfolgreichen *de novo*-Synthese von YOPS, so dass eine wichtige Schnittstelle zwischen Metabolismus und Virulenz aufgedeckt ist. Zukünftige Studien mit $[\text{}^{15}\text{N}]\text{Glutamin}$ könnten diese These verifizieren. Weiterführende Überlegungen könnten sein, wie Glutamintransporter oder Glutaminolyse während der virulenten Phase blockiert werden könnten, um die Synthese von YOPS zu unterbinden und somit eine effektive Angriffsfläche im Yersinien-Infektionsmodell wahrzunehmen.

2. Modelle der intrazellulären Infektion – Wachstum von *L. pneumophila* Paris *in vitro* und *in vivo* in *A. castellanii*

Legionella kommt in der Natur ubiquitär vor allem freilebend in Süßwasserhabitaten, biofilmassoziiert oder in spezifischen Protisten vor (Rowbotham, 1980; Fliermans *et al.*, 1981) und wird daher auch als Umweltbakterium bezeichnet. Allerdings ist *Legionella* nicht nur auf natürliche Habitate limitiert. Das Vorkommen in künstlichen, industriellen Reservaten (wie Kühltürme oder Klimaanlage) ist besonders gefährlich für ältere oder immunsupprimierte Menschen, da nach Inhalation *L. pneumophila*-kontaminierter Aerosole im schlimmsten Falle die sogenannte Legionärskrankheit ausgelöst werden kann (Fields *et al.*, 2002).

L. pneumophila hat einen biphasischen Lebenszyklus. Dieser resultiert aus der Anpassung an die aquatische, abiotische Umwelt und der intrazellulär-parasitischen Lebensweise in Protozoen. In beiden Lebensphasen gibt es signifikante Unterschiede in der äußeren Form, im Metabolismus und der Ausprägung von Virulenzgenen. In der transmissiven (virulenten) Phase ist *Legionella* flagelliert und zytotoxisch (Byrne and Swanson, 1998). Im replikativen (avirulenten) Zustand dagegen ist *Legionella* salzsensitiv, nicht flagelliert (Heuner *et al.*, 1999) und es kommt zur Ausbildung und Hochregulierung von AS- und Oligonukleotidtransportern, Proteasen, Zuckertransporter, Glycolyse und ED-Weg Enzymen sowie der Replikations-, Translations-, und Transkriptionsmaschinerie (Brüggemann *et al.*, 2006). Die Ausprägung der beiden reziproken Phänotypen kann auch *in vitro* in Kulturmedien simuliert werden. Die Expression von replikativen Faktoren findet während der exponentiellen Wachstumsphase statt, wenn im Medium noch genügend Nährstoffe vorhanden sind und keine „Raum-Limitation“ vorherrscht. Zum Übergang in die stationäre Phase hin werden dann transmissive Eigenschaften exprimiert (Molofsky and Swanson, 2004).

Da die zentrale Schnittstelle dieser gegenläufigen Regulation der Carbon Storage Regulator (CsrA = small-RNA-binding Protein; Steinert *et al.*, 2007) ist, der während der replikativen Phase unter anderem die Flagellenbiosynthese inhibiert (*rpoN* und *fleQ*-Gene) (Fettes *et al.*, 2001; Molofsky and Swanson, 2004), scheint eine enge Verknüpfung zwischen Virulenzausprägung und Metabolismus zu bestehen. Dies macht *L. pneumophila* besonders attraktiv für ¹³C-Isotopolog-Profiling, mit speziellem Augenmerk auf die Wahl der Kohlenstoffquellen (Kohlenhydrate oder Aminosäuren) in den verschiedenen Lebenszyklen. „Proteomics“- und „Transkriptomics“-Daten konnten eine Hochregulation von

PHB-Synthasen in der post-exponentiellen Wachstumsphase, also im Übergang hin zur transmissiven Phase belegen (Hayashi *et al.*, 2010; Brüggemann *et al.*, 2006). Da der Speicherstoff PHB in der abiotischen Umweltbesiedlung vermutlich als überlebenswichtige Kohlenstoff- und Energiequelle für *Legionella* darstellt könnte dieser essentiell zur Ausübung des biphasischen Lebenszykluses sein. So liegt es nahe, dass die PHB-Produktion ähnlichen Regulationsmechanismen wie jenen der Virulenzfaktoren unterliegt. Dadurch steht PHB in einem besonderen Fokus bei der Betrachtung des Metabolismus, vor allem in den verschiedenen Wachstumsphasen.

2.1. Ergebnisse der *in vitro*-Studien von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis*

2.1.1. Wachstumsphasenunabhängige Studien

Durch bisherige *in vitro*-Studien war bekannt, dass *L. pneumophila* hauptsächlich Aminosäuren, vor allem aber Serin, Threonin und Glutamat als Energie- und Kohlenstoffquellen nutzt (Pine *et al.*, 1979, George *et al.*, 1980; Tesh *et al.*, 1983). Aus neueren Arbeiten geht hervor, dass auch die C-Atome von Glucose biosynthetisch in Aminosäuren und Polyhydroxybutyrat verwendet werden (Herrmann 2007; Eylert, 2009; Eylert *et al.*, 2010). Daher wird im folgenden auch *L. oakridgensis* auf diese Fähigkeit hin untersucht. Zudem gibt es Hinweise auf das Vorhandensein von Glucoamylasen und damit der Fähigkeit Stärke zu verstoffwechseln (Brüggemann *et al.*, 2006). Um genauer zu testen, wie effizient und auf welche Weise diese Einträge geschehen, wurden in vorliegender Arbeit dem Kulturmedium jeweils [$U-^{13}C_6$]Glucose, [$1,2-^{13}C_2$]Glucose, [$U-^{13}C_3$]Serin, [$U-^{13}C$]-Fettsäuren, oder [$U-^{13}C$]-Stärke zugesetzt. Dabei kamen zwei unterschiedliche Medien zum Einsatz: ein Komplexmedium mit Hefeextrakt (AYE) und ein chemisch definiertes Medium (CDM) mit 16 AS als Kohlenstoff- und Energiequellen. Das Wachstumsverhalten wurde dabei durch die ^{13}C -markierten Substrate nicht beeinflusst (Herrmann, 2012). Für die wachstumsunabhängigen Studien wurden die ^{13}C -markierten Vorstufen jeweils zum Start der Hauptkultur zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 40 h erreichten die Bakterienkulturen die stationäre Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,9-2,0$). Nach Zentrifugation wurden Medienrückstände aus den Pellets durch mehrmaliges Waschen mit $H_2O_{bidest.}$ entfernt. Anschließend wurden die proteinogenen AS und PHB (bzw. das Monomer 3-HB) extrahiert und mittels GC/MS und NMR-Spektroskopie gemessen.

2.1.1.1. ^{13}C -Profile von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* kultiviert mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$

^{13}C -Einbauraten in proteinogene Aminosäuren und PHB:

Verglichen mit den ^{13}C -Excess-Werten der proteinogenen AS und PHB von *L. pneumophila* kultiviert in AYE-Medium aus Eylert (2009) (Kapitel I.6.1.4. und Abbildung 3.12, a-b), werden die selben AS sowie PHB in *L. pneumophila* in CDM, jedoch zu unterschiedlichen Raten markiert (Abbildung 3.12, c-d). Im CDM erreicht *L. pneumophila* WT höchste Markierungsraten und damit *de novo*-Syntheseraten aus Glucose in Ala (~6,6%), PHB (~2,5-4,5%), Glu (1,3%), Asp (0,6%), Gly (~0,2%) und Ser (~0,2%) (Tabelle A.10.A im Anhang). Somit ist der Einbau von ^{13}C in die proteinogene AS Glu, Asp, Gly, Ser und in das PHB in den Experimenten mit CDM um den Faktor 2-3 niedriger als in den Experimenten mit AYE-Medium, für Ala ist der ^{13}C -Überschuss vergleichbar ähnlich in beiden Versuchsbedingungen. Eine Auxotrophie besteht für die AS Ile, Leu, Phe, Tyr, His, Pro und Val. Da die Verdopplungszeit von *L. pneumophila* im AYE-Medium geringer ist, als im CDM-Medium fanden alle folgenden Versuche im AYE-Medium statt (Herrmann, 2012).

Für die Δzwf Mutante von *L. pneumophila* (Deletion von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) werden relativ geringe ^{13}C -Excess-Werte in der Reihenfolge PHB (~0,8%), Ala (0,4%) und Asp (0,14%) gemessen (Abbildung 3.12, e; Eylert *et al.* 2010). Die Werte für Glu und Ser weisen vergleichsweise hohe Standardabweichungen in den Messungen auf (Tabelle A.10.A). Somit ist die Einbauraten von ^{13}C in dieser Stoffwechselmutante um den Faktor 10 verglichen zum WT reduziert.

In den Experimenten der *keto*-Deletionsmutante (Deletion der β -Ketothiolase *lpp1788*) ist Ala mit 5,5-10,5% am höchsten markiert gefolgt von Glu (4-5%), Asp (2,3-3%), und PHB (1-2,7%). Dementsprechend findet ein erhöhter Eintrag von ^{13}C in Ala, Glu und Asp (Faktor 1,5- 2) als vergleichsweise im WT statt (Abbildung 3.12, f-h). Im Gegensatz dazu ist der ^{13}C -Überschuss von PHB in der $\Delta keto$ -Mutante 3 bis 6 fach niedriger als im WT.

Die beiden Mutanten der Flagellenbiosynthese, $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ weisen untereinander ähnliche ^{13}C -Excess-Werte in den proteinogenen AS und im PHB in der Reihenfolge Ala = PHB (~10%) > Glu ($\Delta fleQ$: ~4%; $\Delta rpoN$: 5-6%) > Asp (~2,5%) >> Gly (~0,2%) auf (Abbildung 3.12, i-j und k-l). Damit ist die *de novo*-Syntheserate sowohl für die proteinstammigen AS als auch für PHB im Vergleich zum WT um den Faktor 1,6 bis 2 erhöht. In *L. oakridgensis* ist der ^{13}C -Einbau aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ relativ gering, bis gar nicht

vorhanden (Abbildung 3.12, m-n).

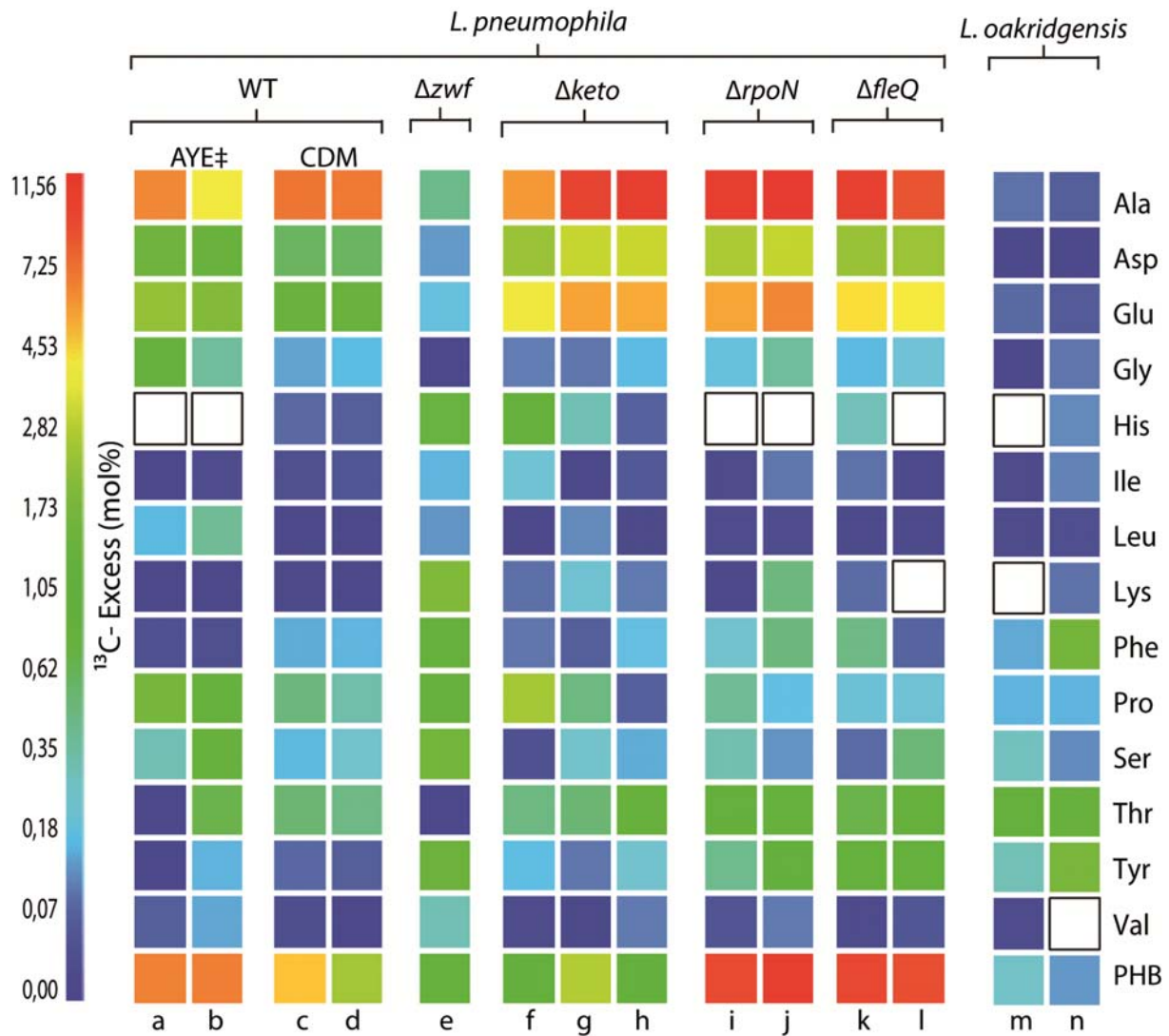


Abbildung 3.12: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* in Anwesenheit von 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$. a und b: ‡ = Werte aus Eylert *et al.*, 2010. e bis n: Wachstum in AYE-Medium. Für jedes Experiment (außer Δzwf) wurde mindestens ein unabhängiges biologische Replikate durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2 aufgelistet.

Isotopolog-Zusammensetzung:

L. pneumophila WT verstoffwechselt Glucose im chemisch definierten Medium auf vergleichbar ähnliche Weise wie im AYE-Medium (vergleiche Kapitel I.6.1.4., Eylert *et al.*, 2010, Herrmann, 2012 und Tabelle 3.1). Es findet lediglich ein leicht verstärkter ^{13}C -Eintrag in Ala statt, das sich in einem erhöhten Anteil an $[\text{C}_3^{13}\text{C}_3]\text{Ala}$ widerspiegelt (Abbildung 3.13). Dies ist erklärbar durch einen vermehrten direkten Einbau von ^{13}C aus der $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{Glucose}$

über [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat. Über die Pyruvat-Carboxylase wird dementsprechend auch mehr [$^{13}\text{C}_3$]Asp aus [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat gebildet (Abbildung 3.13). Die ^{13}C -Profile von Glu und Gly entsprechen denen im AYE-Medium (siehe Kapitel I.6.1.4. und Eylert *et al.*, 2010). Ebenso ist die Art der ^{13}C -Markierung in PHB ([1,2- $^{13}\text{C}_2$]- und [3,4- $^{13}\text{C}_2$]-3-HB) (Tabelle 3.2) gleich, jedoch zu einem geringeren mol%, d.h. der Eintrag von ^{13}C aus Glucose in die Lipidfraktion findet im chemisch definierten Medium auf gleiche Weise, nur mit reduzierter Rate statt.

Bei der Δzwf -Mutante manifestiert sich die Deletion von Glucose-6-Phosphatdehydrogenase vor allem in dem sehr niedrigen ^{13}C -Überschuss (Abbildung 3.12). Die Isotopologmuster sind für die Experimente mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose als Vorstufe gleich denen des Wildtyps (Abbildung 3.13). Die [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose wird zu [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat abgebaut, welches weiter zu [$^{13}\text{C}_3$]Ala transaminiert wird. Dabei entsteht aus [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose sowohl über den ED-Weg (mit KDPG als Vorstufe von Pyruvat), den PPP-Weg (welche beide in Δzwf blockiert sind), als auch über die Glykolyse (mit GAP als Intermediat) [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat, so dass an dieser Stelle keine Differenzierung dieser Stoffwechselwege rein über die Isotopologzusammensetzung möglich ist. Weiter wird [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat decarboxyliert und zu Acetyl-CoA umgewandelt, welches auf unmarkiertes OAA übertragen werden kann. Somit wird eine M+2-Markierung in den TCA-Zyklus eingetragen und weitergegeben an [$^{13}\text{C}_2$] α -KG bzw [$^{13}\text{C}_2$]Glu (Abbildung 3.13). Die Einfachmarkierung im Gly kann durch Fixierung des, bei der Pyruvat-Decarboxylierung freiwerdenden $^{13}\text{CO}_2$ über die Glycinyntase erklärt werden. Der Speicherstoff PHB ist ebenfalls hauptsächlich M+2-markiert, wobei entweder [1,2- $^{13}\text{C}_2$]- oder [3,4- $^{13}\text{C}_2$]-Isotopologe auftreten (Tabelle 3.2 und Abbildung 3.14). Dies wird verursacht durch die Kondensation von [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA mit einem unmarkiertem Acetyl-CoA. Da in der Δzwf -Mutante das Enzym des ersten Schrittes im ED- und PPP-Weg deletiert ist, kann der Abbau von Glucose nur über die Glykolyse stattfinden. Die vergleichsweise um den Faktor 10 niedrigere ^{13}C -Excess-Wert sowohl im PHB als auch in Ala, Glu und Asp weisen auf eine vergleichsweise niedrige glykolytische Aktivität hin. Diese These wird später durch die Experimente mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glucose bestärkt.

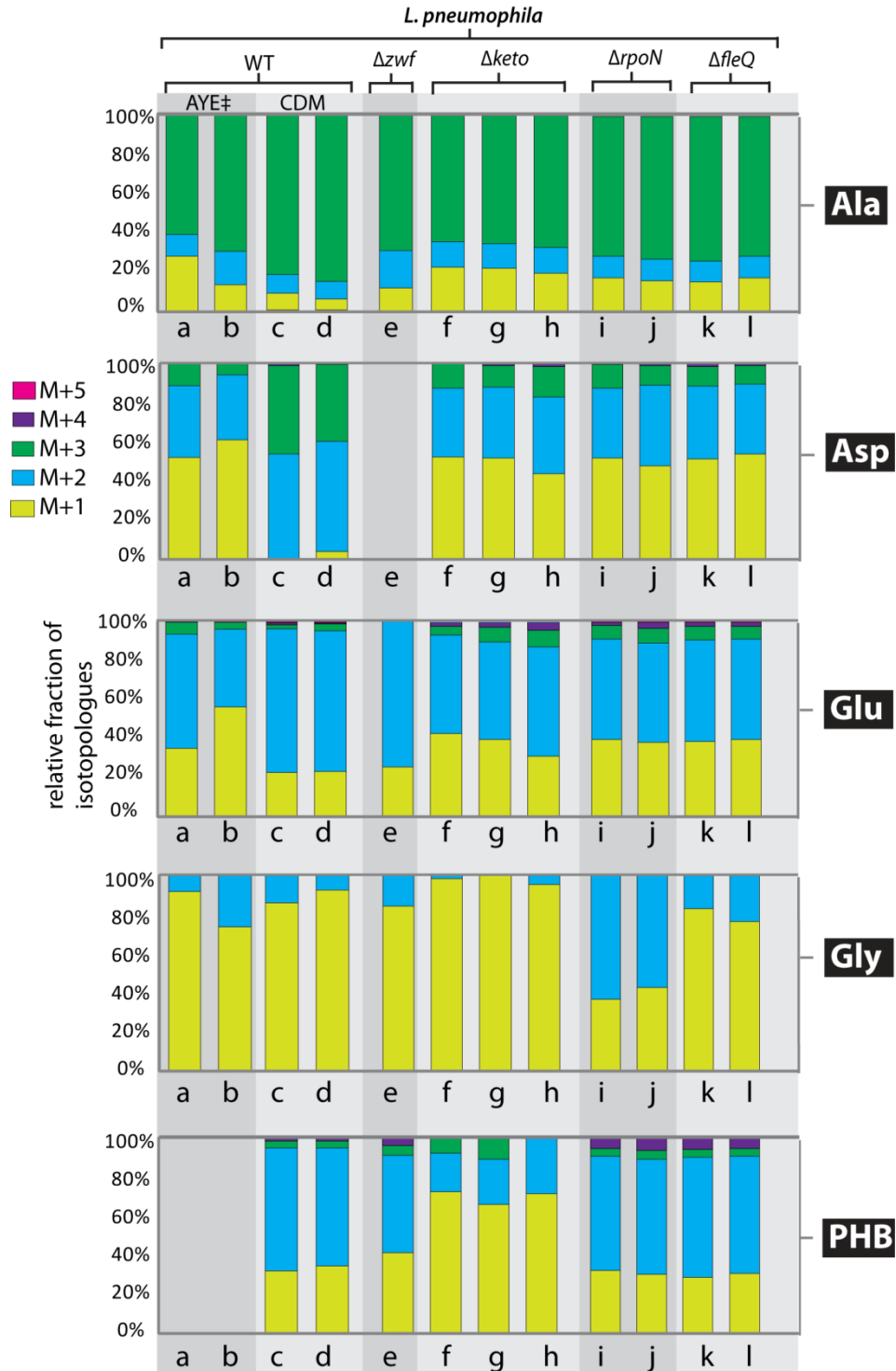


Abbildung 3.13 : Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly und des Speicherstoffs PHB von *L. pneumophila* in Anwesenheit von 10 mM [U-¹³C₆]Glucose.

Tabelle 3.1: $\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ und $\%^{13}\text{C}$ -Überschuss von Ala, Asp und Glu aus *L. pneumophila* WT in CDM in anwesenheit von 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$.

WT in CDM						
	Position	X-Gruppen	Kopplung	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	
Ala	1	10X		17	1,83	
		11X	57,14	83	8,91	
	2	010			13	0,87
		110	55,16		4,5	0,30
		011			4,5	0,30
		111			75	5,00
	3	X01			22,5	1,34
		X11			77,5	4,62
	Asp	1	10XX		55,4	0,94
11XX			57,45	44,8	0,76	
2		010X			55,8	0,94
		110X	57,49		5,7	0,08
		011X	38,56		5,7	0,08
		111X			33	0,56
3		X010			57,8	0,96
		X110	37,49		7,3	0,12
		X011	55,11		7,3	0,12
		X111			27,5	0,46
4		XX01			60	1
		XX11	53,35		40	0,67
Glu		1	10XXX		-	2,89
			11XXX		-	
		2	010XX			59,8
	110XX		55,82		6,5	0,12
	011XX		37,21		6,5	0,12
	111XX				27	0,50
	3	X010X			75	1,16
		X011X			35	0,26
		X110X			35	0,26
		X111X			0	
	4	XX010			42	0,86
		XX011			58	1,19
		XX110			58	1,19
		XX111			0	
	5	XXX01			37,4	1,35
		XXX11	54,94		62,6	2,26

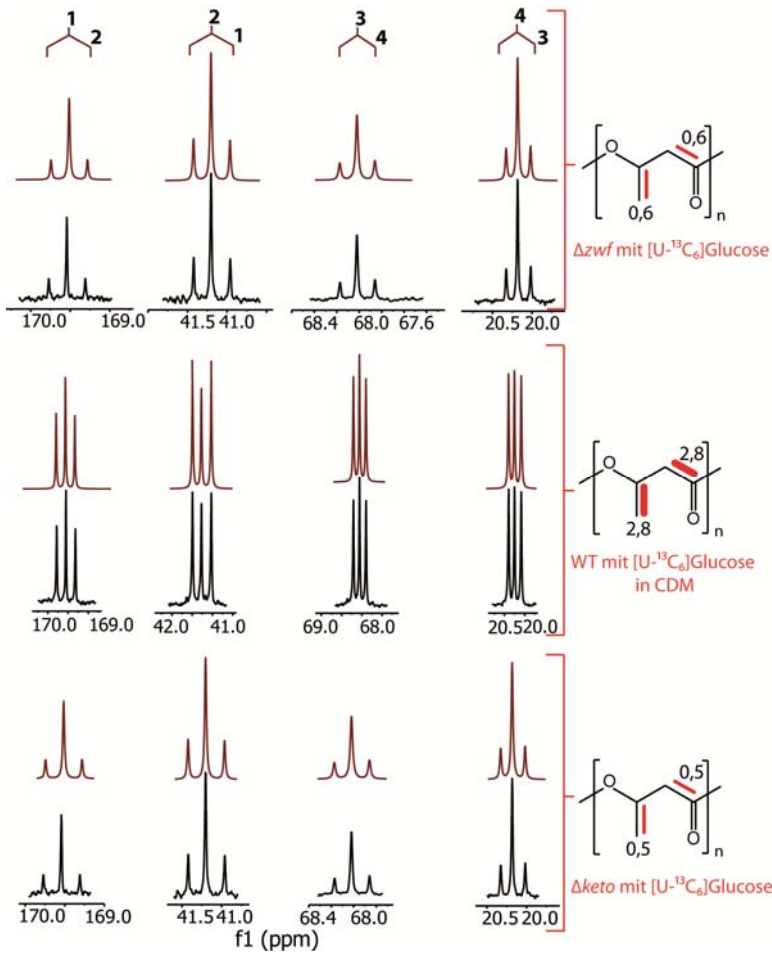


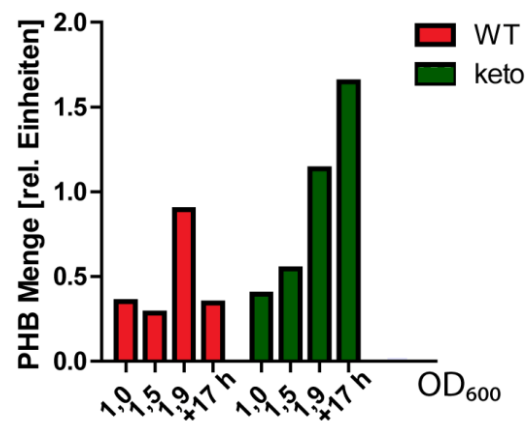
Abbildung 3.14: ^{13}C -NMR-Signale von Polyhydroxybutyrat im Dichlormethanextrakt von *L. pneumophila*. Schwarze Signale stellen original-Signale aus MestreNova (zero-filling 56k) dar, dunkelrote Signale wurden anhand des Line-Fitting Tools erstellt, um die Signale klarer darzustellen. Die Zahlen über den Kopplungsbäumen stehen für die Positionen im Molekül. Mehrfach ^{13}C -markierte Isotopologe sind durch rote Balken dargestellt, die die ^{13}C -markierten Atome miteinander verbinden.

Tabelle 3.2: $\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ und $\%^{13}\text{C}$ -Überschuss von PHB aus *L. pneumophila* WT in CDM, Δzwf und $\Delta keto$ in AYE-Medium in Anwesenheit von 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$. K: Kopplung.

X- Position	X- Gruppen	K	WT in CDM (c)		Δzwf (e)		$\Delta keto$ (h)	
			$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1	10XX		42,00	2,0	66,70	1,2	80,10	2,2
	11XX	58Hz	58,00	2,8	33,30	0,6	19,90	0,5
2	010X		35,40	1,4	63,00	1,2	68,10	2,4
	011X	39Hz	-	-	-	-	-	-
	110X	58Hz	64,50	3,4	37,00	0,6	31,90	0,5
	111X		-	-	-	-	-	-
3	X010		40,90	1,9	64,00	1,3	96,60	2,0
	X011	38Hz	59,10	2,8	36,00	0,6	3,40	0,2
	X110	50Hz	-	-	-	-	-	-
	X111		-	-	-	-	-	-
4	XX01		31,30	1,5	65,00	1,1	88,00	1,5
	XX11	38Hz	68,70	3,3	36,00	0,6	12,00	0,5

Durch die Deletion einer β -Ketothiolase (*lpp1788*: Acetylierung von Acetyl-CoA sowie die Umkehrreaktion; beteiligt an der PHB-Biosynthese und β -Oxidation der Fettsäuren) in Δ *keto* wird keine signifikante Veränderung in den Isotopologmustern von Ala, Glu und Asp – verglichen mit dem WT – hervorgerufen. Dementsprechend kann kein Unterschied in der Art dieser *de novo*-Synthese der AS festgestellt werden. Auffallend reduziert ist die ^{13}C -Eintragsrate in die Lipidfraktion (PHB) durch die Deletion der β -Ketothiolase, so dass ein verstärkter Einbau von ^{13}C in die AS Ala, Asp und Glu geschieht. Es findet kaum ein Verdünnung der ^{13}C -Anreicherung an der Schnittstelle von [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat/[$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus und der Produktion von PHB statt. Dementsprechend fließt die ^{13}C -Markierung in [$^{13}\text{C}_3$]Ala und über [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA in [$^{13}\text{C}_2$]Glu und [$^{13}\text{C}_2$]Asp verstärkt ein. Dennoch ist die PHB-Produktion mit Glucose als Vorstufe nicht vollkommen blockiert und geschieht vermutlich auf die selbe Weise wie im WT, durch Kondensation zweier Acetyl-CoA. Dies spiegelt sich im Markierungsmuster des PHBs wieder (Abbildung 3.13 und 3.14, sowie Tabelle 3.2) und ist möglich, da *L. pneumophila* drei homologe Gene zu der β -Ketothiolase besitzt (*lpp1307*, *lpp1555* und *lpp1788*; Herrmann, 2012). Interessanterweise zeigen Infrarotspektroskopiedaten, dass die Δ *keto*-Mutante sogar mehr PHB als der WT produziert (Herrmann, 2012 und Abbildung 3.15, Heuner, *unpublished Data*). Demzufolge muss ein alternativer Weg der PHB-Produktion in *L. pneumophila* bestehen, der bisher noch nicht aufgeklärt ist.

Abbildung 3.15: PHB-Menge in *Legionella pneumophila* Wildtypstamm und Δ *keto*. Gemessen anhand Infrarotspektroskopie (Heuner, *unpublished data*).



Die beiden Mutanten Δ *rpoN* und Δ *fleQ* sind Deletionsmutanten in Flagellenbiosyntheseregulatoren. Kultiviert im AYE-Medium zeigen sie ähnliche Isotopologmuster in den ^{13}C -markierten AS wie der WT (vergleiche Abbildung 3.13 und Eylert *et al.*, 2010), so dass ein gleicher Weg der Glucoseverstoffwechslung angenommen werden kann. Der quantitative Eintrag von ^{13}C ist jedoch in den proteinogenen AS und dem Polymer PHB um den Faktor 1,5 bis 2 verstärkt. Somit ist die *de novo*-Syntheserate der AS und des PHBs aus Glucose in

diesen Mutanten höher als im WT. Dementsprechend haben beide Regulatoren Einfluss auf den Kohlenhydratmetabolismus und der Produktion von PHB. Interessanterweise ist zudem für die $\Delta rpoN$ -Mutante das Isotopologmuster von Glycin eher in Richtung [$^{13}\text{C}_2$]-Gly verschoben, so dass vermutlich mehr Gly aus [$^{13}\text{C}_3$]Ser entsteht. Denkbar wäre deshalb ein aktivierender Einfluss von RpoN auf die Glycinsynthaseaktivität.

2.1.1.2. ^{13}C -Profile von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* kultiviert mit [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glucose

^{13}C -Einbauraten aus [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glucose:

Da mit der [1,2- $^{13}\text{C}_2$]Glucose nur eine 2-fach markierte Kohlenstoffquelle zum Einsatz kommt, sind die ^{13}C -Excess-Werte dementsprechend erniedrigt gegenüber der vollmarkierten Glucose. Ähnlich wie bei den Experimenten mit 10 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose ist der ^{13}C -Eintrag in die proteinogenen AS und das PHB im WT am höchsten für Ala (3,8 mol%), gefolgt von PHB (2,5%), Glu (1,4%), Asp (0,6%) und Gly (0,1%) (Abbildung 3.15 (A) und Tabelle A.11.A).

Ebenso setzt sich in der $\Delta keto$ -Mutante der gleiche Trend, der schon in den Experimenten mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose zu sehen war, fort. Die proteinogenen AS der $\Delta keto$ -Mutante sind ähnlich hoch markiert wie im WT: Ala (2,9%) > Glu (1,1%) > Asp (0,5%) > Gly (0,2%). Ebenfalls vergleichbar zu den Experimenten mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose ist der vergleichsweise niedrige Einbau von ^{13}C -Atomen aus Glucose in das PHB (0,4%) (Abbildung 3.15 (A) und Tabelle A.11.A).

Die Δzwf -Mutante weist geringe, aber signifikante ^{13}C -Markierungen im PHB (2,7%), sowie in den proteinogenen AS Ala (0,3%) und Glu (0,2%) auf (Abbildung 3.15 (A) und Tabelle A.11.A). Dies stimmt wiederum mit den ^{13}C -Einbauraten aus [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose überein (vorausgehendes Kapitel).

In *L. oakridgensis* findet kein signifikanter Eintrag von ^{13}C weder in die proteinogenen AS noch in den Speicherstoff PHB statt (Abbildung 3.16 (A) und Tabelle A.11.B).

Isotopolog-Muster:

Durch den Einsatz von positionell-markierter Glucose kann unterschieden werden, auf welchem Weg deren Verstoffwechslung stattfindet (vergleiche dazu Kapitel I.2; Tabelle 1.2 und Kapitel I.3.1.1).

Anhand der ^{13}C -Profile von Asp und Glu von *L. pneumophila* WT wird deutlich, dass nur ein ^{13}C -Atom aus der $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose in den TCA-Zyklus eingeschleust wird (Abbildung 3.16 (B) und Tabelle A.12 (^{13}C -NMR-Signale)).

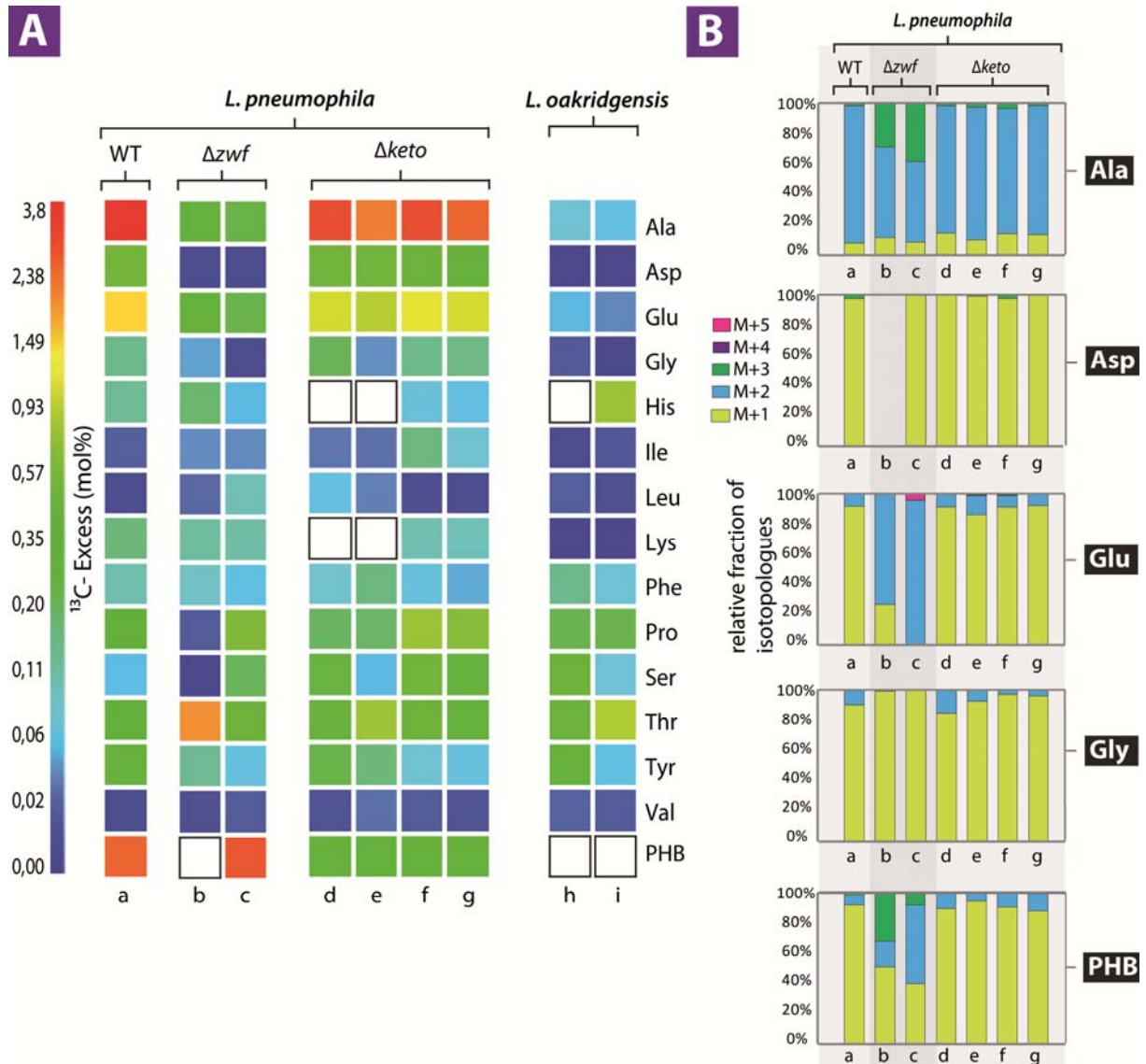


Abbildung 3.16: (A) Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) und (B) Isotopomer-Zusammensetzung proteinogener Aminosäuren und PHB von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* in Anwesenheit von 10 mM $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose. Für jedes Experiment (außer WT) wurde mindestens ein unabhängiges biologische Replikate durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2 aufgelistet.

Eine Einfachmarkierung in diesen AS kann nur durch eine Verstoffwechslung über den Entner-Doudoroff-Weg (Kapitel I.3.1.1) zustande kommen. Bei der Umwandlung von [1,2-¹³C₂]-Glucose-6-Phosphat zu [1,2-¹³C₂]-KDPG und der anschließenden Spaltung zu unmarkiertem GAP und [1,2-¹³C₂]-Pyruvat entsteht neben [1,2-¹³C₂]Ala (Abbildung 3.15 (B) und Tabelle A.12) auch [1-¹³C₁]-Acetyl-CoA. Letzteres tritt in den TCA-Zyklus ein und ergibt übertragen auf unmarkiertes OAA ein [¹³C₁]-Citrat. Weiter im TCA-Zyklus entsteht so [5-¹³C₁]-α-KG, welches zu [5-¹³C₁]-Glutamat transaminiert wird. [5-¹³C₁]-α-KG kann aber auch im TCA-Zyklus zu [¹³C₁]-Succinat, [¹³C₁]-Fumarat und aufgrund der Symmetrisierung zu [1-¹³C₁]- und [4-¹³C₁]-OAA verstoffwechselt werden. Aus letzterem entsteht dann [1-¹³C₁]- und [4-¹³C₁]-Aspartat. Die Herstellung von PHB geschieht über die Kondensation zweier [1-¹³C₁]-Acetyl-CoA, wodurch [1,3-¹³C₂]-3-HB entsteht (Abbildung 3.16 und Tabelle 3.3) und bekräftigt somit die Ergebnisse von Eylert (2009) und Eylert *et al.* (2010).

Die Isotopolog-Muster der Δ *keto*-Mutante sind denen von *L. pneumophila* WT sehr ähnlich, womit man davon ausgehen kann, dass Glucose auf die gleiche Weise verstoffwechselt wird. Der Eintrag von ¹³C in das PHB findet auf eine etwas differentielle Art statt mit einem geringeren Stofffluss aus Glucose. Ist beim WT die Verteilung der ¹³C-Markierung auf das C1 und C3-Atom fast 50:50, so ist dagegen die Verteilung bei der Δ *keto*-Mutante mit 80:20 nicht symmetrisch (Tabelle 3.3). Dies spricht für einen alternativen Syntheseweg für das intrazelluläre Speicherpolymer (siehe vorangegangenes Kapitel).

Abbildung 3.17:

^{13}C -NMR-Signale von Polyhydroxybutyrat im Dichlormethan-extrakt von *L. pneumophila*. Schwarze Signale stellen original-Signale aus MestreNova (zero-filling 56k) dar, dunkelrote Signale wurden anhand des Line-Fitting Tools erstellt, um die Signale klarer darzustellen. Die Zahlen über den Kopplungsbäumen stehen für die Positionen im Molekül. Mehrfach ^{13}C -markierte Isotopologe sind durch rote Balken dargestellt, die die ^{13}C -markierten Atome miteinander verbinden.

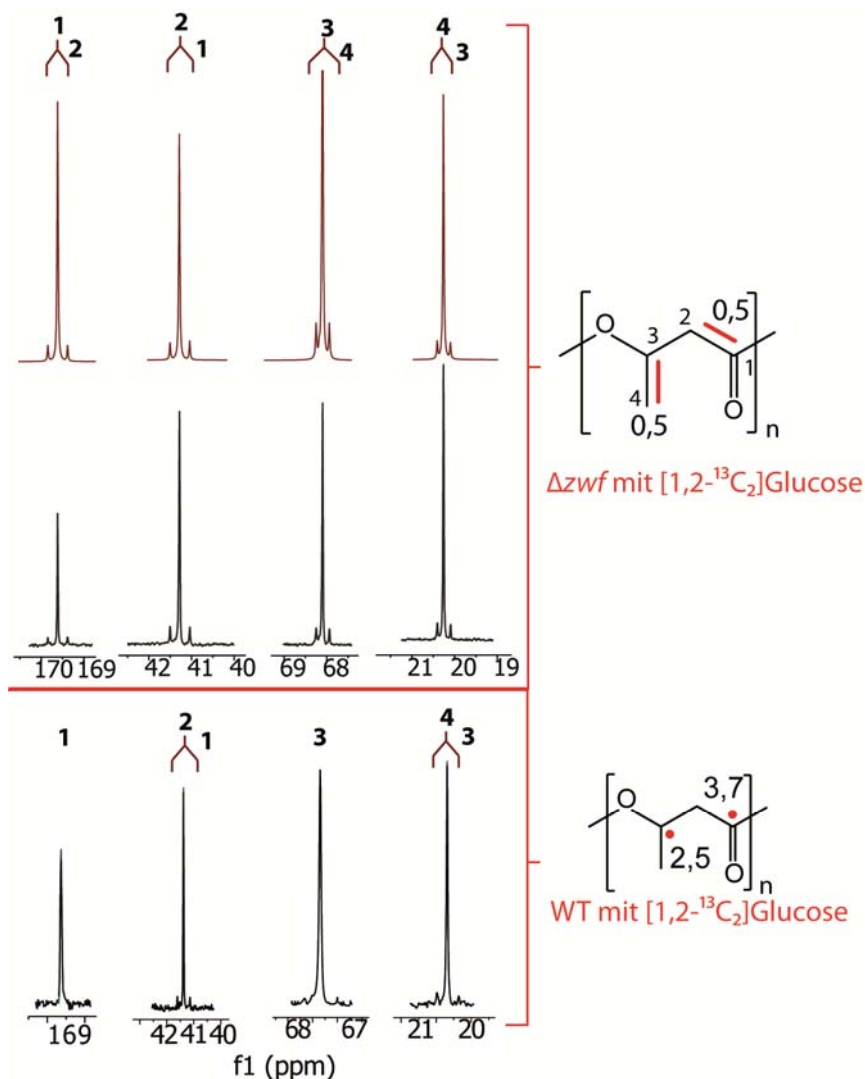


Tabelle 3.3: $\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$ und $\%^{13}\text{C}$ -Überschuss von PHB aus *L. pneumophila* WT, Δzwf und $\Delta keto$ in AYE-Medium in Anwesenheit von 10 mM $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose.

PHB	WT (a)		$\Delta keto$ (f)		$\Delta keto$ (g)		Δzwf (c)	
	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
1 10XX	100,00	3,70	100,00	2,81	100,00	2,38	87,70	3,30
11XX 58Hz	-	-	-	-	-	-	12,20	0,46
2 010X	-	-	-	-	-	-	86,70	3,20
011X 39Hz	-	-	-	-	-	-	-	-
110X 58Hz	-	-	-	-	-	-	13,30	0,50
111X	-	-	-	-	-	-	-	-
3 X010	100,00	2,50	100,00	0,59	100,00	0,49	86,80	3,30
X011 38Hz	-	-	-	-	-	-	13,20	0,50
X110 50Hz	-	-	-	-	-	-	-	-
X111	-	-	-	-	-	-	-	-
4 XX01	-	-	-	-	-	-	88,80	3,37
XX11 38Hz	-	-	-	-	-	-	11,20	0,43

Die ^{13}C -Profile von PHB und den proteinogenen AS Ala und Glu von der Δzwf -Mutante belegen aber noch eine zum Entner-Doudoroff-Weg alternative Weise der Glucose-Verstoffwechslung. Trotz der Deletion des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase findet ein geringer aber signifikanter Eintrag von ^{13}C aus $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose mit einem zum WT differentiellen Verteilungsmuster statt. So befindet sich die $[^{13}\text{C}_2]$ -Markierung im Ala nicht an Position C1 und C2, sondern an C2 und C3 (Tabelle A.12; ^{13}C -NMR-Signale). Diese Markierung entsteht, wenn $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose durch die Enzyme der Glycolyse zu $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Fructose-bis-Phosphat und weiter zu $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -GAP umgewandelt wird. Dementsprechend entsteht aus $[2,3-^{13}\text{C}_3]$ -Pyruvat sowohl $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Ala als auch $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA. Letzteres wird zum Einen auf unmarkiertes OAA übertragen, wodurch $[^{13}\text{C}_2]$ -Citrat entsteht. Aus $[4,5-^{13}\text{C}_2]$ - α -KG entsteht durch eine Transaminierung $[4,5-^{13}\text{C}_2]$ -Glutamat (Abbildung 3.15 (B)). Zum Anderen entsteht durch Kondensation zweier $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ - und $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ -Isotopologe im PHB (Abbildung 3.17 und Tabelle 3.3). Die *de novo*-Synthese von PHB aus Glucose ist über den Entner-Doudoroff-Weg jedoch mehr als 8 bis 10-mal so stark als über die Glykolyse, so dass man davon ausgehen kann, dass ersterer der Hauptweg der Glucose-Verstoffwechslung darstellt. Die Glycolyse spielt eher eine untergeordnete Rolle in *L. pneumophila*, auch wenn alle glykolytischen Enzyme im Genom von *Legionella* angelegt sind (Brüggemann *et al.*, 2006).

Nachdem *L. oakridgensis* keine Glucosetransporter besitzt, lässt sich kein signifikanter ^{13}C -Überschuss weder in die proteinogenen AS noch in das Polymer PHB detektieren.

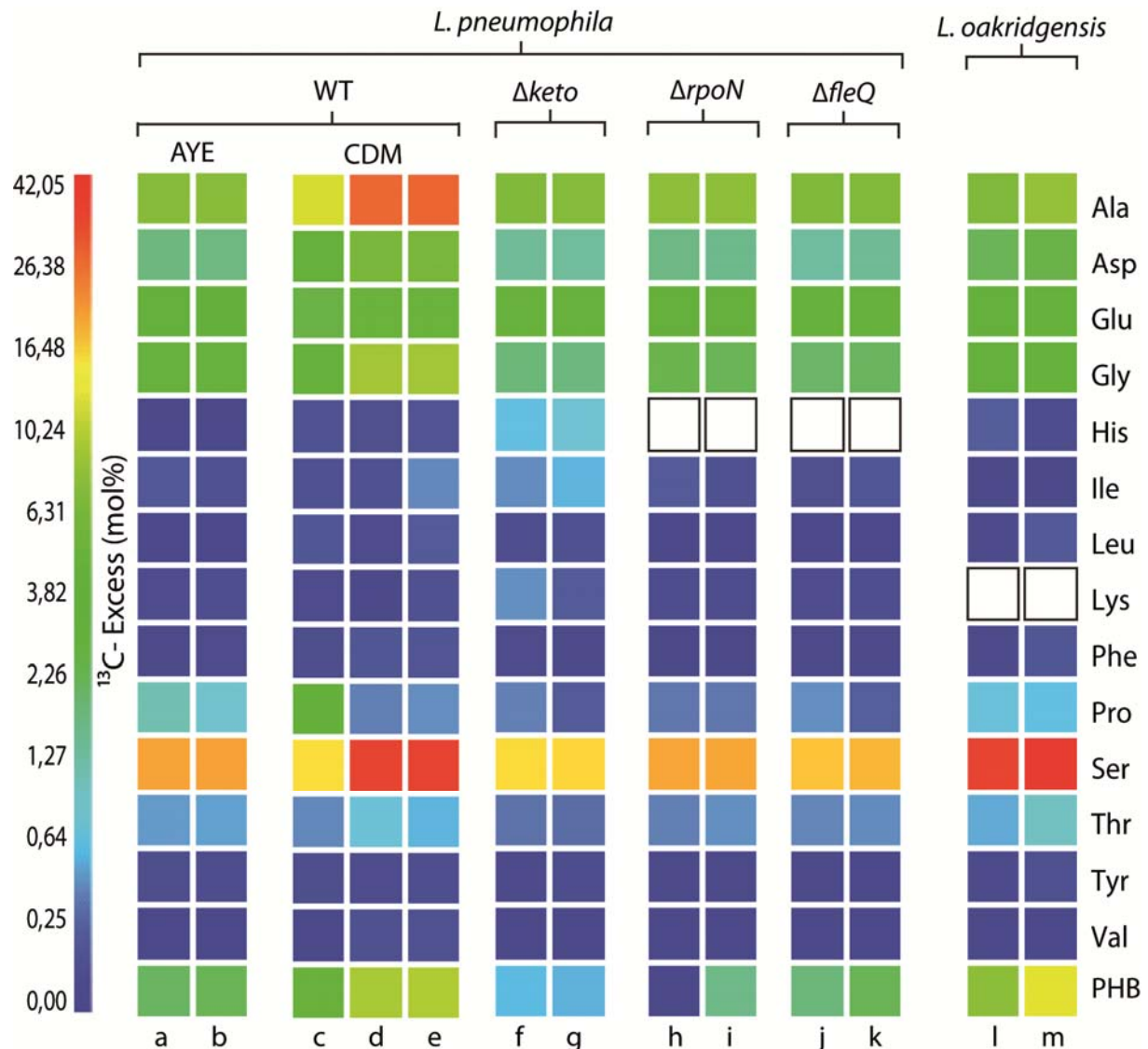
2.1.1.3. ^{13}C -Profile von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* kultiviert mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ ^{13}C -Einbaurrate aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$:

Abbildung 3.18: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* in Anwesenheit von 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$. Für jedes Experiment wurde mindestens ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2 aufgelistet.

Die gemessenen ^{13}C -Inkorporationsraten in die proteinogenen AS und das PHB von *L. pneumophila* WT ist im AYE-Medium signifikant gleich denen von Eylert *et al.* (2010) und bestätigen diese. Wie schon zuvor beobachtet ist der ^{13}C -Einbau aus exogenem ^{13}C -markierten Serin am höchsten in das proteinstämmige Serin (19%), gefolgt von Ala (7,3%), Glu (3,5%), Gly (2,6%), PHB (2,1%) und Asp (1,7%) (Abbildung 3.18, a-b und

Tabelle A.13.A im Anhang).

Davon heben sich die ^{13}C -Excess-Werte von *L. pneumophila* WT kultiviert in chemisch definiertem Medium ab. Hierbei findet ein verstärkter Fluss aus exogenem Serin in das proteinogene Serin (35,6%), gefolgt von Ala (27%), PHB (9,3%), Gly (8,9%), Asp (6,3%), und Glu (4,7%) statt. Somit ist nicht nur der mol%-Anteil des ^{13}C -Überschusses im Gesamten um den Faktor 2 bis 3 (im PHB sogar 4,5) erhöht, sondern auch die Reihung der proteinogenen AS und des PHBs etwas anders (Abbildung 3.18, c-e; Tabelle A.13.A und A.14 im Anhang).

Die ^{13}C -Einbaurrate des *keto*-Deletionsstamms ist leicht erniedrigt (Faktor 0,8 bis 0,9) in den proteinogenen AS und sogar 4-fach weniger für das Speicherpolymer PHB. Die Reihenfolge der ^{13}C -Excess-Werte ist demnach in $\Delta keto$: Ser (15,2%) >> Ala (6,8%) > Glu (2,7%) > Gly (1,7%) > Asp (1,3%) >> PHB (0,6%) (Abbildung 3.18, f-g; Tabelle A.13.A und Tabelle A.14. im Anhang).

Zum Wildtypstamm vergleichbare ^{13}C -Inkorporationsraten erreichen die beiden Deletionsmutanen $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ (Abbildung 3.18, h-i mit j-k; Tabelle A.13.B. im Anhang). Etwas erhöhte Werte gegenüber dem WT (~Faktor 1,1) erreicht der *rpoN*-Deletionsstamm in den proteinogenen AS mit der Reihenfolge: Ser (18,7%) >> Ala (7,7%) > Glu (3,2%) > Gly (2,3%) > Asp (1,6%), dagegen ist die ^{13}C -Einbaurrate in das PHB mit 1,8 mol% etwas erniedrigt. Im Gegensatz dazu erzielt der *fleQ*-Deletionsstamm gegenüber dem WT leicht reduzierte ^{13}C -Einbauraten (~Faktor 0,9) in der Reihenfolge: Ser (16-17%) > Ala (6,7%) > Glu (2,8%) > Gly (2%) > Asp (1,3%), bei gleichzeitig leicht erhöhter ^{13}C -Einbaurrate in das PHB mit 1,7-2 mol%. Dementsprechend haben die beiden Faktoren der Flagellenbiosynthese einen gegenläufigen Einfluss auf die Verwertung von exogenem Serin als Kohlenstoffquelle für die Protein- und Lipidfraktion. Wird *FleQ* deletiert, so ist der ^{13}C -Fluss in Richtung Lipidfraktion verschoben, andersrum bei Deletion von *RpoN* findet mehr Einbau an ^{13}C aus exogenem, ^{13}C -markiertem Serin in die Proteinfraction unter den gegebenen Versuchsbedingungen statt.

Die ^{13}C -Inkorporationsraten in die Protein und Lipidfraktion von *L. oakridgensis* aus exogenem, ^{13}C -markiertem Serin ist für proteinstämmiges Serin (35 – 42%; Faktor 2) und für das Speicherpolymer PHB (8-12%; Faktor 6) signifikant erhöht. In den proteinogenen AS Ala (6,6-8%), Glu (3,4-4%), Gly (3%) und Asp (2,3%) unterscheidet sich die ^{13}C -Einbaurrate von *L. oakridgensis* (Abbildung 3.18, l-m; Tabelle A.13.B im Anhang) nicht wesentlich von *L. pneumophila*.

Isotopologmuster aus [U-¹³C₃]Serin:

Nicht nur die ¹³C-Excess-Werte, sondern auch die Isotopologmuster der proteinogenen AS und des Speicherstoffs PHB sind für die Experimente mit *L. pneumophila* WT kultiviert im AYE-Medium mit 3 mM [U-¹³C₃]Serin gleich denen von Eylert *et al.* (2010). Demnach kann man davon ausgehen, dass eine gleiche Verstoffwechslung von exogenem Serin, wie es in Eylert *et al.* (2010) und in Kapitel I. 6.1.4. beschrieben ist, stattfindet. Demzufolge wird exogenes [U-¹³C₃]Serin aus dem Medium aufgenommen und zu einem hohen Anteil unverstoffwechselt in das Protein eingebaut (fast 90% M+3-Isotopomer-Anteil; Abbildung 3.19; a-b). Dies stimmt gut überein mit Literaturdaten, wonach Serin das Wachstum von *L. pneumophila* untertützt und als wichtige Energiequelle dient (George *et al.*, 1980; Tesh *et al.*, 1983). Bereits 1984 konnten Keen und Hoffmann eine hohe enzymatische Aktivität für die Serindehydratase in *L. pneumophila* nachweisen, so ist eine weitere Verstoffwechslung von aufgenommenem Serin findet hin zu [¹³C₃]Pyruvat erklärbar, welches wiederum zu [¹³C₃]-Ala transaminiert wird. Die [¹³C₂]-Isotopomere des Serins und Alanins deuten auf ein Serin-Recycling über anaplerotische Reaktionen, vor allem über Bildung von [¹³C₂]PEP aus [1,2-¹³C₂]-OAA hin (Abbildung 1.21, Kapitel I. 6.1.4). Des Weiteren werden [¹³C₂]- und [¹³C₁]-Acetyl-CoA Spezies in den TCA-Zyklus eingeschleust, wodurch aufgrund der *Si*-spezifischen Citratsynthase [4,5-¹³C₂]- und [5-¹³C₁]-α-KG, bzw. -Glutamat entsteht. Aufgrund der Teilsymmetrisierung von Fumarat entstehen durch die Katalyse der Malatsynthase sowohl [1,2-¹³C₂]- als auch [3,4-¹³C₂]-Malat zu gleichen Anteilen. Dies spiegelt sich dementsprechend im Isotopologmuster des Aspartats wieder (Abbildung 1.21 und 3.16). Durch die Carboxylierung von [¹³C₃]Pyruvat mit unmarkiertem CO₂ entsteht [¹³C₃]-OAA und demzufolge auch [¹³C₃]-Asp, jedoch zu einem relativ geringem Anteil. Durch Übertragung von unmarkiertem Acetyl-CoA auf [¹³C₃]-OAA entsteht der relativ geringe Anteil an [¹³C₃]-Isotopomeren in Glu (Abbildung 3.16).

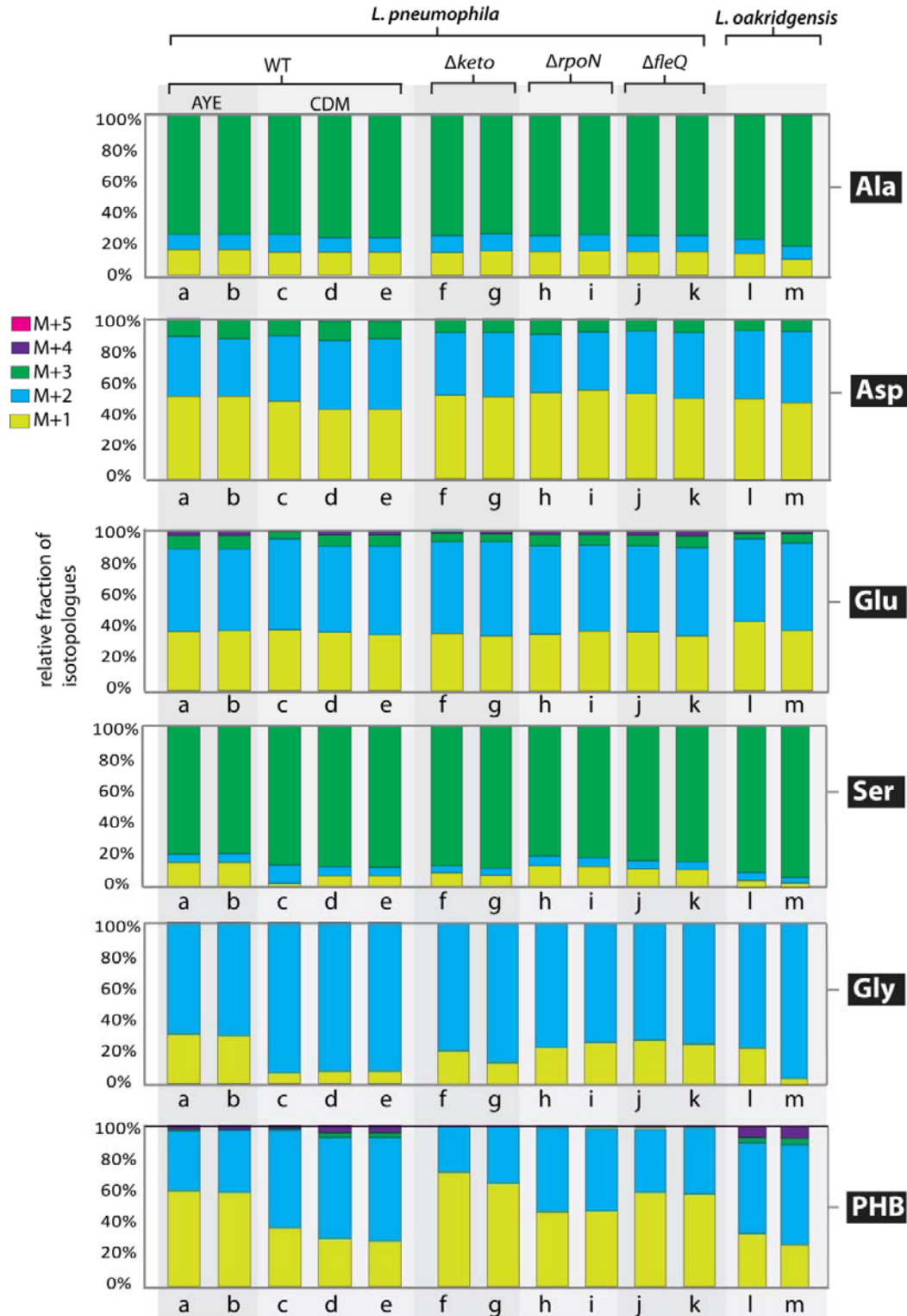


Abbildung 3.19: Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly und des Speicherstoffs PHB von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* in Anwesenheit von 3 mM $[U-^{13}C_3]$ Serin. Alle Experimente (außer anders gekennzeichnet) fanden im AYE-Medium statt.

Glycin entsteht zum größten Teil aus $[^{13}C_3]$ Serin, jedoch zu einem nicht unwesentlichen Anteil vermutlich auch durch Fixierung von $^{13}CO_2$ (das bei der Decarboxylierung von

[$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat zu [$^{13}\text{C}_2$]-Acetyl-CoA frei wird) durch die Glycin-synthase. Die Biosynthese von PHB geht von [$^{13}\text{C}_2$]- und [$^{13}\text{C}_1$]-Acetyl-CoA bzw. unmarkiertem Acetyl-CoA aus und resultiert in [$^{13}\text{C}_2$]- bzw. [$^{13}\text{C}_1$]-3-HB, bzw. PHB (Abbildung 3.19).

Auf vergleichbare Weise wird exogenes ^{13}C -Serin auch im chemisch definierten Medium von *L. pneumophila* WT verstoffwechselt. Lediglich der Anteil an M+2-Isotopomeren ist in Glycin leicht erhöht, was für eine verstärkte Synthese aus [$^{13}\text{C}_3$]Serin spricht. Zudem ist der Anteil an M+2-Isotopomeren in PHB leicht erhöht. Dies spricht für einen verstärkten Fluss direkt aus [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat zu [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA in die Lipidfraktion und spiegelt sich auch im leicht erhöhten ^{13}C -Excess-Wert wieder (Abbildung 3.19, c-e).

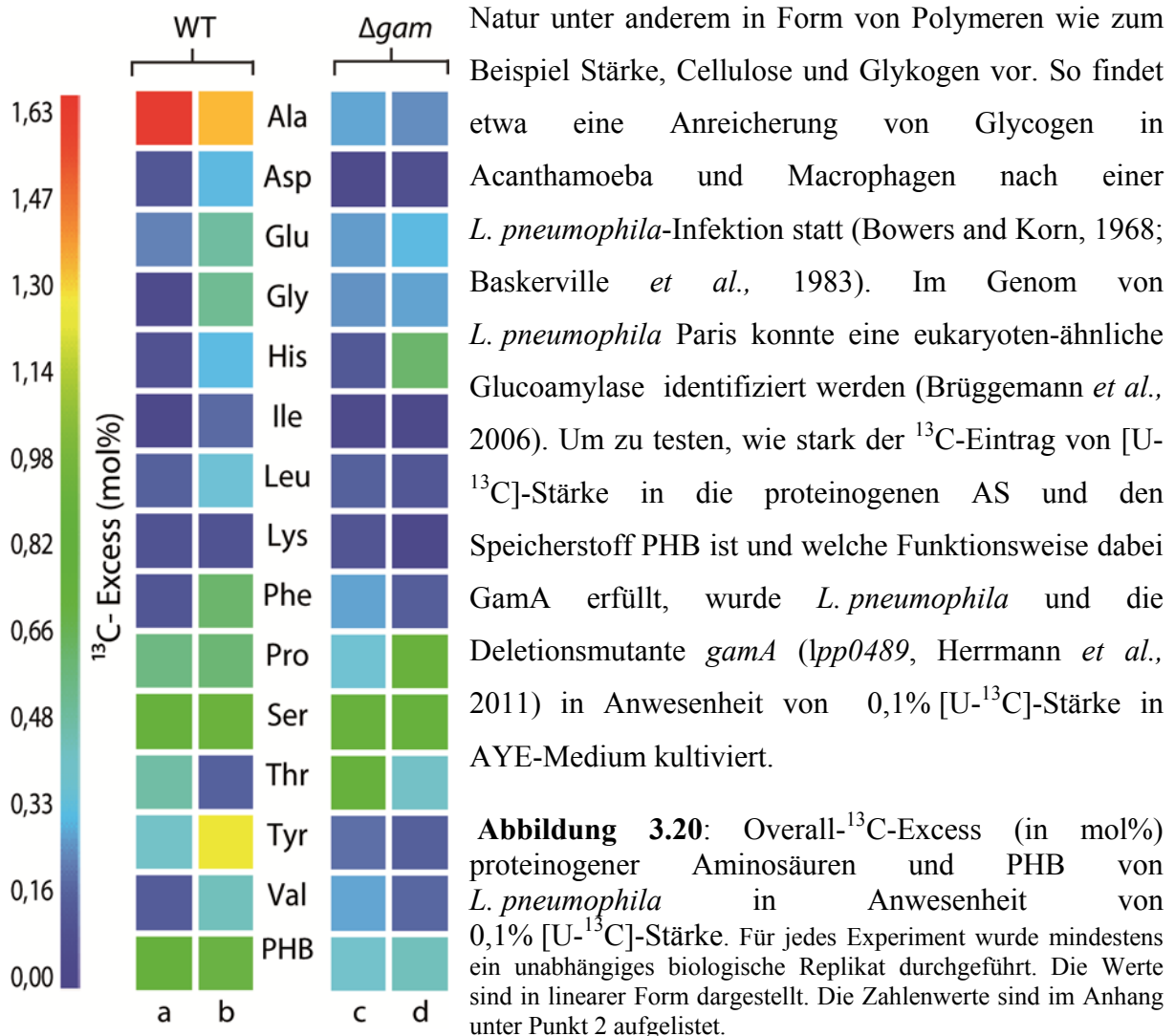
Die beiden Deletionsmutanten *rpoN* und *fleQ* unterscheiden sich nicht in den ^{13}C -Profilen des Wildtypstammes, weswegen angenommen werden kann, dass diese Serin auf gleiche Weise verstoffwechseln wie der WT. Demnach hat eine Deletion dieser Faktoren keinen Einfluss auf die Art der Serin-Nutzung (Abbildung 3.19, h-i mit j-k).

Dasselbe gilt auch für die Stoffwechselmutante $\Delta keto$ für die Proteinfraktion. Lediglich im ^{13}C -Profil des Speicherstoffs PHB unterscheidet sich $\Delta keto$ signifikant vom WT. Dies ist verursacht durch die Deletion einer β -Ketothiolase, wonach weniger PHB aus [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA aus dem aus [$^{13}\text{C}_3$]Serin gebildeten Acetyl-CoA-Pool *de novo* entsteht (vergleichbar mit den Ergebnissen der Experimente mit markierter Glucose) (Abbildung 3.19, f-g).

L. oakridgensis weist unter den gegebenen Versuchsbedingungen signifikant ähnliche Isotopolog-Muster in den proteinogenen AS auf wie *L. pneumophila*, demzufolge kann man annehmen, dass *L. oakridgensis* exogenes Serin auf die gleiche Weise verwertet wie *L. pneumophila*. Auffallend ist der leicht erhöhte Anteil an M+3-Isotopomeren in Serin. Einhergehend mit den erhöhten ^{13}C -Excess-Werten spricht dies für einen sehr starken direkten Einbau von Serin in das bakterielle Protein, viel stärker noch als es in *L. pneumophila* der Fall ist. Ein möglicher Grund dafür könnte der Mangel an Glucosetransportern sein. Dementsprechend ist kein switch im Metabolismus zwischen replikativer und transmissiver Phase möglich (im gegensatz zu *L. pneumophila*), so dass dies durch einen erhöhten Stofffluss aus aufgenommenen AS (in diesem Falle Serin) kompensiert werden könnte. Zu einem ähnlichen Schluss kann man bei der Betrachtung der PHB-Isotopologe kommen. Neben einem generellen verstärkten Einbau von ^{13}C aus ^{13}C -markiertem Serin (6-fach) ist ein erhöhter Anteil an M+2 und M+4-Isotopomeren beobachtbar. Dies spricht für eine verstärkte *de novo* Syntheserate aus [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA (entstanden aus [$^{13}\text{C}_3$]Serin).

2.1.1.4. ^{13}C -Profile von *L. pneumophila* kultiviert mit $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Stärke

Wie bereits bekannt ist, kann *L. pneumophila* Glucose verstoffwechseln und als Kohlenstoffquelle zur *de novo*-Synthese von proteinogenen AS und PHB nutzen (Brüggeman *et al.*, 2006; Eylert, 2009; Eylert *et al.*, 2010, Herrmann *et al.*, 2012). Glucose kommt in der



Im *L. pneumophila* Wildtypstamm findet hauptsächlich ein ^{13}C -Einbau aus exogener $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Stärke in das proteinstämmige Alanin, mit einem Überschuss von maximal 1,6 mol %. Auch die Lipidfraktion ist mit PHB zu 0,7 mol % markiert.

In der *gamA*-Deletionsmutante ist dagegen unter diesen Versuchsbedingungen keine signifikante ^{13}C -Anreicherung weder in die Protein- noch in die Lipidfraktion detektierbar (Abbildung 3.20, c-d; relativ hohe Standardabweichung in den Messungen, verglichen mit den mol%-Werten; Tabelle A.15 im Anhang).

2.1.1.5. ^{13}C -Profile von *L. pneumophila* kultiviert mit $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Fettsäuren

In den Experimenten mit 0,1% $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Fettsäuren findet weder im Wildtypstamm noch in dem *keto*-Deletionsstamm ein signifikanter Eintrag von ^{13}C -Atomen in das bakterielle Protein statt (Tabelle A.16 im Anhang).

Im *L. pneumophila* Wildtypstamm lässt sich eine geringe ^{13}C -Anreicherung im PHB detektieren, wobei hauptsächlich M+2-Isotopomere auftreten (Tabelle 3.4). Dagegen sind die Messwerte der Δ *keto*-Mutante sehr gering mit hohen Standardabweichungen, so dass man davon ausgehen kann, dass auch im PHB kein signifikanter Einbau von ^{13}C aus $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Fettsäuren geschieht.

Tabelle 3.4: Isotopomerzusammensetzung von *L. pneumophila* WT und Δ *keto* kultiviert in AYE-Medium supplementiert mit 0,1% $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Fettsäuren. Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen (ermittelt anhand GC/MS) mit Standardabweichung.

<i>Legionella pneumophila</i>					
		WT		Δ <i>keto</i>	
PHB	M+0	98,19 %	0,28 %	98,74 %	0,52 %
	M+1	0,58 %	0,23 %	0,08 %	0,13 %
	M+2	1,07 %	0,22 %	0,62 %	0,47 %
	M+3	0,07 %	0,02 %	0,33 %	0,34 %
	M+4	0,09 %	0,07 %	0,24 %	0,32 %

2.1.1.6. Diskussion

Charakterisierung des Kohlenhydratstoffwechsels von L. pneumophila und L. oakridgensis:

Wie schon aus Vorgängerstudien bekannt, wird Glucose von *L. pneumophila* für die Biosynthese von Aminosäuren und PHB verwendet (Eylert, 2009; Eylert *et al.*, 2010; Hermann, 2012). Dies wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt und noch weiter charakterisiert.

Da in den Experimenten mit chemisch definiertem Medium (CDM) nur in Ala (Glu, Asp, Gly, Ser und PHB um den Faktor 2-3 niedriger) vergleichbar hohe ^{13}C -Einbauraten (in mol%) wie mit AYE-Medium erreicht wurden und zudem die Verdopplungszeit von *L. pneumophila* im AYE-Medium kürzer ist (Herrmann, 2012), wurde in weiteren Studien das gebräuchlichere AYE-Medium als Kulturmedium verwendet.

Durch den Einsatz von [1,2-¹³C₂]Glucose wird deutlich, dass der Entner-Doudoroff-Weg der Hauptweg zur Glucoseverstoffwechslung ist. Dies ist ersichtlich aus den resultierenden Isotopolog-Profilen in *L. pneumophila* WT von Ala ([1,2-¹³C₂]), PHB ([1-¹³C₁]- und [3-¹³C₁]-Isotopologe), Glu ([1-¹³C₅]) und Asp ([1-¹³C₁]- und [4-¹³C₁]-Spezies) (Abbildung 3.21, WT). Da sich in den Endprodukten mit Acetyl-CoA als Intermediat nur noch eine Einfachmarkierung, nicht jedoch eine Zweifachmarkierung wiederfindet, kann eine Verstoffwechslung nur über den KDPG-Weg stattfinden, der letztendlich zu [1,2-¹³C₂]-Pyruvat und dementsprechend zu [1-¹³C₁]-Acetyl-CoA führt. Verglichen mit den ¹³C-Einbauraten aus [U-¹³C₃]Serin (Eylert *et al.*, 2010) sind die *de novo*-Syntheseraten aus Glucose zwar relativ gering, weswegen Glucose als Hauptkohlenstoff- und Energiequelle ausgeschlossen ist. Dies stimmt gut mit früheren Arbeiten überein, in denen postuliert wird, dass Glucose kein wachstumsfördernden Einfluss hat (Pine *et al.*, 1979; Warren and Miller, 1979). Dennoch trägt ein intakter Entner-Doudoroff-Weg erheblich zur Fitness von *L. pneumophila* bei (Eylert *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2010; Herrmann, 2012). Besonders deutlich zeigt sich dieser Sachverhalt in der verminderten Replikationsfähigkeit des *zwf*-Deletionsstamm (Deletion in Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase).

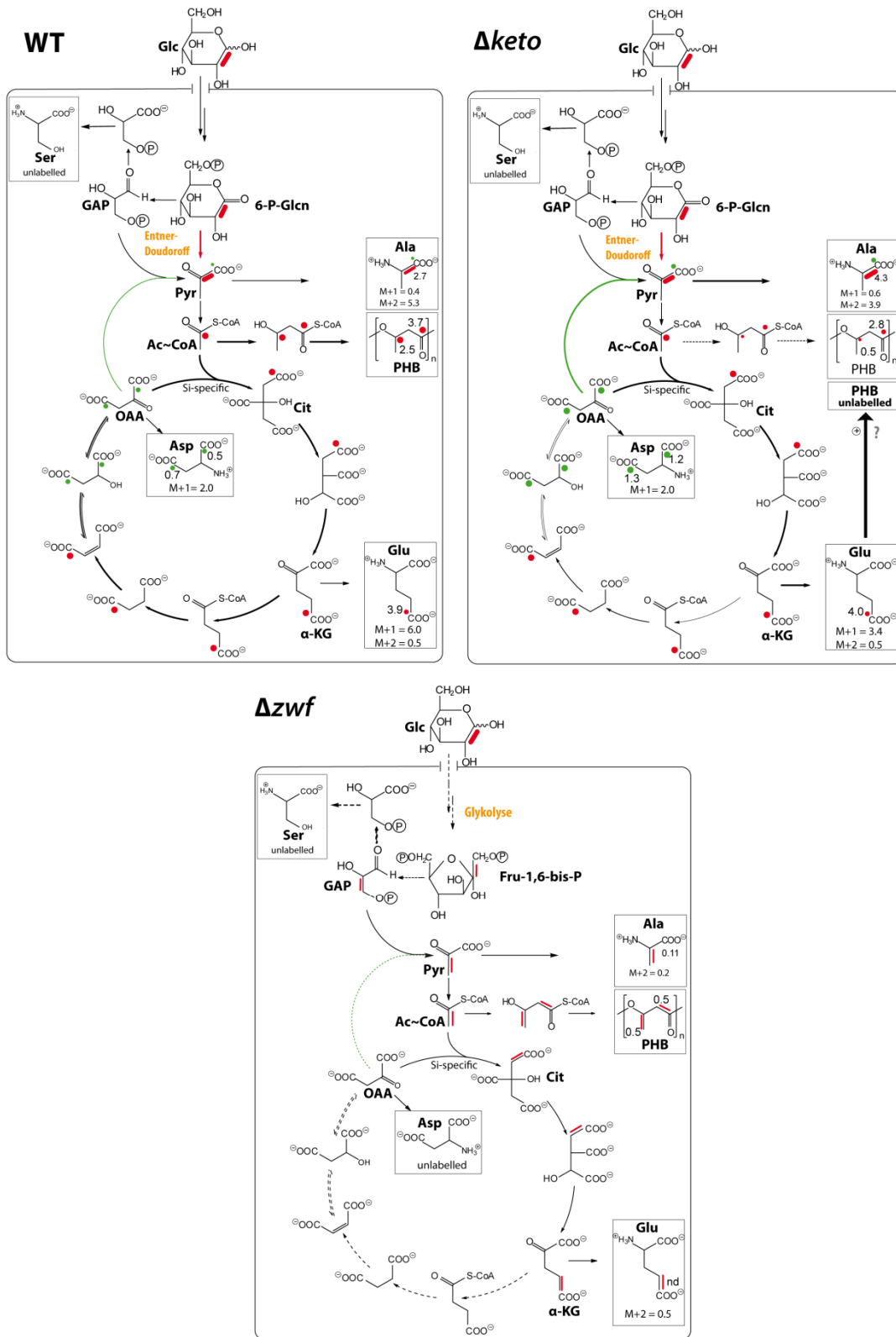


Abbildung 3.21: Modell der Glucose-Verstoffwechslung in *L. pneumophila* WT, Δ keto und Δ zwf, kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [1,2- 13 C $_2$]Glucose. Dargestellt sind die 13 C-Profile von proteinogenen AS und PHB (in Boxen). Farbige Balken und Punkte repräsentieren NMR-Spektroskopie-Ergebnisse, die M+X-Werte beziffern die molaren Häufigkeiten der entsprechenden Isotopologe aus Massenspektrometrischen Daten berechnet.

Diese verminderte Replikationsfähigkeit zeigt sich nach mehreren erfolgreichen Infektionszyklen (mit dazwischenliegenden, viertägigen Inkubationsphasen) in nährstoffarmer Umgebung und ist besonders ausgeprägt bei einer gleichzeitigen Infektion der Wirtszellen mit dem isogenetischen Wildtypstamm. In Konkurrenz wird der Deletionsstamm nach vier Infektionszyklen vom Wildtypstamm vollkommen verdrängt und ist nicht mehr nachweisbar (Eylert *et al.*, 2010; Herrmann, 2012).

Interessanterweise ist die ^{13}C -Einbaurate aus Glucose in die proteinogenen AS und das PHB im *zwf*-Deletionsstamm nicht vollkommen blockiert, sondern findet zu einem geringen Ausmaß (um den Faktor 8-10 geringer) über die Glykolyse statt. Dies ist möglich, da *L. pneumophila* alle kodierenden Enzyme zur Glykolyse besitzt. So sind die ^{13}C -Profile von $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Ala, $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ - und $[3,4-^{13}\text{C}_2]$ -PHB, $[4,5-^{13}\text{C}_2]$ -Glu erklärbar über den glykolytischen Abbau von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose (Abbildung 3.21; Δzwf). So bleibt die Zweifachmarkierung über den Abbau von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose zu $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Fru-1,6-bis-P hin zu $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -GAP und letztendlich zu $[2,3-^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA. Der geringe Umsatz von Glucose über die Glykolyse ist im Einklang mit den durch Keen and Hoffmann gemessenen sehr geringen Enzymaktivitäten (Pine *et al.*, 1984), scheint aber bei intaktem ED-Weg negativ reguliert zu sein.

Lange Zeit wurde die Rolle der Glucose als Kohlenstoffquelle für *L. pneumophila* in der Literatur vernachlässigt (Pine *et al.*, 1979; Tesh *et al.*, 1983), aber gerade durch neuere Studien konnte gezeigt werden, dass Glucose (und deren Verwertung über den ED-Weg) durchaus eine wichtige Rolle (u. a. in der Fitness und das Replikationsverhalten) für *L. pneumophila* spielt (Brüggemann *et al.*, 2006; Eylert, 2009; Harada *et al.*, 2010; Eylert *et al.*, 2010; Herrmann, 2012). Dies wird mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit bestätigt. Es ist anzunehmen, dass unter anderem Glucose (oder ein aus Glucose-Monomeren bestehendes Polysaccharid) ein wichtiges Substrat innerhalb der Replikationsvakuolen für *L. pneumophila* darstellt. Bemerkenswert ist an dieser Stelle der Mangel an Glucosetransportern in *L. oakridgensis* und der daraus resultierende fehlende Eintrag von ^{13}C in die proteinogenen AS und das PHB aus ^{13}C -markierter Glucose.

PHB-Biosynthese aus ¹³C-markierter Glucose:

Zur näheren Bestimmung der PHB-Biosynthese und der dazu genutzten Substrate in *L. pneumophila* wurden in vorliegender Arbeit Experimente mit markierter Glucose und einem β -Ketothiolase-Deletionsstamm (*keto*, EC 2.3.1.9./lpp1788) (Kapitel I.6.1.4)) analysiert. In *L. pneumophila* gibt es drei homologe Gene für eine β -Ketothiolase (*lpp1788*, *lpp1309* und *lpp1555*; Herrmann, 2012). Die Biosynthese von PHB geht von zwei Molekülen Acetyl-CoA aus, welche mit der β -Ketothiolase durch eine Claisen-Kondensation zu Acetoacetyl-CoA umgewandelt werden (Abbildung 3.22; und Kapitel I.6.1.4.). Die Deletion des *lpp1788*-Gens führt zu kontroversen Ergebnissen: Einerseits findet ein verminderter Eintrag von ¹³C aus ¹³C-markierter Glucose in das Speicherpolymer statt. Dies kann leicht erklärt werden, durch die Deletion einer β -Ketothiolase. Die Isotopolog-Muster von PHB sind in den Experimenten mit [U-¹³C₆]Glucose und [1,2-¹³C₂]Glucose anders als im Wildtypstamm, zudem sind die Einbauraten um den Faktor 3 bis 6 geringer. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die β -Ketothiolase (*lpp1788*) 3- bis 6-fach aktiver beteiligt ist an der *de novo*-Synthese von PHB aus Glucose als es die beiden anderen homologen Gene sind. Gleichzeitig fließt somit mehr [¹³C₂]-Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus, wodurch ein leicht verstärkter Einbau von ¹³C in die AS Glu und Asp im Vergleich zum WT hervorgerufen wird (Abbildung 3.21; Δ *keto*). Dennoch kommt es zu keiner Blockade der PHB-Synthese. Vielmehr findet andererseits im *keto*-Deletionsstamm eine Akkumulation von PHB statt, so dass letztendlich mehr PHB als vergleichsweise im WT produziert wird (Herrmann, 2012 und Heuner, unpublished Data). Somit muss das entstehende PHB bevorzugt aus anderen Substraten synthetisiert werden (Abbildung 3.21; Δ *keto*). Denkbar wäre dabei zum Einen die Vernetzung der β -Oxidation der Fettsäuren mit der PHB-Synthese am Crotonyl-CoA bzw an dem D- β -Hydroxybutyryl-CoA (Abbildung 3.VV), sowie es zum Beispiel bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Aeromonas caviae* der Fall ist (Langenbach *et al.*, 1997; Fukui *et al.*, 1998; Steinbuchel and Hein, 2001), wodurch der Abbau von Fettsäuren am Acetoacetyl-CoA stoppt, dieses akkumuliert und dann in die PHB-Synthese einfließt (Abbildung 3.VV). Somit wären die beiden wichtigen Prozesse, die die PHB-Synthese vereint und zwar die Speicherstoffherstellung bei simultaner Rückgewinnung an Reduktionsäquivalenten (Mauchline *et al.*, 1992; Kanir and Shimizu, 2003) erfüllt, wenn auch nicht zum gleichen Zeitpunkt wie im Wildtypstamm, sondern erst bei Akkumulation von Acetoacetyl-CoA aus der Fettsäure-Oxidation, weswegen die leicht zeitverzögerte Wachstumskurve im *keto*-Deletionsstamm auftreten könnte (Herrmann, 2012).

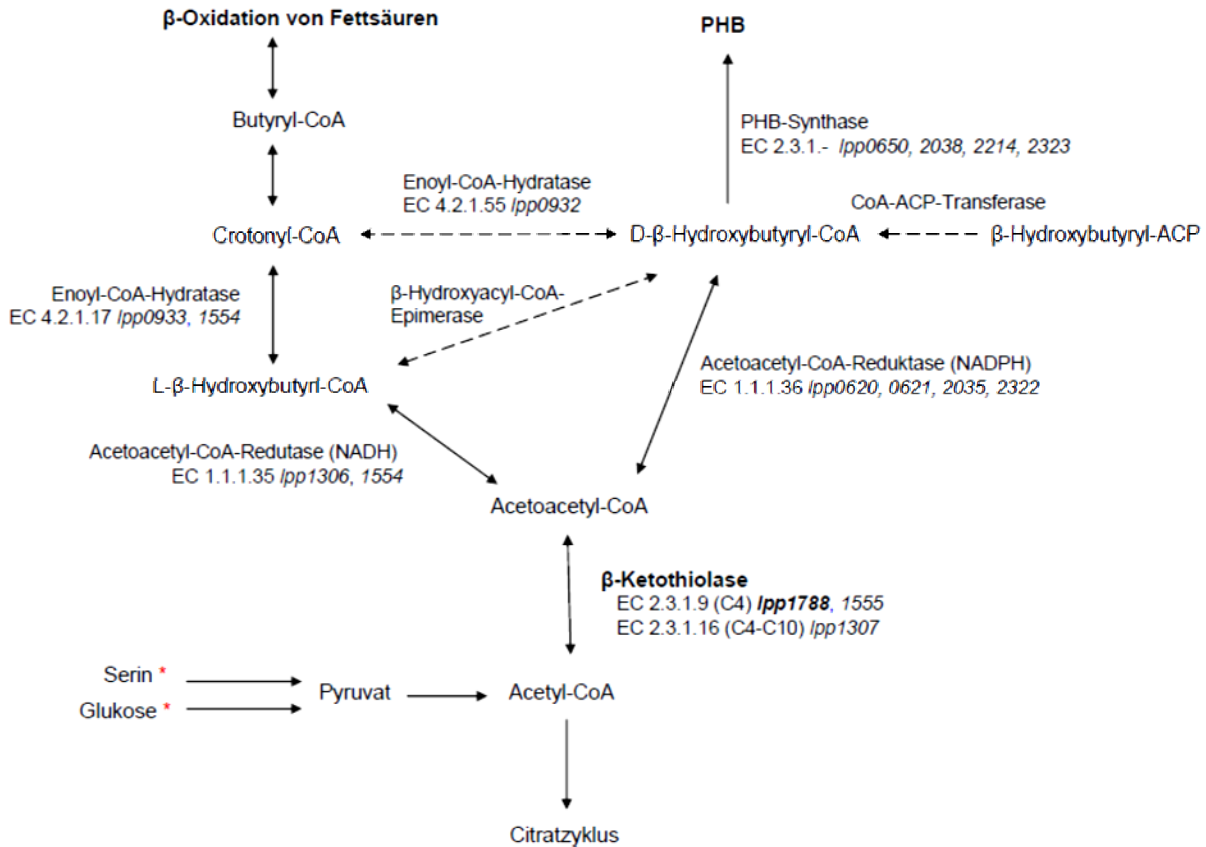


Abbildung 3.22: Putatives Modell der Verknüpfung der β -Oxidation der Fettsäuren sowie der Biosynthese von Polyhydroxybutyrat (PHB) in *L. pneumophila* (Herrmann, 2012). Putative Gene sind kursiv eingezeichnet; das deletierte Gen ist zudem hervorgehoben (fett). Ein Stern kennzeichnet die verwendeten ^{13}C -markierten Substrate, gestrichelte Pfeile zeigen hypothetische Reaktionen. C4, C10 steht für Substrate mit 4 bzw. 10 C-Atomen.

Die Akkumulation des PHBs könnte auch stattfinden, wenn die β -Ketothiolase maßgeblich an der Degradation von PHB beteiligt wäre und somit ein zeitverzögerter Abbau im *keto*-Deletionsstamm vorhanden wäre. Zum Anderen wären aber auch Glutamat, 3-Butyn-1-ol oder Butanol als Ausgangssubstrate für die PHB-Synthese möglich (vergleiche dazu Abbildung 1.23; Kapitel I.6.1.4.; modifiziert aus KEGG-Databse). Vermutlich trägt Glutamat zu einem sehr großen Anteil an der PHB-Synthese bei, da dies die verstärkten Einfachmarkierung an der C4-Position im Monomer 3-HB in den Experimenten mit $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glucose}$ erklären könnte (Abbildung 3.21; Δ *keto*). Denkbar wäre auch eine Kondensationsreaktion über Acetyl-CoA und Glyoxylat, so dass C1 aber nicht C3 markiert wäre. Aus welchen Vorstufen diese verstärkte PHB-Synthese in Δ *keto* geschieht, kann auf Grundlage der aktuellen Ergebnisse nicht vollständig geklärt werden und bedarf noch weiterer Untersuchungen mit anderen ^{13}C -markierten Vorstufen, wie zum Beispiel mit $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$, $[\text{U}-^{13}\text{C}_5]\text{Glutamat}$ oder $[\text{U}-^{13}\text{C}_3]\text{Glycerol}$.

Der Einfluss von RpoN und FleQ auf den Kohlenhydratstoffwechsel:

Neben den Deletionsstämmen in Stoffwechselenzymen (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und β -Ketothiolase) wurden in vorliegender Arbeit auch Deletionsstämme der Flagellenbiosynthese ($\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$) kultiviert in 11 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose untersucht, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Virulenz und Metabolismus aufzudecken. FleQ und RpoN sind beide involviert in die Regulation der Expression (Hochregulation) der Klasse II-Flagellen Gene *fliM*, *fleN* und *fleSR* (Albert-Weissenberger *et al.*, 2010). Beide Deletionsstämme sind nicht flagelliert. Interessanterweise ist die *de novo* Syntheserate aus [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose im Vergleich zum Wildtypstamm sowohl in die proteinstämmigen AS als auch in das PHB um den Faktor 1,5 bis 2 erhöht, bei gleichen Isotopomer-Verhältnissen (außer für $\Delta rpoN$ im Gly) wie im Wildtypstamm. Dementsprechend kann man davon ausgehen, dass der Stofffluss von Glucose in die proteinogenen AS und das PHB über den ED-Weg bis zu 4-fach erhöht ist gegenüber der ED-Enzymaktivität des Wildtypstamms, da es neben dem erhöhten Eintrag von ^{13}C in den TCA-Zyklus und damit in Glu und Asp auch zu einem verstärkten ^{13}C -Überschuss in die Lipidfraktion (dem PHB) an der Schnittstelle Acetyl-CoA kommt. Hervorzuheben ist an dieser Stelle die Verschiebung des Isotopomerverhältnisses in $\Delta rpoN$ bei Glycin hin zu einem erhöhten M+2-Anteil im Vergleich zum WT. Somit wird in der $\Delta rpoN$ -Mutante mehr Glycin aus dem, aus [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose entstandenden [$^{13}\text{C}_3$]Serin produziert, als das im WT und den anderen Mutanten der Fall ist. Denkbar wäre daher ein aktivierender Einfluss von RpoN auf die Glycinsynthese-aktivität, der in der Deletionsmutante wegfällt und kompensiert werden muss. Dies könnte in weitergehenden Studien mit $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ beispielsweise verifiziert werden. Da beide Deletionsmutanten den Virulenzfaktor „Flagelle“ nicht ausbilden und das Virulenznetzwerk nicht vollständig ist, könnte sowohl $\Delta rpoN$ als auch $\Delta fleQ$ attenuiert in der Pathogenität. Erklärbar wären die erhöhten mol% an ^{13}C in die proteinogenen AS und das PHB aus ^{13}C -markierter Glucose, da kein (oder ein abgeschwächter) switch im Metabolismus (Kapitel III.2.1.2.) beim Übergang von replikativer zu transmissiver Phase stattfindet. Somit könnte $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ schon während der replikativen Phase bei niedrigen OD_{600} -Werten auch vermehrt (im Vergleich zum WT) Zucker als Kohlenstoffquelle nutzen, da die negative Regulation beider Sigmafaktoren wegfällt. So kann quantitativ über die Zeit mehr ^{13}C aus [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose in die proteinogene AS und das PHB inkorporiert werden. Die Theorie, dass beide Mutanten eher einen transmissiven Metabolismustyp ausbilden wird später noch anhand Metabolomstudien bekräftigt. Konform dazu sind auch Transkriptomdaten von Albert-

Weissenberger *et al.* (2010), wonach von beiden Regulatoren hauptsächlich Gene für die replikative Phase betroffen sind. Um diese These weiter zu testen, müssen beide Deletionsmutanten zeitaufgelöst zu verschiedenen OD₆₀₀-Werten mit ¹³C-markierten Substraten ([U-¹³C₆]Glucose und [U-¹³C₃]Serin) kultiviert und geerntet werden (Kapitel II. 4.4 und Abbildung 2.1).

Charakterisierung der Nutzung der glucogenen Aminosäure Serin als Kohlenstoffquelle für *L. pneumophila* und *L. oakridgensis*:

Bisherigen *in vitro*-Studien zufolge nutzt *L. pneumophila* hauptsächlich Aminosäuren, vor allem Serin, Glutamat (beide glucogen) und Threonin (ketogen) als Energie- und Kohlenstoffquelle (Pine *et al.*, 1979; George *et al.*, 1980; Tesh and Miller, 1981). Nachdem *L. pneumophila* in der Natur freilebend überwiegend intrazellulär repliziert, ist dies leicht nachvollziehbar. Dementsprechend eignet sich [U-¹³C₃]Serin sehr gut als Substrat, um nachvollziehen zu können, auf welche Weise *L. pneumophila* angebotene AS verstoffwechselt.

Die analysierten Experimente im AYE-Medium von *L. pneumophila* WT stimmen sehr gut mit bereits publizierten Daten aus Eylert *et al.* (2010) überein, weswegen man davon ausgehen kann, dass die Verwertung von Serin als Kohlenstoffquelle für proteinogene AS und PHB auf gleiche Weise unter den gegebenen Versuchsbedingungen stattfindet (Abbildung 1.21 in Kapitel I. 6.1.4). Obwohl die ¹³C-Einbauraten im chemisch definierten Medium in Ser und Ala für *L. pneumophila* WT leicht erhöht sind, ist dennoch (bis auf Glycin) die Art der Verstoffwechslung wie in Eylert *et al.* (2010) beschrieben. In Glycin spiegelt sich lediglich der leicht verstärkte, direkte Einbau von [¹³C₃]Serin in Form von [¹³C₂]Glycin wieder. Dies liegt vermutlich an der komplexeren Zusammensetzung an AS im AYE-Medium. Da es sonst zu keinen signifikant höheren Inkorporationsraten oder anderen ¹³C-Profilen kommt als vergleichsweise im AYE-Medium wurde das gebräuchlichere AYE-Medium für alle folgenden Experimente verwendet (siehe auch Herrmann, 2012).

Die *keto*-Deletionsmutante weist ähnliche, leicht reduzierte (Faktor 0,9) ¹³C-Einbauraten in die proteinogenen AS auf, wie der Wildtypstamm. Zudem sind die Isotopolog-muster zu denen des Wildtyp identisch. Somit ist vermutlich die Verstoffwechslung von Serin in Δ *keto* und die davon abgeleitete *de novo*-Synthese des bakteriellen Proteins gleich derjenigen im Wildtypstamm. Die Deletion der β -Ketothiolase hat somit keinen Einfluss auf die Umwandlung von [U-¹³C₃]Serin zu [¹³C₃]Pyruvat und deren weitere Verstoffwechslung zu

[$^{13}\text{C}_3$]Ala, bzw. [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA. Letzteres tritt bevorzugt in den TCA-Zyklus ein, wodurch [$^{13}\text{C}_2$]Glu und [$^{13}\text{C}_2$]Asp entsteht und wird nicht zur PHB-Synthese verwendet. Dieser Sachverhalt, ist auch bei den Experimenten mit markierter ^{13}C -Glucose beobachtbar (vorangehendes Kapitel). Dies bestätigt, dass der Serin und Glucose-Stoffwechsel an der Schnittstelle Pyruvat, bzw. Acetyl-CoA zusammenläuft (Eylert *et al.*, 2010). Welche unmarkierten Vorstufen die *keto*-Deletionsmutante zur PHB-Produktion letztendlich nutzt, ist an dieser Stelle nicht klärbar und bedarf noch weiterer Studien mit anderen markierten Substraten, wie z.B. ^{13}C -markiertes Glycerol.

Die Deletion der beiden Flagellenbiosyntheseregulatoren RpoN und FleQ hat einen gegenläufigen (schwachen) Effekt auf die ^{13}C -Profile der Protein- und Lipidfraktion. So ist bei der *rpoN*-Deletionsmutante ein etwas erhöhter Stofffluss in die *de novo*- Biosynthese der proteinogenen AS (mit dem Faktor 1,1) sichtbar, bei gleichzeitig erniedrigter ^{13}C -Einbaurrate in das PHB. Ein genau entgegengesetzter Einfluss manifestiert sich in der *fleQ*-Deletionsmutante, mit einer dementsprechenden leicht reduzierten ^{13}C -Inkorporation in die proteinstämmigen AS (Faktor 0,9) und einer erhöhten ^{13}C -Einbaurrate in das PHB. In beiden Deletionsmutanten sind die Isotopolog-Profile gleich denjenigen des Wildtypstammes, so dass man davon ausgehen kann, dass eine gleiche Art der Verstoffwechslung von Serin stattfindet, lediglich zu unterschiedlichen Raten. Es ist anzunehmen, dass diese Regulation beim switch in den Wachstumsphasen passiert, da dort die Flagellenbiosynthese reguliert wird. Eine Deletion des Faktors RpoN hat demnach einen verstärkten Fluss Richtung *de novo*-Synthese von bakteriellem Protein mit Aminosäuren als Vorstufen. Denkbar wäre somit eine (negativ) regulierende Wirkung von RpoN auf die *de novo*-Synthese von Protein und eine (positive) Regulation der PHB Synthese. Bei FleQ wäre dieser Effekt dann genau andersherum, so dass beide Regulatoren vermutlich an unterschiedlichen Schnittstellen im Metabolismus, vor allem in der Regulation der PHB-Produktion und der *de novo*-Proteinbiosynthese (Flagellenproteine) angreifen. Bereits der erhöhte Einbau von ^{13}C aus ^{13}C -markierter Glucose lässt vermuten, dass die beiden Flagellenbiosyntheseregulatoren zu bestimmten Wachstumsphasen aktiv sind, dies könnte noch weiter abgeklärt werden durch zeitaufgelöste Studien mit [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]Serin.

Da *L. oakridgensis* im Gegensatz zu *L. pneumophila* keine Glucosetransporter besitzt (Heuner, *unpublished Data*) und dies auch in den Experimenten mit ^{13}C -markierter Glucose ersichtlich ist, ist es erklärbar, dass der ^{13}C -Überschuss ausgehend von [$\text{U-}^{13}\text{C}_3$]Serin in den proteinogenen AS und dem PHB verglichen mit den Werten von *L. pneumophila* stark erhöht ist. Somit sind bei *L. oakridgensis* die AS (hier Serin) sehr wichtig als Kohlenstoffquellen und

vermutlich sogar die wichtigsten Kohlenstoff- und Energiequellen. Es finden sich vergleichbare ^{13}C -Excesswerte wie in *L. pneumophila* WT zu Beginn der Wachstumsphase (siehe folgendes Kapitel). Denkbar wäre es, dass *L. oakridgensis* nicht die Präferenz der Kohlenstoffquellen im Laufe der Wachstumsphasen verändert, sondern bevorzugt AS aus dem Medium (bzw. der Wirtszellvakuole) aufnimmt und verstoffwechselt. Dementsprechend würde kein switch im Metabolismus zwischen replikativer und transmissiver Phase eingegangen werden (im Gegensatz zu *L. pneumophila*), so dass dies durch einen erhöhten Stofffluss aus aufgenommenen AS (in diesem Falle Serin) kompensiert werden könnte. Zu einem ähnlichen Schluss kann man bei der Betrachtung der PHB-Isotopologie kommen. Neben einem generellen verstärkten Einbau von ^{13}C aus ^{13}C -markiertem Serin (6-fach) ist ein erhöhter Anteil an M+2 und M+4-Isotopomeren beobachtbar. Dies spricht für eine verstärkte *de novo* Syntheserate aus [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA (entstanden aus [U- $^{13}\text{C}_3$]Serin). Vermutlich ist *L. oakridgensis* aufgrund der fehlenden Fähigkeit Glucose als Energie- und Kohlenstoffquelle zu nutzen leicht attenuiert im Vergleich zu *L. pneumophila*. Ob *L. oakridgensis* tatsächlich keine Veränderung im Metabolismus vornimmt (Anpassung an abiotische und biotische Umgebung), könnte in weiteren Studien mit zeitaufgelöster Zugabe von ^{13}C -, bzw. ^{15}N -markierten Substraten, wie beispielsweise [U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin, ^{15}N -Glutamin, oder [U- $^{13}\text{C}_3$]Glycerol analysiert werden.

Nutzung von natürlichen Polymeren, wie Stärke als Kohlenstoffquelle für L. pneumophila:

Zucker kommen in der Natur üblicherweise in Form von Polymeren vor, gerade Stärke und Cellulose sind dabei weit verbreitete, pflanzliche Kohlenhydrate. Daher kann es für das Umweltbakterium *L. pneumophila* in abiotischer Umgebung von Vorteil sein, die Fähigkeit zu besitzen solche Polymere zu spalten. Transkriptomdaten konnten zeigen, dass in *L. pneumophila* eine eukaryoten-ähnliche Glucoamylase existiert (Brüggemann *et al.*, 2006), genauer konnte diese als Glycoamylase GamA identifiziert werden (Herrmann *et al.*, 2011). Dementsprechend findet ein Abbau von [U- ^{13}C]-Stärke durch den Wildtypstamm von *L. pneumophila* statt. Da der Anteil von [U- ^{13}C]-Stärke mit 0,1% im Medium relativ niedrig ist (verglichen mit 11 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose 20-fach geringer), ist ein ^{13}C -Überschuss von 1,6 mol% in Ala und 0,7 mol% in PHB vergleichsweise hoch. *L. pneumophila* setzt die Stärke durch die Glucoamylasen um, die resultierende Glucose wird dann weiterführend im ED-Weg zu Triosen umgewandelt. Aus [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat entsteht dann zum Einen [$^{13}\text{C}_3$]Alanin zu 1,6 mol%, zum Anderen wird [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat zu [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA decarboxyliert. Letzteres fließt

dann über eine Kondensationsreaktion zu Acetoacetyl-CoA und weiteren Reaktionsschritten als PHB in die Lipidfraktion ein. Da die *gamA*-Deletionsmutante keine nachweisbaren ^{13}C -Einbauraten besitzt, kann davon ausgegangen werden, dass der gemessene ^{13}C -Überschuss im Wildtypstamm tatsächlich auf die Umsetzung der Stärke durch GamA-Aktivität zurückzuführen ist. Um diese Tatsache noch genauer zu beleuchten, könnten noch weitere Testreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen an $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Stärke durchgeführt werden.

Fettsäuren als Kohlenstoffquelle für L. pneumophila:

Ausgehend von der Situation, dass von dem *keto*-Deletionsstamm (Deletion der β -Ketothiolase *lpp1788*) weniger PHB aus dem Glucose- und Serin-stämmigen Acetyl-CoA-Pool als vergleichsweise im Wildtypstamm produziert wird, bei jedoch gleichzeitig verstärkter Produktion an PHB aus anderen (unmarkierten) Vorstufen, wird ein Zusammenhang zwischen der β -Oxidation der Fettsäuren und der PHB-Synthese vermutet (Abbildung 3.22). Um diese Hypothese zu testen, wurde *L. pneumophila* WT und Δ *keto* im AYE-Medium supplementiert mit 0,1% $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Fettsäuren kultiviert und die ^{13}C -Anreicherung in mol% im bakteriellen Protein und PHB ermittelt.

Weder im Wildtypstamm noch in der *keto*-Deletionsmutante konnten im bakteriellen Protein signifikante ^{13}C -Anreicherungen detektiert werden. Dementsprechend wird das, aus den Fettsäuren entstehende Acetyl-CoA nicht in den Citratzyklus eingeschleust um *de novo* proteinogene AS zu produzieren. Für die vergleichsweise geringen ^{13}C -Einbauraten aus markierten Fettsäuren könnte aber auch die toxische Eigenschaft der freien Fettsäuren im Medium für *Legionella* sein. Aufgrund dieser Tatsache wurde das Medium nur mit 0,1% $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ -Fettsäuren supplementiert.

Des Weiteren deuten die M+2-Isotopomere im PHB des Wildtypstamms eine Schnittstelle zwischen der β -Oxidation der Fettsäuren und PHB-Synthese auf der Ebene von Acetyl-CoA an (Abbildung 3.22). Durch die β -Oxidation der ^{13}C -markierten Fettsäuren entsteht $[\text{C}_2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA, welches kondensiert mit unmarkiertem Acetyl-CoA $[\text{C}_2\text{-}^{13}\text{C}_2]$ -PHB ergibt. Für eine Schnittstelle am Acetyl-CoA würden auch die Daten der *keto*-Deletionsmutante sprechen, die in PHB keine signifikanten ^{13}C -Einbauraten aufweist. Somit wäre die Theorie des vorangegangenen Kapitels (Abbildung 3.22; Herrmann, 2012) nicht bestätigt, eine eindeutige Widerlegung müsste aber noch durch weitere Wiederholungsversuche geschehen. An dieser Stelle kann nicht endgültig geklärt werden, warum in der *keto*-Deletionsmutante eine 2,5-fach erhöhte Anreicherung an (unmarkiertem) PHB als vergleichsweise im

Wildtypstamm auftritt (siehe vorangehendes Kapitel). Als Vorstufen für diese verstärkte PHB-Synthese können Serin, Glucose und Fettsäuren ausgeschlossen werden. Vermutlich ist die verstärkte PHB-Synthese ein Ventil für den *keto*-Deletionsstamm um überschüssiges Acetyl-CoA abzubauen. Dieser Überschuss könnte beispielsweise durch einen erhöhten Umsatz von Glycerol oder Glutamat/Glutamin entstehen. $\Delta Keto$ wächst *in vitro* etwas zeitverzögert im Vergleich zum Wildtypstamm (Herrmann, 2012), kann dies jedoch kompensieren. Zusätzlich ist in *in vivo*-Studien das Wachstumsverhalten wildtypähnlich. Es ist anzunehmen, dass $\Delta keto$ den Defekt im Fettsäuremetabolismus mit anderen Substraten – wie beispielsweise Glycerol, oder ketogenen AS (Leucin, Isoleucin, Threonin, Kapitel I.3.3.), die bei ihrem Abbau direkt in Acetyl-CoA und Acetoacetyl-CoA umgewandelt werden – kompensiert. Dies bedarf weiterführender Experimente, unter anderem mit ^{13}C -markiertem Glycerol, Threonin, Glutamat/Glutamin oder Leucin/Isoleucin.

2.1.2. Wachstumsphasenabhängige Studien

Wie bereits in Kapitel I.6.1.2. beschrieben hat *L. pneumophila* einen biphasischen Lebenszyklus (Molofsky and Swanson, 2004; Brüggemann *et al.*, 2006). Dieser ist das Produkt aus der Anpassung an die aquatische, abiotische Lebensweise und der intrazellulären Replikation in Protozoen. Gerade in der abiotischen Lebensweise in Süßwasserhabitaten ist *Legionella* äußeren Umweltfaktoren wie beispielsweise Nährstoffknappheit ausgesetzt. Daher nutzt *Legionella* in der Natur die Möglichkeit in intrazellulären Vakuolen von Protozoen parasitär zu replizieren (Rowbotham, 1986; Fields, 1996). In dieser nährstoffreichen Umgebung in der Wirtszelle herrschen ganz andere Umweltbedingungen (pH-Wert, Osmolarität), so dass es in beiden Lebensphasen signifikante Unterschiede in der Morphologie und der Expression von Virulenzgenen gibt (Heuner *et al.*, 1999; Molofsky and Swanson, 2004). Da das Angebot an Nährstoffen in beiden Kompartimenten (abiotische und biotische Umgebung) sehr divers ist, ist eine Regulation des Stoffwechsels naheliegend. Welche Änderungen letztendlich im Metabolismus stattfinden und wann im Lebenszyklus welche Energie- und Kohlenstoffquellen eine besondere Rolle innehaben, soll anhand folgender Experimente geklärt werden. Da auch im Kulturmedium die Ausprägung der reziproken Phänotypen (*virulent* versus *avirulent*) simuliert werden kann (Molofsky and Swanson, 2004), ist eine zeitaufgelöste Studie (Einteilung in verschiedene Wachstumsphasen) ein geeignetes Mittel, um eine Korrelation zwischen Virulenzausprägung und Metabolismus zu untersuchen. Dazu wurde zur Hauptkultur an bestimmten Zeitpunkten das ^{13}C -markierte

Substrat (10 mM [U-¹³C₆]Glucose, oder 3 mM [U-¹³C₃]Serin) zugegeben, sowie die Bakterienkultur geerntet (Kapitel II.4.5.).

2.1.2.1. ¹³C-Glucose und ¹³C-Serin als Kohlenstoffquellen für *L. pneumophila*

¹³C-Inkorporationsraten:

Die ¹³C-Einbauraten in die proteinogenen AS von *L. pneumophila* WT aus 10 mM [U-¹³C₆]Glucose sind zu Beginn der Bakterienkultur beim Erntepunkt OD₆₀₀ = 1 (1.) relativ gering (Ala (~1,5%) > Glu (~0,5%), Asp (~0,2%) Abbildung 3.23 (A) und Tabelle A.17.A im Anhang). Mit zunehmenden OD₆₀₀-Werten steigt die *de novo*-Synthese von proteinogenen AS aus ¹³C-markierter Glucose an. So ist die ¹³C-Inkorporationsrate im Wachstumszeitraum 2 (OD₆₀₀ = 1-1,5) um den Faktor ~1,5 in die AS Ala (~2,7%), Glu (1%) und Asp (0,3%) erhöht. In der spät-exponentiellen Wachstumsphase (3. Zeitpunkt) kurz vor dem Erreichen der stationären Wachstumsphase nimmt die ¹³C-Einbaurate noch einmal um das 2- bis 3-fache zu (Ala ~5,3%; Glu ~3%; Asp ~1,2%; Abbildung 3.23 (A) und Tabelle A.17.A). Beim Eintritt in die Stationäre Phase (4. Zeitpunkt; OD₆₀₀=1,9) wird der Fluss von ¹³C in das Protein etwas gedämpft, bleibt aber ähnlich hoch wie schon im Wachstumsabschnitt zuvor mit durchschnittlich 5,2 mol% in Ala, 2,3 mol% in Glu, 1,1 mol% in Asp und 0,9 mol% in Gly (Abbildung 3.23 (A) und Tabelle A.17.B im Anhang).

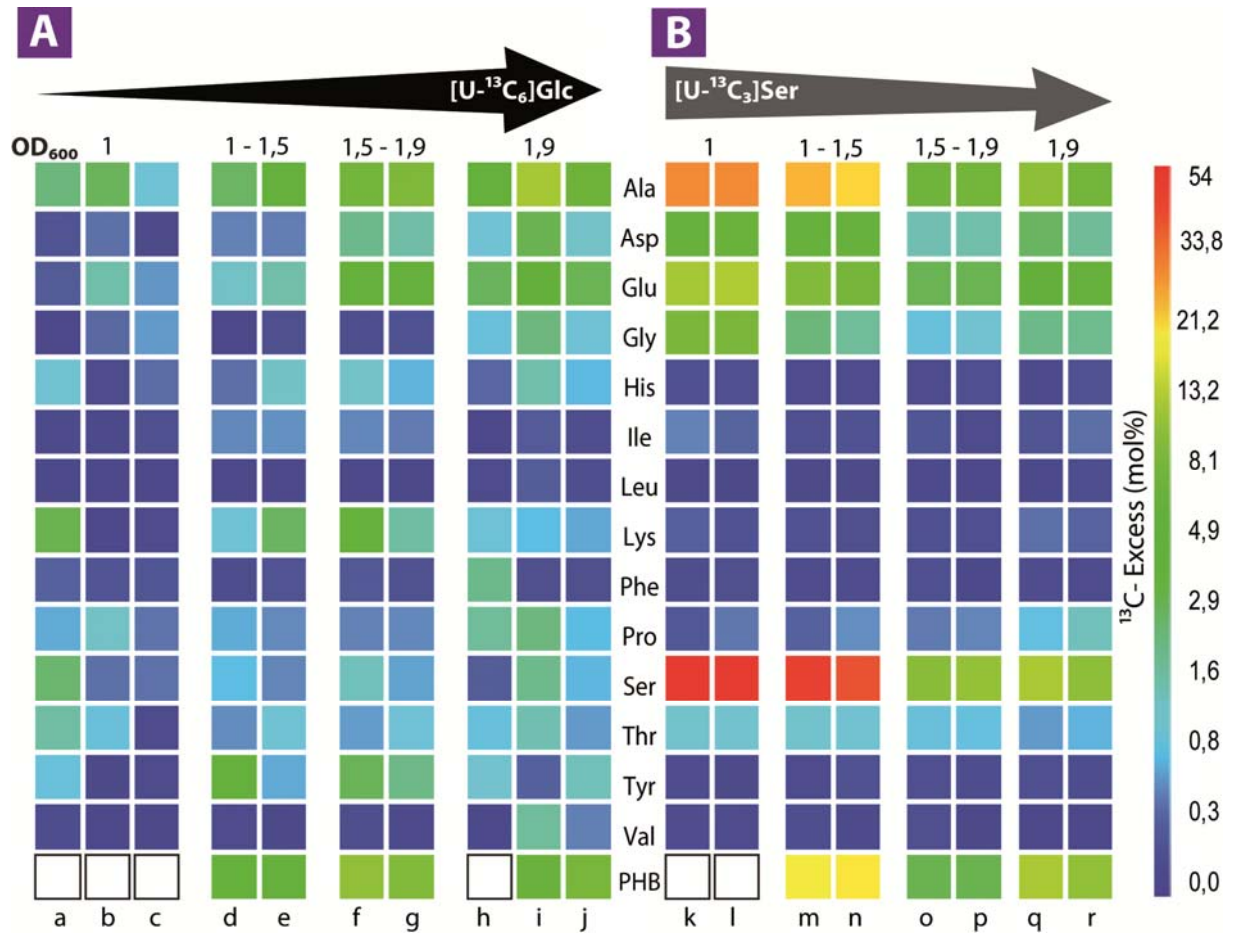


Abbildung 3.23: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von *L. pneumophila* WT in Anwesenheit von (A) 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ und (B) 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ zu verschiedenen Wachstumsphasen. Für jedes Experiment wurde mindestens ein unabhängiges biologische Replikate durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2 aufgelistet.

In den Experimenten mit 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ verhält sich die beobachtete ^{13}C -Inkorporationsrate in die Proteinfraction gegenläufig zu jener aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$. Bereits in der ersten Wachstumsphase ist der gemessene ^{13}C -Überschuss vor allem in proteinogenem Ser (54%), aber auch in Ala (18%), Glu (8%), Gly (5,5%) und Asp (4%) vergleichsweise sehr hoch (Abbildung 3.23 (B) und Tabelle A.19).

Mit zunehmendem Wachstum (2.: $\text{OD}_{600} = 1 - 1,5$) sinkt die ^{13}C -Einbaurrate um den Faktor 1,5 bis 1,9 und erreicht in proteinstämmigem Serin durchschnittlich 28,2 mol%, in Ala 13,7 mol%, in Glu 5,4 mol%, in Asp 2,3 mol% und in Gly 1,2 mol%. Dieser abnehmende Trend setzt sich in der darauffolgenden Wachstumsphase (3. Abschnitt: $\text{OD}_{600} = 1,5 - 1,9$) weiter fort (Ser: 6,5%; Ala: 4,6%; Glu: 1,8%; Asp: 1%; Gly: 0,7%).

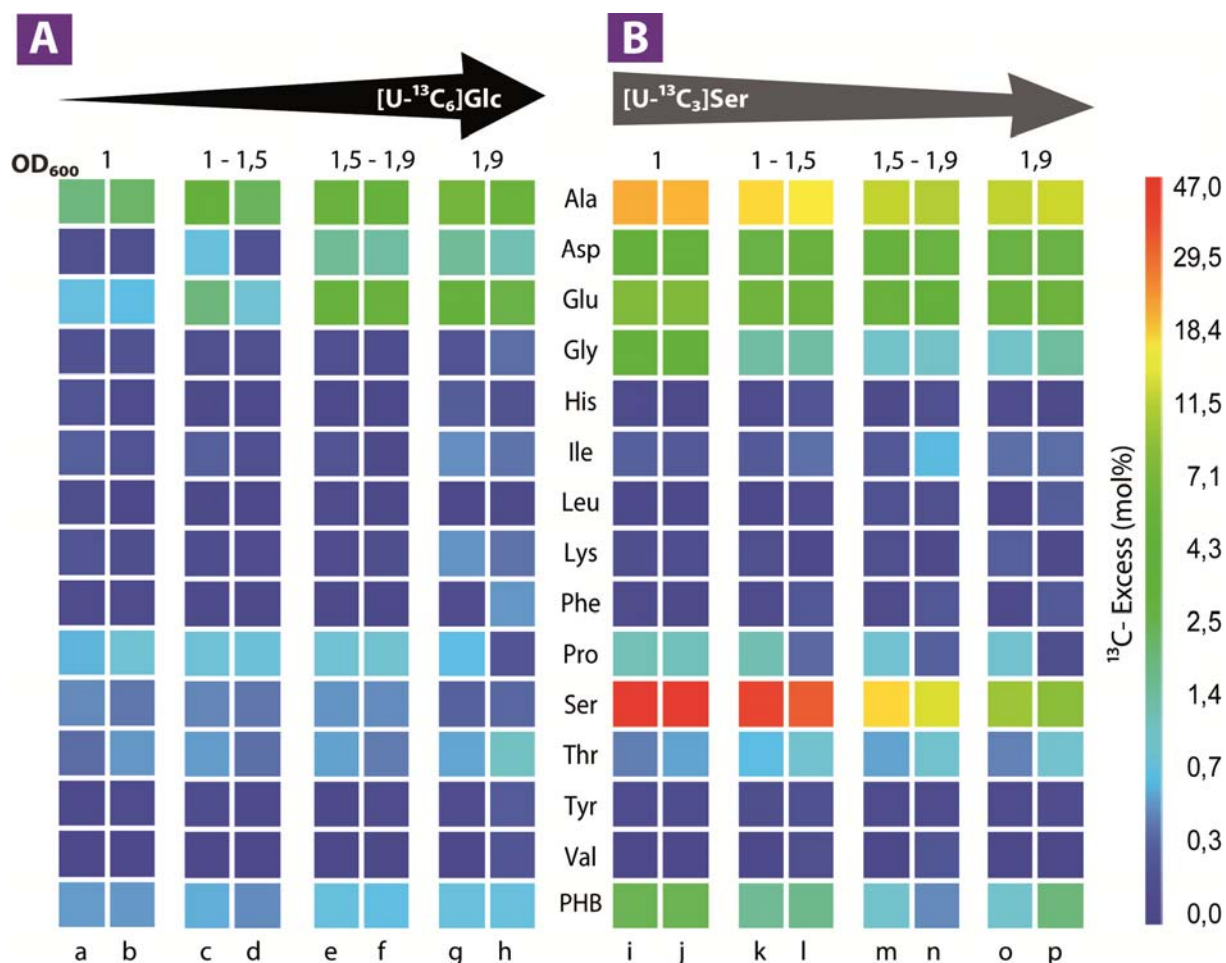


Abbildung 3.24: Overall-¹³C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von *L. pneumophila* $\Delta keto$ in Anwesenheit von (A) 10 mM $[U-^{13}C_6]$ Glucose und (B) 3 mM $[U-^{13}C_3]$ Serin zu verschiedenen Wachstumsphasen. Für jedes Experiment wurde mindestens ein unabhängiges biologische Replikate durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ¹³C-Excess-Werten farblich hervorzuheben. Aminosäuren mit weißen, schwarzumrandeten Kästchen konnten nicht detektiert werden. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2.

Zu diesem Zeitpunkt zeigen die ¹³C-Excess-Werte aus ¹³C-markierter Glucose relativ ähnliche Höhen. Beim Erreichen der stationären Wachstumsphase steigt die ¹³C-Inkorporationsrate aus ¹³C-markiertem Serin wieder leicht an und liegt bei proteinogenem Serin durchschnittlich bei 7 mol%, gefolgt von Ala (~6%), Glu (2,7%), Asp (1,4%) und Gly (1,2%) (Abbildung 3.23 (B) und Tabelle A.19).

Einen ähnlichen Verlauf der Kohlenstoffflüsse aus Serin und Glucose in das Protein findet sich auch in der *keto*-Deletionsmutante von *L. pneumophila*. Zu Beginn der Bakterienkultur (OD₆₀₀ = 1; 1. Zeitpunkt) ist die ¹³C-Einbaurrate aus $[U-^{13}C_6]$ Glucose relativ gering (Ala:~1,5%, Glu:~0,5%, Abbildung 3.24 (A)).

Im zweiten Wachstumszeitraum (OD₆₀₀ = 1 – 1,5) ist die ¹³C-Inkorporationsrate um den

Faktor 1,5 (wie WT) verstärkt. Nun findet ein Eintrag von ^{13}C in Ala zu 2,3 mol%, in Glu zu 1 mol% und in Asp mit 0,4 mol% statt (Abbildung 3.24 (A) und Tabelle A.18). Im weiteren Wachstumsverlauf (3. Zeitpunkt) nimmt der ^{13}C -Überschuss weiterhin leicht zu (Ala (3,8%), Glu (2,2%), Asp (1,1%)) und steigt sogar noch, im Gegensatz zum Wildtyp leicht beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase an. Im vierten Zeitraum ist der ^{13}C -Excess in Ala bei 4,8 mol%, gefolgt von 2,8 mol% in Glu und 1,2 mol% in Asp. Auffallend ist zudem die gleichbleibende niedrige *de novo*-Synthese von Ser und Gly aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ über die Zeit hin.

Die ^{13}C -Einbauraten aus 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ sind in der *keto*-Deletionsmutante im Vergleich zum Wildtypstamm zu Beginn des Wachstums ($\text{OD}_{600} = 1$) leicht reduziert. In das proteinogene Serin findet ein durchschnittlicher ^{13}C Eintrag von 47 mol%, gefolgt von Ala mit 15 mol%, Glu mit 6 mol% und Asp/Gly mit 3 mol% statt (Abbildung 3.24 (B) und Tabelle A.18). Mit zunehmendem Wachstum (zweiter Zeitraum: $\text{OD}_{600} = 1 - 1,5$) nimmt die *de novo*-Synthese von bakteriellem Protein aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ um den Faktor 1,2 bis 1,6 ab. Zu diesem Zeitpunkt sind die proteinogenen AS in der Reihenfolge: Ser (28,9%) > Ala (13%) > Glu (4,5%) > Asp (2%) > Gly (1%) ^{13}C -markiert (Abbildung 3.24 (B)). Weiterhin reduziert sich dies in der dritten (spät exponentiellen) Wachstumsphase (Ser (12,8%), Ala (9%), Glu (3,8%), Asp (2,3%) und Gly (0,7%)) und nimmt weiter beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase (vierter Wachstumsabschnitt) für Serin (7,2%) ab. In das proteinogene Ala (8,8%), Glu (3,9%), Asp (2,1%) und Gly (0,8%) ist die ^{13}C -Einbaurate gleichbleibend (nicht wie beim WT abnehmend). Besonders auffallend bei der *keto*-Deletionsmutante ist, dass die ^{13}C -Excess-Werte der Proteine in den Experimenten mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ nicht dieselbe Höhe erreichen wie diejenigen in den Versuchen mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ (Abbildung 3.24).

Isotopolog-Profile:

Glucose als Kohlenstoffquelle: Die Isotopologzusammensetzung der proteinogenen AS Ala, Asp, Glu, Gly und Ser in den Experimenten mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ von *L. pneumophila* WT sind vergleichsweise ähnlich zu denen aus Eylert *et al.* (2010) (vergleiche Abbildung 3.25 und 3.26 mit Kapitel I.6.2. und Abbildung 1.21 und 1.22; Zahlenwerte siehe Anhang Tabelle A.20). Ihre Biosynthesewege sind dementsprechend wie im vorausgehenden Kapitel beschrieben. Die Isotopomer-Verhältnisse und damit die Anteile der jeweiligen Biosynthesewege mit Glucose als Vorstufe ändern sich in den verschiedenen

Wachstumsphasen nicht. Die Schwankungen im Bereich der Einfachmarkierung in Asp und Glu liegen an der geringen Markierungshöhe und weisen vergleichsweise hohe Standardabweichungen in den GC/MS-Messungen auf (*data not shown*).

Serin als Kohlenstoffquelle: Die Isotopologkompositionen von proteinogenem Ala, Asp, Glu, Gly und Ser entsprechen über die Zeit denjenigen aus Eylert *et al.* (2010). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Biosynthesewege beginnend mit Serin hin zu Pyruvat und weiter über Acetyl-CoA im TCA-Zyklus zu ähnlichen Raten eingegangen werden. Auffallend anders ist jedoch die erhöhte M+1-Markierung in Ala, Asp und Glu (mit vergleichsweise niedrigen Standardabweichungen in der Messung) in der spät-exponentiellen Wachstumsphase (dritter Wachstumsphasenabschnitt bei $OD_{600} = 1,5 - 1,9$). Dies könnte an einer erhöhte Anaplerose durch eine verstärkte PEPC-Aktivität liegen. Aus [$^{13}C_3$]Serin entsteht [$^{13}C_3$]Pyruvat welches zu [$^{13}C_2$]Acetyl-CoA decarboxyliert wird und in den TCA-Zyklus eingeschleust wird. Dadurch tritt eine [$^{13}C_2$]-Markierung in OAA auf. Wird nun [$^{13}C_2$]-OAA durch PEPC decarboxyliert entsteht im wiederauffüllenden Schritt [$^{13}C_2$]-Pyruvat, welches in [$^{13}C_1$]Acetyl-CoA resultiert und wieder den TCA-Zyklus speist. Zudem wird vermehrt $^{13}CO_2$ frei, das anhand der Glycinsynthase in [$^{13}C_1$]-Gly fixiert werden könnte.

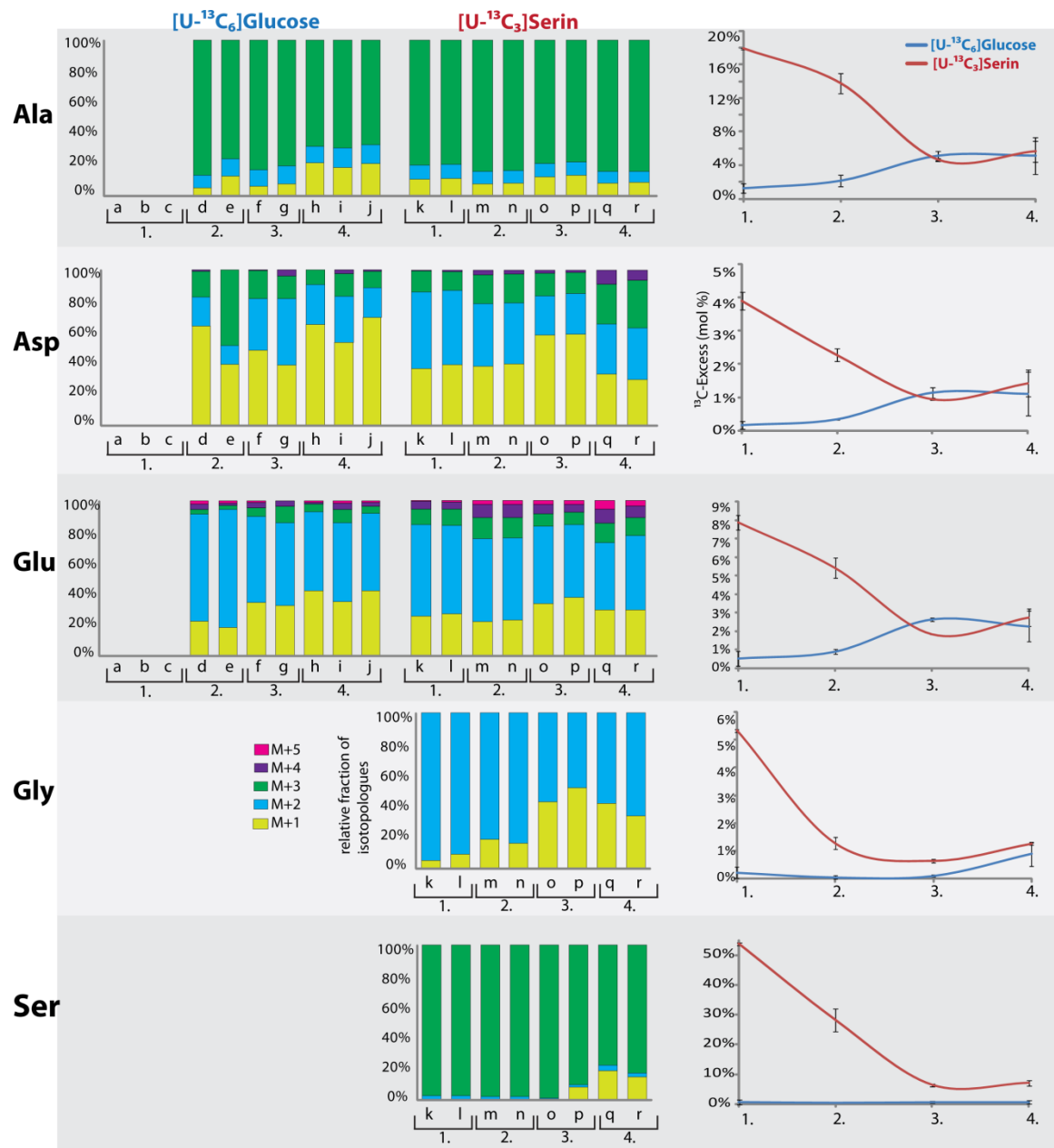


Abbildung 3.25: Isotopologzusammensetzung und ^{13}C -Excess-Werte von proteinogenem Ala, Asp, Glu, Gly und Ser aus *L. pneumophila* WT kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose und 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ Serin.

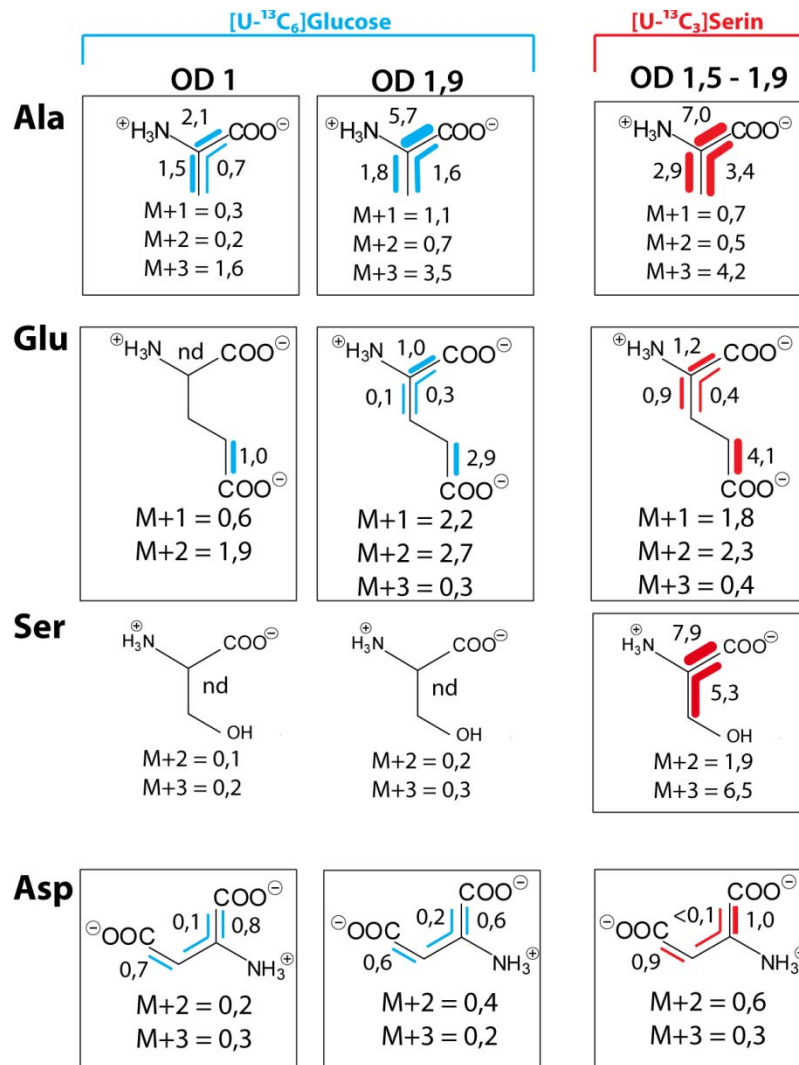


Abbildung 3.26: ¹³C-NMR Signale der proteinogenen AS Ala, Glu, Ser und Asp in den verschiedenen Wachstumsphasen von *L. pneumophila* WT kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [U-¹³C₆]Glucose oder 3 mM [U-¹³C₃]Serin. Umrandete AS konnten im ¹³C-NMR-Spektrum detektiert werden. Bunte Balken repräsentieren ¹³C¹³C-Kopplungen zwischen benachbarten C-Atomen, die Ziffern geben Auskunft über den Anteil der ¹³C-Kopplung in mol% (Werte siehe Tabelle A.20 im Anhang).. M+X-Werte wurden mit GC/MS ermittelt.

Für die *keto*-Deletionsmutante gilt zur Verstoffwechlung von Glucose dasselbe wie im Wildtypstamm, es ist daher naheliegend, dass die Verwertung der Glucose als biosynthetische Vorstufe für die proteinogenen AS über denselben biosynthetischen Weg abläuft (Abbildung 3.27).

Etwas anders sieht es aus für die Verwertung von exogenem Serin. In den ¹³C-Excess-Werten lässt sich schon erkennen, dass die Δ *keto*-Mutante Serin gegenüber Glucose bevorzugt und dies auch über die einzelnen Wachstumsphasen hinweg. Wird im Wildtypstamm spätestens in der stationären Phase Pyruvat aus beiden Vorstufen zu gleichen Anteilen bereitgestellt (Kohlenhydrate und Aminosäuren), das trifft für

keto-Deletionsmutante nicht zu.

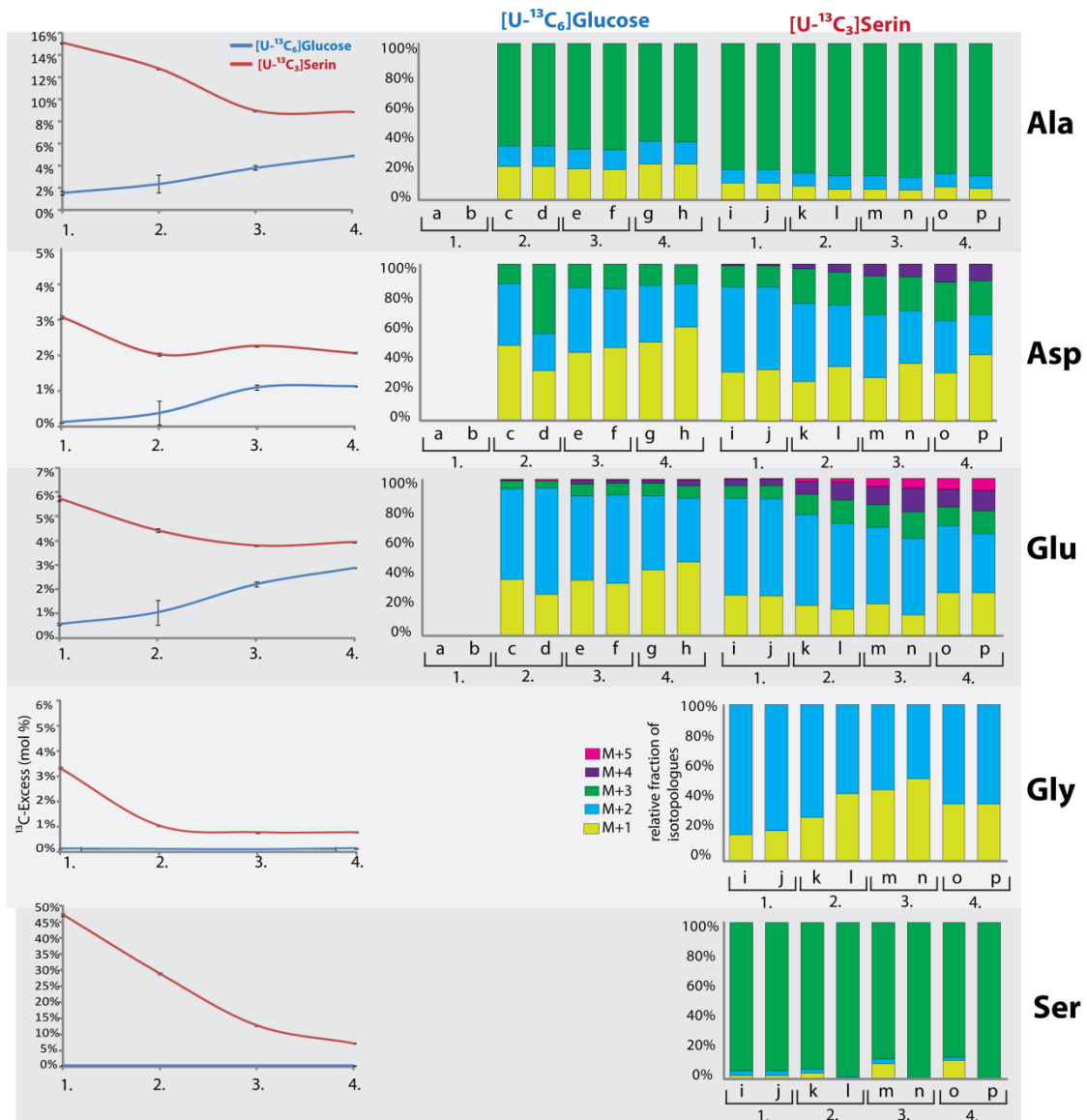


Abbildung 3.27: Isotopologzusammensetzung und ^{13}C -Excess-Werte von proteinogenem Ala, Asp, Glu, Gly und Ser aus *L. pneumophila* Δ *keto* kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ und 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$.

Dementsprechend ist leicht erklärbar, dass die Isotopomer-Zusammensetzung in Asp und Glu hin zu einer M+4-Markierung verschoben ist und somit in beiden AS eine verstärkte TCA-Recycling Signatur erscheint ($[\text{C}_4]$ Asp und $[\text{C}_4]$ Glu entstehen, wenn auf $[\text{C}_2]$ -OAA aus der ersten TCA-Runde nochmals $[\text{C}_2]$ Acetyl-CoA übertragen wird). Somit muss der niedrigere Pyruvat- und Acetyl-CoA-Spiegel, der aus Glucose entsteht durch einen vermehrten Pyruvat- und Acetyl-CoA Anteil aus exogenem Serin geliefert werden.

2.1.2.2. Wachstumsphasenabhängige Produktion von PHB

De novo Syntheseraten aus Kohlenhydraten und glucogenen Aminosäuren:

***Legionella pneumophila* Wildtypstamm:** Während des frühen exponentiellen Wachstums ($OD_{600} = 1$; Zeitpunkt 1) kann kein PHB (auch nicht unmarkiert) weder mittels GC/MS noch anhand NMR-Spektroskopie unter den beiden Versuchsbedingungen (Glucose oder Serin als Vorstufe) im Wildtypstamm detektiert werden. Mit fortlaufendem Wachstum ($OD_{600} = 1 - 1,5$; Zeitpunkt 2) wird aus $[U-^{13}C_3]$ Serin durchschnittlich 11,8 mol% PHB synthetisiert. Dieser molare Anteil sinkt dramatisch im nächsten Wachstumsabschnitt auf 1,9% und steigt wieder bei Erreichen der stationären Wachstumsphase auf 7,2 mol% an (Abbildung 3.28 (A)). Auf andere Weise verhält sich dagegen die *de novo*-Syntheserate mit $[U-^{13}C_6]$ Glucose als Vorstufe. Diese steigt stetig langsam von Wachstumszeitraum 2 ($OD_{600} = 1 - 1,5$) mit 2,6 mol% bis zur spät-exponentiellen Wachstumsphase ($OD_{600} = 1,5 - 1,9$; Zeitpunkt 3) mit 6,2 mol% an und sinkt leicht wieder beim Eintritt in die stationäre Phase auf durchschnittlich 4,5 mol% ab (Abbildung 3.28 (A)).

***Legionella pneumophila* Δ keto:** Anders als im Wildtypstamm kann schon in der früh-exponentiellen Wachstumsphase (Zeitpunkt 1: $OD_{600} = 1$) PHB detektiert werden. In den Experimenten mit $[U-^{13}C_3]$ Serin ist ein durchschnittlicher ^{13}C -Excess-Wert von 1,8 mol% zum Beginn des exponentiellen Wachstums ermittelbar. Mit weiterführendem Wachstum nimmt dieser Wert beständig ab und liegt zum Zeitpunkt 2 bei 1,2 mol%, zum dritten Zeitpunkt werden nur noch 0,6 mol% erreicht. Diese vergleichsweise niedrige *de novo*-Syntheserate aus $[U-^{13}C_3]$ Serin wird auch beim Eintritt in das stationäre Wachstum beibehalten (0,6 mol%) (Abbildung 3.28 (B)).

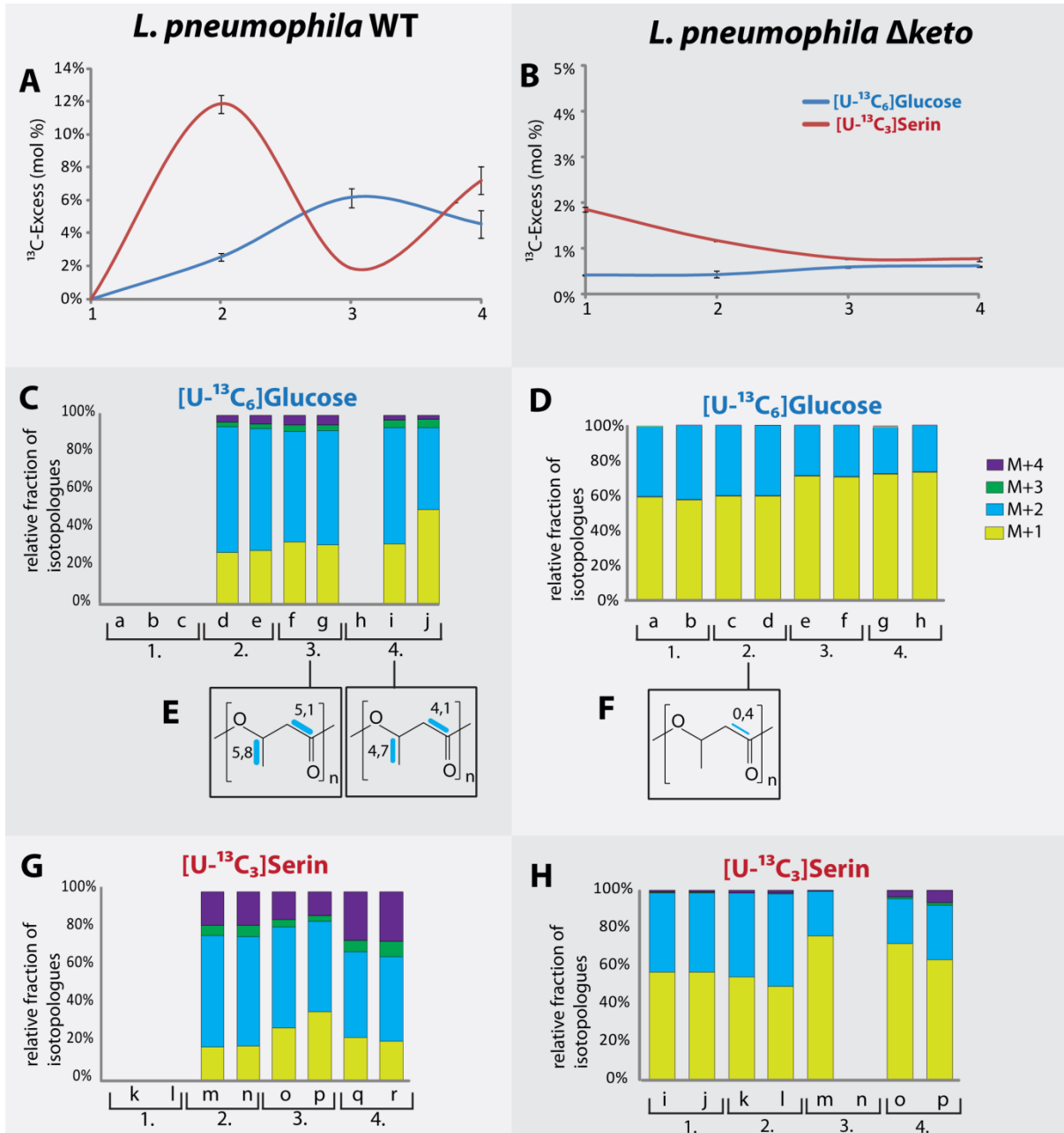


Abbildung 3.28: ^{13}C -Profile von PHB aus den verschiedenen Wachstumsphasen von *L. pneumophila* WT und Δ keto kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ oder 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$. (A, B): ^{13}C -Excess-Werte im Vergleich; (C, D): Isotopomer-Zusammensetzung aus den Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$; (E, F): ^{13}C -NMR-Signale aus den Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$; (G, H): Isotopomer-Zusammensetzung aus den Experimenten mit 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$.

Auch in den Experimenten mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ ist bereits zu Beginn des Wachstums PHB mit 0,4 mol% ^{13}C -Markierung detektierbar. Diese relativ geringe ^{13}C -Einbaurrate verändert sich nicht wesentlich mit zunehmendem Wachstum (Zeitpunkt 2: 0,4%; Zeitpunkt 3 und 4: 0,6%) (Abbildung 3.28 (B)).

Isotopologprofile:

***Legionella pneumophila* Wildtypstamm mit [U-¹³C₆]Glucose:** Die Isotopolog-Zusammensetzung sowie die Position der Markierung ändert sich über die Zeit in den einzelnen Wachstumsphasen nicht (Abbildung 3.28 (C, E)). Die Biosynthese verläuft ausgehend von [U-¹³C₆]Glucose über die Kondensation von [¹³C₂]Acetyl-CoA mit unmarkiertem Acetyl-CoA durch eine β-Ketothiolase (vergleichend dazu Abbildung 1.22 aus Eylert *et al.* (2010)). Die M+1-Markierung im PHB könnte durch die anaplerotische PCK/PYK-Reaktion verursacht sein, indem [¹³C₂]-OAA zu [¹³C₂]-PEP, welches weiter zu [¹³C₂]-Pyruvat und letztendlich zu [¹³C₁]-Acetyl-CoA decarboxyliert wird. Eine 3-fach Markierung tritt dementsprechend auf, wenn anaplerotisch generiertes [¹³C₁]Acetyl-CoA mit [¹³C₂]Acetyl-CoA kondensiert wird.

***Legionella pneumophila* Wildtypstamm mit [U-¹³C₃]Serin:** Ähnlich wie die *de novo*-Synthese aus Glucose geschieht die Produktion von PHB aus der glucogenen AS [U-¹³C₃]Serin über das Intermediat [¹³C₂]Acetyl-CoA. Dies resultiert in einem sehr hohen Anteil von M+2-Isotopomeren. Da die ¹³C-Einbauraten verglichen mit jenen aus [U-¹³C₆]Glucose relativ hoch ist, ist der vergleichsweise hohe Anteil an M+4-Markierung erklärbar, indem zwei [¹³C₂]Acetyl-CoA - mit [U-¹³C₃]Serin als Vorstufe – kondensiert werden zu dem Monomer β-Hydroxybutyryl-CoA (Abbildung 3.28 (G)). Aus den einzelnen Wachstumsphasen sticht der Zeitraum der spät-exponentiellen Wachstumsphase heraus. Dort findet nur ein vergleichsweise geringer Eintrag von ¹³C in das PHB statt. Dies spiegelt sich auch in den Isotopologmustern mit erniedrigten molaren Werten in der M+2- und M+4-Markierung wieder.

***Legionella pneumophila* Δketo mit [U-¹³C₆]Glucose:** Die Isotopologmuster der *keto*-Deletionsmutante reflektieren den sehr geringen ¹³C-Eintrag aus dem Acetyl-CoA-Pool der aus [U-¹³C₆]Glucose entstanden ist. Die Einbauraten und die Isotopologmuster ändern sich nicht wesentlich über die Zeit in den einzelnen Wachstumsphasen. Es findet bereits ein Eintrag von ¹³C aus [U-¹³C₆]Glucose zur frühen exponentiellen Wachstumsphase statt und steigt leicht mit zunehmendem Wachstum an. Die vergleichsweise um den Faktor 10 niedrigere M+2-Markierung (Abbildung 3.28 (D, F im Vergleich zu C, E)) kommt vermutlich durch die Aktivität der zwei (putativen) homologen β-Ketothiolasen (*lpp1307* und *lpp1555*; Herrmann, 2012) in *Legionella* zustande, welche aber im Vergleich zur deletierten β-Ketothiolase (*lpp1788*) nur eine untergeordnete Rolle in der PHB-Synthese einnehmen.

Legionella pneumophila Δ keto mit [U- $^{13}\text{C}_3$]Serin: Die Isotopologprofile des PHBs mit der glucogenen AS [U- $^{13}\text{C}_3$]Serin als Vorstufe sind denen aus [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose signifikant ähnlich (Abbildung 3.28 (H)). Auffallend ist schon zu Beginn des bakteriellen Wachstums der stattfindende ^{13}C -Einbau aus Serin, der dann mit fortschreitendem Wachstum leicht abnimmt. Dabei tritt vor allem eine Einfachmarkierung und zu geringerem Anteil auch eine Zweifachmarkierung auf (aus [$^{13}\text{C}_1$]- und [$^{13}\text{C}_2$]Acetyl-CoA, wie oben beschrieben).

2.1.2.3. Diskussion

Legionella pneumophila ist ein Umweltbakterium und benötigt dadurch eine Anpassung sowohl an eine aquatische, freilebende, als auch an eine intrazelluläre Lebensweise (Molofsky and Swanson, 2004). Dieser „Lebenswandel“ erfordert eine morphologische Adaptation und eine Koordination der Expression der Virulenzgene (Heuner *et al.*, 1999, Molofsky and Swanson, 2004; Brüggemann *et al.*, 2006). Zudem ist das Angebot an Nährstoffen extra- und intrazellulär durchaus unterschiedlich, so dass auch eine Regulation des Metabolismus nötig ist.

Im Kulturmedium lassen sich beide Lebensphasen simulieren (Molofsky and Swanson, 2006). Dabei findet die Expression von replikativen Faktoren (avirulentes, intrazelluläres Stadium der Replikation, simuliert das Aufhalten von *Legionella* in der Replikationsvakuole) während der exponentiellen Wachstumsphase ($\text{OD}_{600} = 1 - 1,5$; also Zeitpunkt 1 und 2) statt. Beim Übergang zur stationären Wachstumsphase (Zeitpunkt 3; bei $\text{OD}_{600} = 1,5 - 1,9$) werden dann transmissive Eigenschaften (virulent, flagelliert, PHB-Produktion) ausgebildet.

Die Ergebnisse vorliegender Arbeit bestätigen und bekräftigen die These, dass beide reziproke Phänotypen unterschiedliche Kohlenstoffquellen (zur *de novo*-Synthese von zellulärem Protein) bevorzugen:

Zu Beginn der Bakterienkultur von *L. pneumophila* Wildtypstamm (Zeitpunkt 1) werden Aminosäuren zum Aufbau von Protein präferiert. Es findet dabei ein massiver ^{13}C -Eintrag aus der glucogenen AS [U- $^{13}\text{C}_3$]Serin in proteinogenes Ser, Ala, Glu, Asp und Gly statt. Gleichzeitig wird die [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose kaum genutzt, um *de novo* Protein zu produzieren. Zudem kommt es noch zu keiner detektierbaren Synthese von ^{13}C -markiertem PHB, das als Virulenzeigenschaft erst zu einem späteren Zeitpunkt vermehrt hergestellt wird (aber bereits gering vorhanden ist; siehe vorangehendes Kapitel Abbildung 3.15; Heuner *unpublished data*). Diese Beobachtungen stimmen sehr gut mit der These überein, dass das exponentielle Wachstum den avirulenten Phänotypen im Lebenszyklus repräsentiert. Dementsprechend

wäre *Legionella* in natürlicher Umgebung in dieser Phase mit dem Nährstoffangebot der Replikationsvakuole konfrontiert. Einhergehend mit vorausgehenden Studien, wonach *Legionella* vor allem Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzt (Pine *et al.*, 1979; George *et al.*, 1980; Tesh and Miller, 1981; Tesh *et al.*, 1983), geht aus vorliegender Arbeit hervor, dass *Legionella* vor allem während der replikativen Phase auf Aminosäuren angewiesen ist. Es ist daher naheliegend, dass das Nährstoffangebot in der Wirtszellvakuole vor allem aus Aminosäuren besteht. Tatsächlich konnten bisher schon mehr als 560 verschiedene Wirtszellproteine auf den LCVs nachgewiesen werden (Urwyler *et al.*, 2009).

Bereits ein Zeitpunkt später ($OD_{600} = 1 - 1,5$) ist die ^{13}C -Einbaurrate in proteinogenes Ser, Ala, Asp, Glu und Gly aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ leicht reduziert, findet aber dennoch sehr stark statt. Parallel dazu findet noch kein signifikanter Eintrag von Kohlenstoffatomen in die Proteinfraction statt. Simultan wird jedoch die Produktion von PHB gestartet und geschieht massiv aus dem angebotenen $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$.

Mit fortschreitendem Wachstum ($OD_{600} = 1,5 - 1,9$) zum Erreichen der spät-exponentiellen Wachstumsphase findet ein Wechsel an Präferenzen der Kohlenstoffquellen und somit ein Umschlagpunkt im Metabolismus von *Legionella* statt (Abbildung 3.29). Während Serin eine immer geringere Rolle zur *de novo* Synthese von Protein und PHB einnimmt, erstarkt der Anteil von ^{13}C -Überschuss aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ und übertrifft sogar jenen von $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ in dieser Phase. Dies ist besonders interessant, da man lange davon ausging, dass für *Legionella* vor allem Aminosäuren als Kohlenstoffquelle benötigt werden. In der Tat hat eine Zugabe von Glucose keine wachstumsfördernden Eigenschaften für *Legionella*. Spannenderweise zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass die Verstoffwechslung von Glucose zum Übertritt in die virulente Phase verstärkt stattfindet und tatsächlich einen signifikanten Beitrag zur Protein und PHB-Synthese leistet. Auch in neueren Studien konnte gezeigt werden, dass die Verstoffwechslung von Glucose über den ED-Weg essentiell für eine erfolgreiche intrazelluläre Replikation ist (Eylert *et al.*, 2010; Harada *et al.*, 2010). Dementsprechend liegt es nahe, dass mit beginnender Raum- und Nährstofflimitation in der Replikationsvakuole es nicht nur von Vorteil, sondern auch obligat sein kann, Glucose als Kohlenstoff- und Energiequelle und zur Synthese von PHB zu nutzen (Abbildung 3.29). Gerade die Flagellenbiosynthese und die Fortbewegung über die Flagelle bedarf einer sehr hohen ATP-Rate, die über den Abbau von Glucose zu Pyruvat und weiter im TCA-Zyklus gedeckt werden könnte.

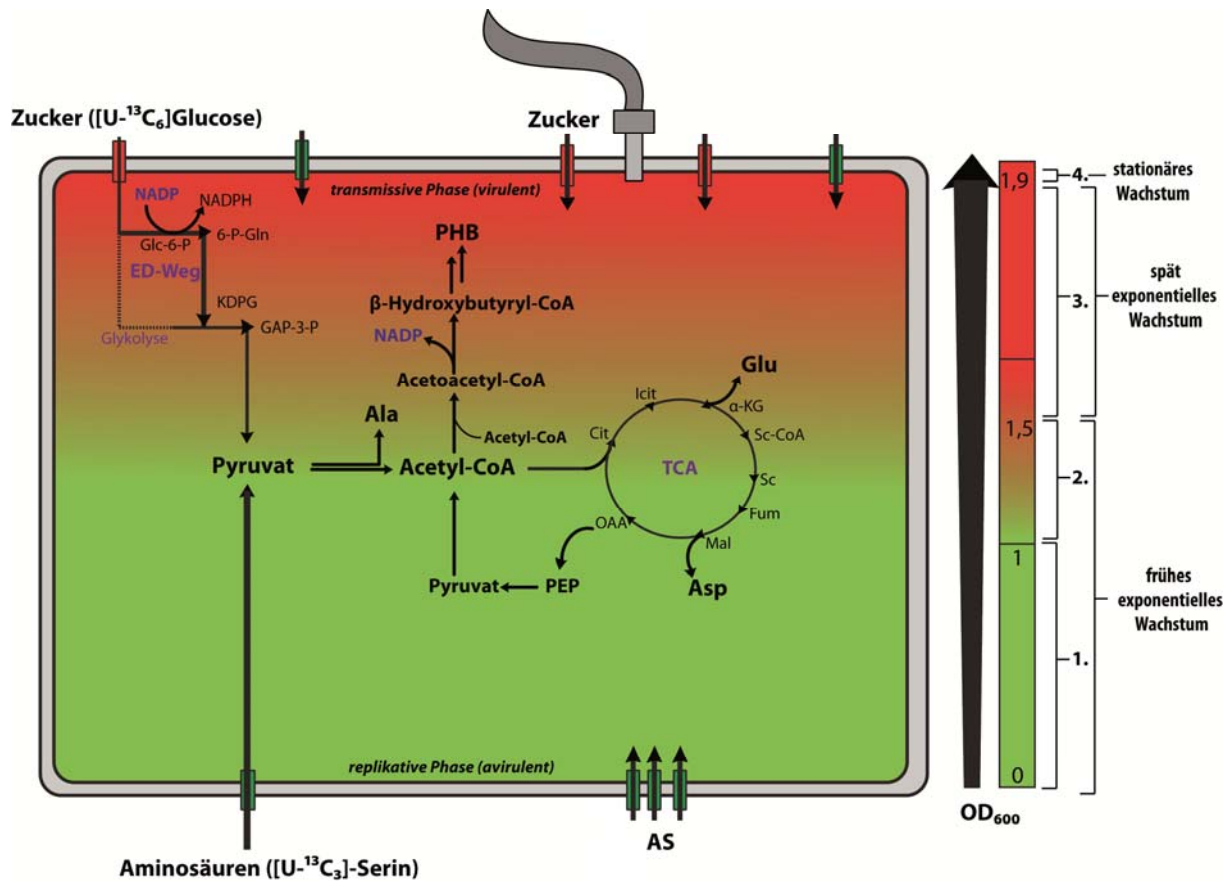


Abbildung 3.29: Wachstumsphasenabhängige Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen in *L. pneumophila*.

Besonders interessant ist die gleichmäßige Nutzung beider angebotener Kohlenstoffquellen (Glucose und Serin, dementsprechend Kohlenhydrate und Aminosäuren im Allgemeinen) beim Eintritt in die stationäre Wachstumsphase, also im virulenten Zustand. Die virulente Phase ist zwar nicht so energieaufwendig für *Legionella*, wie die replikative Phase, da nicht sehr viel Zellmaterial neu biosynthetisch hergestellt werden muss und Translations- und Transkriptionsmaschinerien wieder stillgelegt werden (Brüggemann *et al.*, 2006), dennoch muss der Energiehaushalt vor allem für die Fortbewegung über die Flagelle in der abiotischen Natur gewährleistet werden. Dies geschieht vermutlich, wie die Ergebnisse dieser Arbeit andeuten, über alle Kohlenstoffquellen die zur Verfügung stehen gleichermaßen. *Legionella* kann sich das Angebot an C-Quellen in der abiotischen Natur nicht selektiv aussuchen und ist somit an die vorhandenen Substrate gebunden. So konnte schon in einem vorausgehenden Kapitel in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *Legionella* über eine eukaryotenähnliche Glucoamylase GamA sogar Stärke spalten und nutzen kann (Kapitel III.2.1.1.4.).

Die Rolle des endogenen Speicherstoffs PHB im biphasischen Lebenszyklus:

Da *Legionella* im virulenten Zustand in der aquatischen Umwelt relativ wenige Substrate zur Verfügung hat, um den Energiehaushalt aufrecht zu erhalten, ist es von erheblichem Selektionsvorteil, einen endogenen Speicherstoff zu einem Zeitpunkt, an dem noch Nährstoffe ausreichend vorhanden sind, zu akkumulieren (James *et al.*, 1991).

Zugleich hat offenbar *Legionella* aber noch einen anderen Fitnessvorteil in der Produktion von PHB vereint, nämlich in der Rückgewinnung der Reduktionsäquivalente NADP (Mauchline *et al.*, 1992; Kabir and Shimizu, 2003). Erst mit vermehrter PHB-Produktion aus Serin (in Wachstumsphase 2, $OD_{600} = 1 - 1,5$) wird auch mehr $[U-^{13}C_6]$ Glucose umgesetzt und zur *de novo* Synthese von bakteriellem Protein und PHB genutzt (Abbildung 3.29). Denkbar wäre daher, dass eine vermehrte Rückgewinnung von NADP während der Reaktion von Acetoacetyl-CoA zu Hydroxybutyryl-CoA die Glucoseverstoffwechslung über den ED-Weg (Glc-6-P zu 6-P-Gln) aktiviert und so eine positive Feedbackregulation stattfindet. Dies geht einher mit den Ergebnissen der *keto*-Deletionsmutante. Durch die Deletion der aktiven β -Ketothiolase kann anfallendes Acetyl-CoA nicht mehr so stark zur PHB-Synthese genutzt werden. Damit wird weniger NADP zurückgewonnen und die positive Feedbackkontrolle fällt somit sehr viel geringer aus als im Wildtypstamm. Folglich kann die *keto*-Deletionsmutante Glucose nicht mit der selben Effizienz nutzen, wie der Wildtypstamm und muss dieses Defizit auf eine andere Weise kompensieren. Diese Kompensationsreaktion äußert sich paradoxer Weise vor allem in einer verstärkten PHB-Produktion. Dabei wird vor allem Acetoacetyl-CoA oder Acetyl-CoA, das nicht aus Glucose oder glucogenen Aminosäuren entstanden ist, benutzt. Am wahrscheinlichsten werden dafür hauptsächlich ketogene Aminosäuren wie beispielsweise Leucin/Isoleucin oder Threonin als Substrate aufgenommen, deren Intermediate direkt in Acetyl-CoA resultieren. Wie bereits erwähnt stellt gerade Threonin eine sehr wichtige Energie- und Kohlenstoffquelle für *Legionella* dar (Pine *et al.*, 1979; Tesh *et al.*, 1983), so dass diese spannende Frage anhand zukünftiger Experimente mit $[U-^{13}C_4]$ -Threonin geklärt werden könnte. Zudem konnten aktuelle Studien aufzeigen, dass während des intrazellulären Wachstums (zumindest in Makrophagen) Gene für den Katabolismus von Glycerol hochreguliert werden (Faucher *et al.*, 2011), so dass Studien mit $[U-^{13}C_3]$ Glycerol weitere interessante Ergebnisse im Hinblick zeitaufgelöster Wachstumsstudien liefern könnten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein Zusammenhang zwischen Virulenzausprägung und der Wahl der Kohlenstoff- und Energiequellen in *Legionella*

aufgezeigt werden. Da das endogene Speicherpolyester PHB eine essentielle Rolle in der Ausübung des biphasischen Lebenszykluses hat, könnte an dieser Stelle ein besonders geeigneter Ansatzpunkt für „antilegionelle“ Wirkstoffe aufgedeckt sein. Denkbar wäre beispielsweise eine Blockade der PHB-Synthese-Enzyme, so dass ein Ungleichgewicht im Stoffflusssystem von *Legionella* verursacht würde (unter anderem ein sich anhäufender Acetyl-CoA- und NADPH-Pool) der es *Legionella* unmöglich macht effizient Glucose und andere Kohlenhydratquellen zu nutzen. Dadurch könnte *Legionella* „unfit“ für ein Überleben in aquatischer Natur – respektive Kühlwassertürme und Rohrleitungssystemen – gemacht werden.

2.2. Ergebnisse der *in vivo*-Studien von *L. pneumophila* replizierend in *A. castellanii*

Anhand der *in vitro*-Untersuchungen im vorausgehenden Kapitel konnten die differentiellen Stoffflüsse aus den verschiedenen Kohlenstoffquellen aufgezeigt und identifiziert werden. Dieses *in vitro*-Metabolismus-Modell von *L. pneumophila* ist allerdings artifiziell, da sich *Legionella* in freier Natur hauptsächlich intrazellulär im Wirt parasitär vermehrt (Byrne and Swanson, 1998). Daher soll in folgenden *in vivo*-Untersuchungen dieses Modell getestet werden. Um den *in vivo*-Metabolismus von *L. pneumophila* zu untersuchen eignen sich am Besten Infektionsstudien am natürlichen Wirt *A. castellanii*. Durch die enge Vergesellschaftung von *L. pneumophila* mit freilebenden Protozoen in natürlicher Umgebung ist ein ganzes Arsenal an Virulenzfaktoren entstanden, das es *Legionella* erlaubt mit der eukaryotischen Wirtszelle zu kommunizieren (Steinert *et al.*, 2007). Es konnte gezeigt werden, dass *Legionella* für die Replikation in Protozoen die selben Mechanismen benutzt wie in den Alveolarmakrophagen und der Lebenszyklus, bzw. Infektionszyklus in beiden Wirtszellen sehr ähnlich ist (Abu Kwaik, 1996; Gao *et al.*, 1997; Segal and Shuman, 1999; Molofsky and Swanson, 2004). Beobachtungen, die an Amöben-Infektionsmodellen gemacht werden, könnten somit auch Hinweise und Informationen zur Infektionsroute im Menschen geben. Deweiteren diene *Acanthamoeba* bereits erfolgreich als Modellorganismus für die eukaryotische Transkription und ist auf zellulärer Ebene dem humanen System sehr ähnlich (Chen *et al.*, 2004), weswegen *Acanthamoeba* als besonders attraktiver Wirt für vorliegende Infektionsstudien angesehen werden kann. Einhergehend mit den Ergebnissen aus den wachstumsabhängigen Studien ist naheliegend, dass vor allem Aminosäuren den Energiehaushalt und Kohlenstoffbedarf in der replikativen Phase speisen. So werden im Genom von *L. pneumophila* zahlreiche Peptidasen (Hoffman *et al.*, 2008), Carboxypeptidasen

(Berdal *et al.*, 1983) und Metalloproteasen (Rossier *et al.*, 2008) kodiert und deren Expression in der replikativen Phase hochreguliert (Brüggemann *et al.*, 2006).

Um diese These zu testen, wurden *A. castellanii*- Zellkulturen mit 10 mM [U-¹³C₆]Glucose markiert, so dass ein Einbau von ¹³C in die proteinogenen AS von *A. castellanii* eintritt. Anschließend findet die Infektion in unmarkiertem Infektionspuffer (für 22 h) statt, so dass ein ¹³C-Eintrag in *L. pneumophila* ausschließlich über das von *A. castellanii*-inkorporierte ¹³C geschieht und nicht über die zuvor angebotene [U-¹³C₆]Glucose.

2.2.1. ¹³C-Profil von *A. castellanii*

Zur Bestimmung der Amöbenproteine wurde aus den biologischen Replikaten jeweils die cytosolische Fraktion (Überstand, vergleiche Kapitel II.3.) herangezogen. Aus der im Medium vorhandenen [U-¹³C₆]Glucose werden in *A. castellanii* folgende proteinogene AS durchschnittlich in der Reihenfolge Ala (9-10%) > Glu (~7%) > Asp (~4-5%) > Phe, Pro (~4%) > Ser, Tyr (~3%) > Gly (~2%) > Thr (0,5%) ¹³C-markiert und damit aus Glucose *de novo* synthetisiert (Abbildung 3.30 und Tabelle A.24 im Anhang). Durch die anschließende Infektion mit *L. pneumophila* tritt vor allem in der *keto*-Deleionsmutante ein leicht drosselnder Effekt in Phe und Pro auf, dagegen ist in Δ *fleQ* in diesen beiden AS eine leicht erhöhte ¹³C-Inkorporation angedeutet. (Abbildung 3.30).

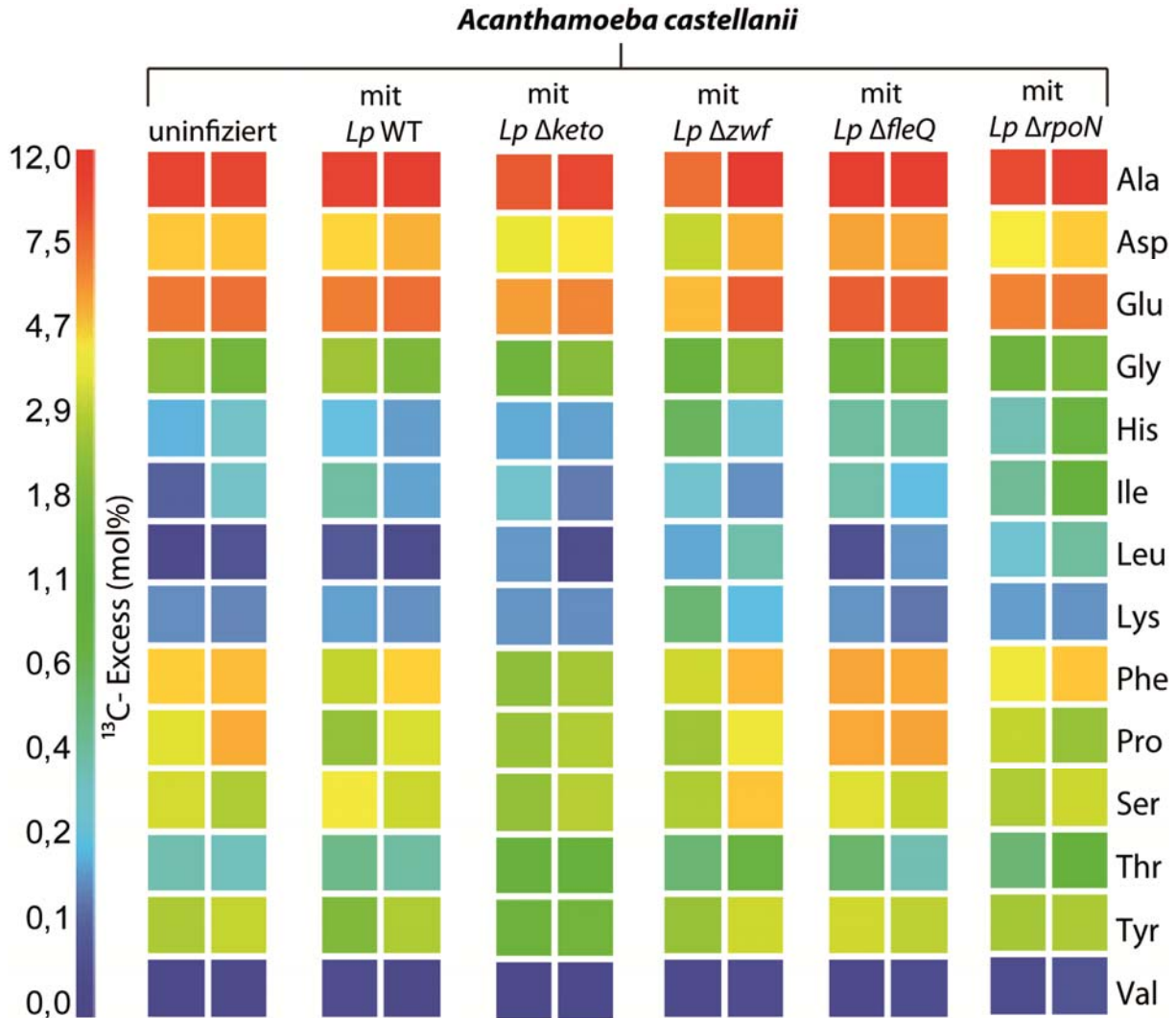


Abbildung 3.30: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von *A. castellanii* in Anwesenheit von 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose vor einer Infektion (prelabelling) mit *L. pneumophila* (*Lp*) WT, Δ *keto*, Δ *zwf*, Δ *fleQ* und Δ *rpoN*, oder ohne Infektion. Zur Bestimmung der Amöbenfraktion wurde der Überstand (die cytosolischen Proteine) gemessen. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2.7.

Isotopologmuster:

Alanin: Im proteinogenen Ala dominiert das M+3-Isotopomer (Abbildung 3.31), das durch den direkten Abbau der vollmarkierten Glucose (über Glycolyse oder PPP) über das Intermediat $[\text{C}_3]$ -Pyruvat entsteht. Die 2-fach Markierung kann mehrere Ursachen haben. Zum Einen tritt sie auf wenn nach dem Eintritt von $[\text{C}_2]$ Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus wieder aus $[\text{C}_2]$ Mal über *Malic Enzyme* (*ME*)-Aktivität (in *Acanthamoeba* aktiv (Im *et al.*, 1999) $[\text{C}_2]$ -Pyruvat entsteht, welches letztendlich wieder in $[\text{C}_2]$ -Ala

resultiert. Zum Anderen erscheint sie aus dem Anteil an Triosen, der über die Transketolase in PPP gebildet wird (Isotopologmuster: 011 in PEP, siehe Tabelle 1.1 in Kapitel I.2). Der Anteil an M+1-Markierung erscheint durch weiteren Umbau, der während der 22 h im unmarkierten Infektionspuffer geschieht. In dieser nährstoffarmen Umgebung wird die Gluconeogenese hochreguliert, so dass rückläufig aus $[^{13}\text{C}_2]$ -OAA, welches durch den Eintritt von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus entstanden ist, wieder $[^{13}\text{C}_1]$ -Acetyl-CoA hervorgeht und letztendlich wieder in $[^{13}\text{C}_1]$ -PEP beziehungsweise $[^{13}\text{C}_1]$ -Pyruvat umgewandelt wird. Letzteres kann dann zu $[^{13}\text{C}_1]$ -Ala transaminiert werden.

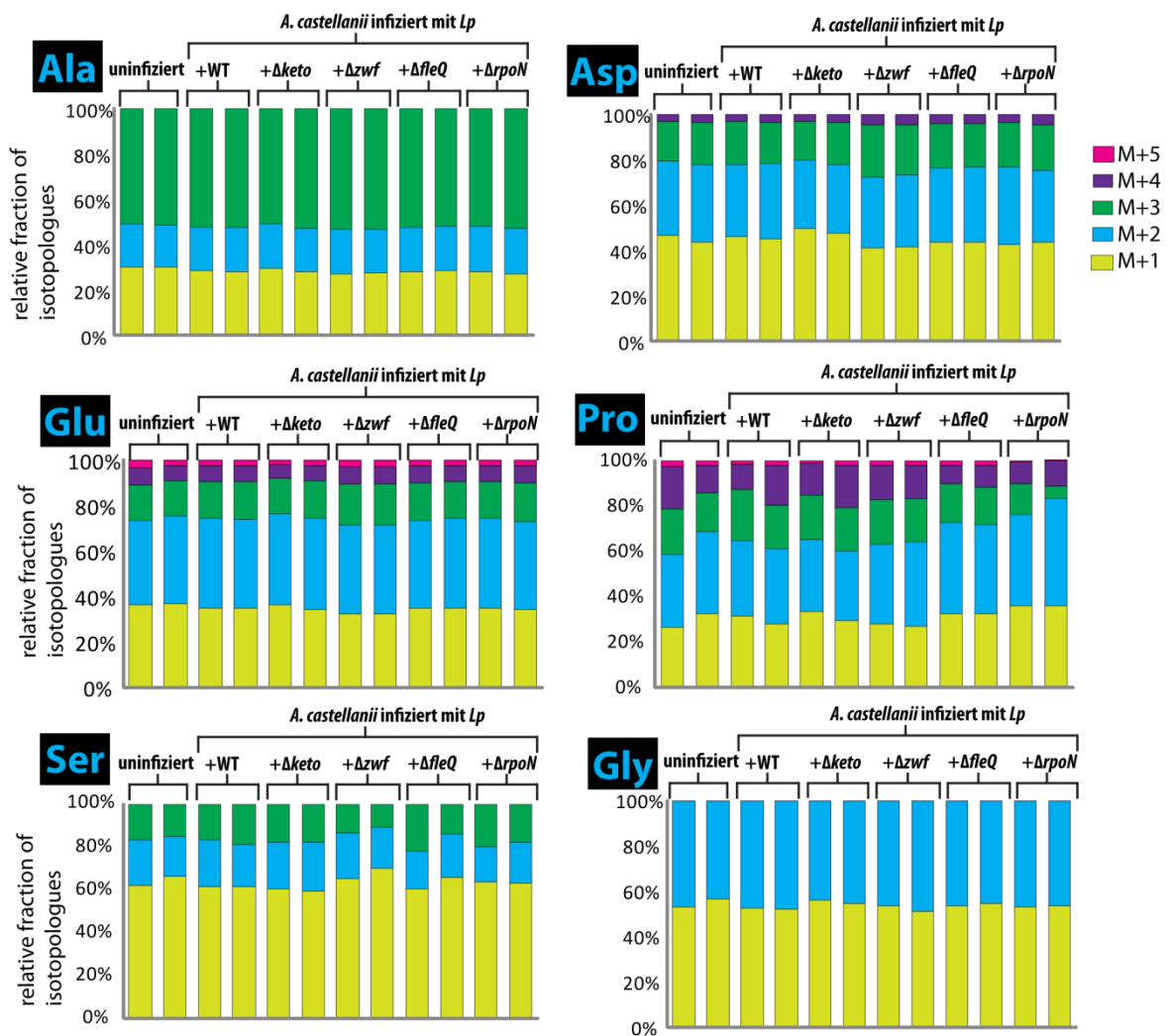


Abbildung 3.31: Isotopolog-Zusammensetzung proteinogener AS von *A. castellanii* mit und ohne Infektion durch *L. pneumophila* (*Lp*) WT, Δ keto, Δ zwf, Δ fleQ und Δ rpoN in Anwesenheit von 10 mM $[U-^{13}\text{C}_6]$ Glucose vor Infektion (prelabelling). Zur Bestimmung der Amöbenfraktion wurde der Überstand (die cytosolischen Proteine) gemessen. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt.

Aspartat: Das ^{13}C -Profil von Asp zeigt zum Einen einen relativ hohen Anteil von M+2-Markierung (Abbildung 3.31), der durch die Verstoffwechlung von Glucose hin zu $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA auftritt. Das vollmarkierte Acetyl-CoA wird in den TCA-Zyklus eingeschleust und resultiert in $^{13}\text{C}_2$ -OAA welches letztendlich zu $^{13}\text{C}_2$ -Asp transaminiert wird. Der molare Anteil an Einfach-Markierung entsteht zum Anderen während der weiteren Inkubation im unmarkierten (nährstoffarmen) Infektionspuffer durch die anaplerotische Reaktion des Malic Enzyms. Durch das ME tritt $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ -Pyruvat aus $^{13}\text{C}_2$ -OAA hervor und zeigt sich in einer Einfachmarkierung über $[1-^{13}\text{C}_1]$ -Acetyl-CoA, das in den TCA-Zyklus einschleust wurde. Der vergleichsweise geringe Anteil an $^{13}\text{C}_3$ -Asp wird verursacht durch die PEPC-Reaktion, bei der $^{13}\text{C}_3$ -Pyruvat zu $^{13}\text{C}_3$ -OAA carboxyliert wird.

Glutamat: Die Zusammensetzung der Isotopologe ist vergleichsweise ähnlich zum Asp. Dies ist naheliegend, da die Vorstufe von Glu (α -KG) wie diejenige von Asp (OAA) aus dem TCA-Zyklus stammt. Im Glu findet sich lediglich ein erhöhter Anteil an M+4-Markierung, das auf ein zweites Durchlaufen des TCA-Zyklus von $^{13}\text{C}_2$ -OAA, wobei ein $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA übertragen wird, hinweist.

Prolin: Die *de novo* Biosynthese von Prolin hat ebenfalls wie Glu als Vorstufe α -KG, dementsprechend spiegeln sich die Isotopologmuster von Glu in denen von Prolin wieder.

Serin: Anhand des ^{13}C -Profils von Ser lässt sich deutlich eine verstärkte Gluconeogenese ableiten. Aufgrund der Inkubation in nährstoffarmen Infektionspuffer ist dies nicht weiter verwunderlich. So dominiert nicht das M+3-Isotopomer, das direkt aus vollmarkierter Glucose verursacht würde, sondern vor allem eine M+1-Markierung (Abbildung 3.31), die aus $^{13}\text{C}_2$ -OAA rückläufig über $^{13}\text{C}_1$ -Acetyl-CoA und weiter zu $^{13}\text{C}_1$ -GAP entsteht (vergleiche dazu Kapitel I.3.).

Glycin: Da das Isotopologmuster von Gly demjenigen von Ser sehr ähnlich ist (Abbildung 3.31), ist anzunehmen, dass die *de novo* Biosynthese von Gly hauptsächlich aus Ser geschieht.

Aromatische AS Phe und Tyr: Der ^{13}C -Eintrag aus $[\text{U}-^{13}\text{C}_6]$ Glucose in die aromatischen AS findet über einen vollständig vorhandenen Shikimat-Weg (vergleiche Kapitel I.3. und Eylert, 2009) statt. Dabei tritt sowohl in Phe als auch in Tyr hauptsächlich eine M+3- bzw. eine M+4-Markierung auf (*Data not shown*) mit jeweils durchschnittlich 1,5 mol%. Die

Bildung beider AS erfolgt über das Intermediat Chorismat, das aus PEP und Erythrose-4-P (E-4-P) entsteht. Die 3-fach Markierung wird hervorgerufen, wenn [$^{13}\text{C}_3$]-PEP auf unmarkiertes E-4-P trifft. Dementsprechend wird die 4-fach Markierung verursacht, wenn unmarkiertes PEP auf [$^{13}\text{C}_4$]-E-4-P, das direkt aus [$^{13}\text{C}_6$]-Fru-6-P entstanden ist, übertragen wird. Eine Vollmarkierung beider AS ist kaum vorhanden, weswegen man davon ausgehen kann, dass beide Intermediate nicht zeitgleich aus [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]Glucose gebildet werden, bzw. der PEP-Pool und der E-4-P-Pool aus [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]Glucose nicht zum selben Zeitpunkt aufeinander treffen.

PHB: Der bakterielle Speicherstoff PHB wurde in der cytosolischen Fraktion von *A. castellanii* nicht detektiert und dient somit als Marker der erfolgreichen Trennung zwischen Legionellen- und Amöben-Protein.

2.2.2. ^{13}C -Profile von intrazellulär replizierenden *L. pneumophila* in *A. castellanii*

Vergleicht man die ^{13}C -Profile der proteinogenen AS von *L. pneumophila* mit jenen von *A. castellanii* so fällt auf, dass sich diese nicht nur im Bezug auf die insgesamt molare Anreicherung, sondern auch in ihrer Isotopomer-Komposition in fast allen AS bis auf Asp und Glu entsprechen (Abbildung 3.30 und 3.32 sowie Abbildung 3.31 und 3.33).

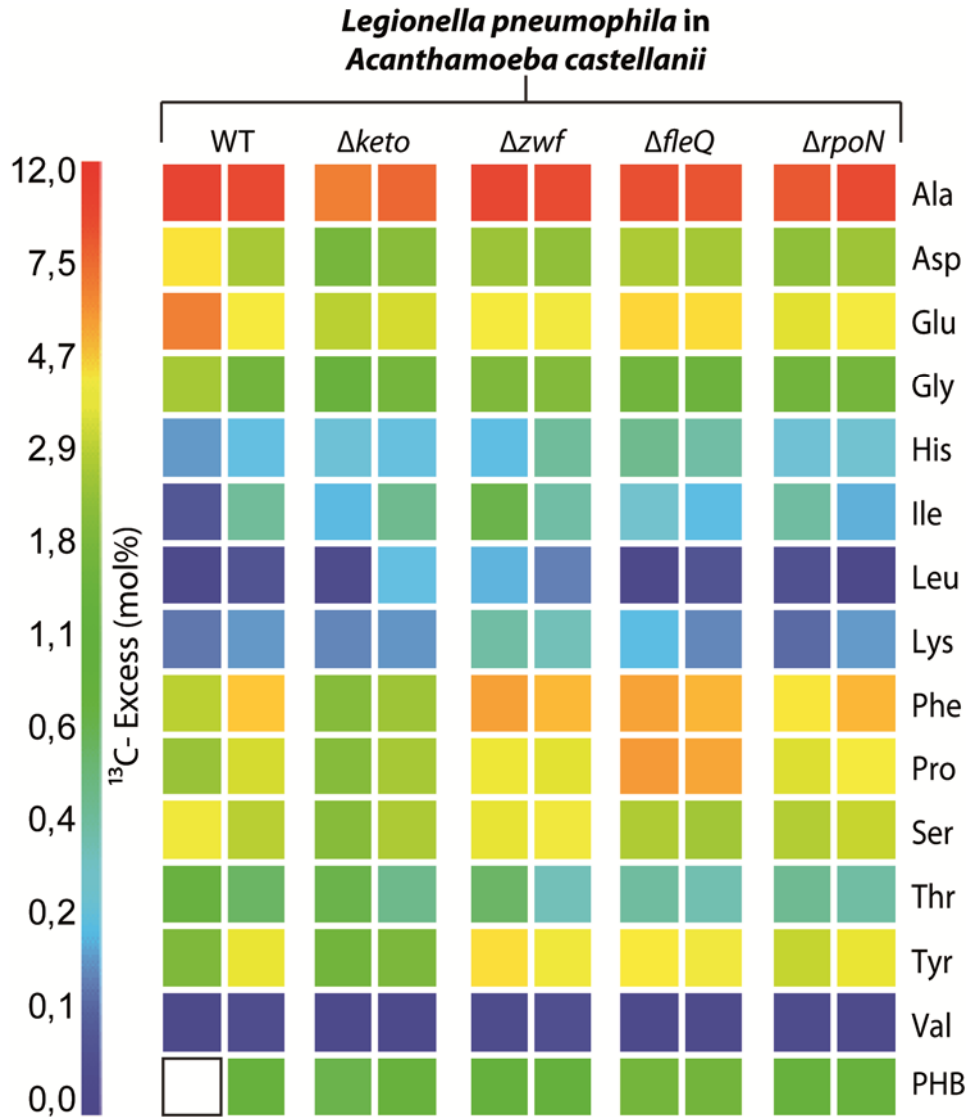


Abbildung 3. 32: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von *L. pneumophila* (*Lp*) WT, Δketo , Δzwf , ΔfleQ und ΔrpoN replizierend in *A. castellanii* in Anwesenheit von 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose vor der Infektion (prelabelling). Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt. Die Werte sind in semi-logarithmischer Form dargestellt, um auch kleine Unterschiede in den ^{13}C -Excess-Werten farblich hervorzuheben. Die Zahlenwerte sind im Anhang unter Punkt 2.7.

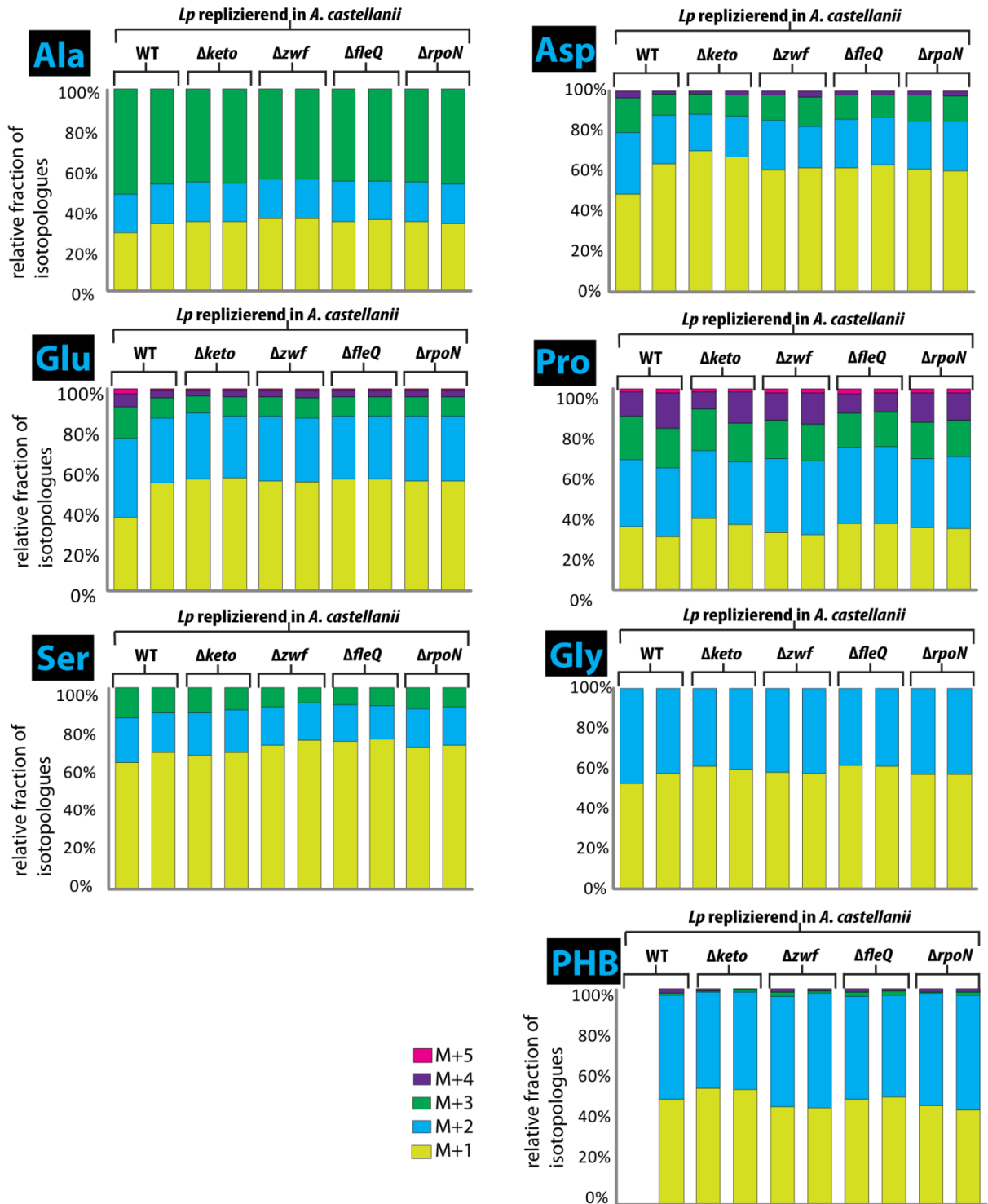


Abbildung 3.33: Isotopolog-Zusammensetzung proteinogener AS und PHB von *L. pneumophila* (*Lp*) WT, $\Delta keto$, Δzwf , $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ replizierend in *A. castellanii* in Anwesenheit von 10 mM [U- $^{13}C_6$]Glucose vor der Infektion (prelabelling). Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt.

In den beiden AS Asp und Glu ist in *Legionella* auffällig der Anteil an M+1-Isotopomeren im Vergleich zum Amöben-Protein erhöht. Beide AS weisen bemerkenswerterweise zudem einen

signifikant niedrigeren ^{13}C -Excess-Wert auf als das Asp und Glu in *A. castellanii* (Abbildung 3.34).

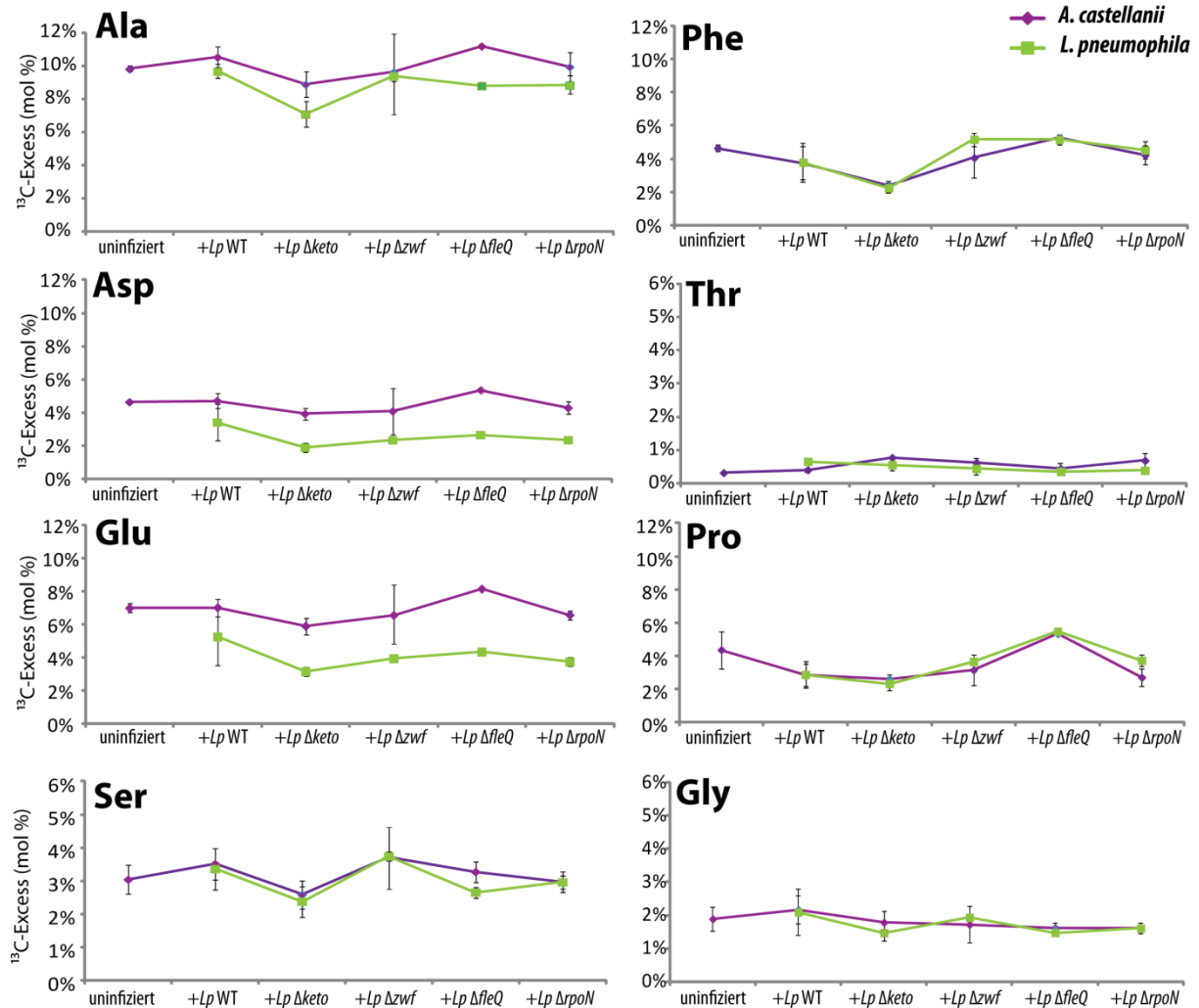


Abbildung 3.34: Vergleich der ^{13}C -Excess Werte (mol %) von *A. castellanii* und *L. pneumophila*. Dargestellt sind Mittelwerte zweier biologischer Replikate aus Legionellen und Amöben-Fraktion (cytosolische Proteine).

Für beide AS mit Intermediaten des TCA-Zyklus (Asp mit OAA und Glu mit α -KG) gilt offenbar, dass *Legionella* diese nicht einfach nur ins Protein assimiliert sondern von deren Biosynthesen (bzw. der Intermediate), besser gesagt von einem aktiven TCA-Zyklus abhängig ist, um erfolgreich intrazellulär zu replizieren. Die Einfach-Markierung kommt in beiden AS dadurch zustande, wenn aus nicht vollmarkierten Vorstufen (aus der Amöbe aufgenommen), wie beispielsweise zweifach-markiertes Ser zu einfach-markierten Vorstufen ($^{13}\text{C}_1$ -Pyruvat, bzw. $^{13}\text{C}_1$ -Acetyl-CoA) umgewandelt wird und dann letztendlich in den TCA-Zyklus eingeschleust wird.

Für das PHB konnten *in vivo* ^{13}C -Anreicherungen zwischen 0,8 bis 1,6 mol % gemessen werden, wobei überwiegend eine 1- und 2-fach Markierung (im Verhältnis 1:1) auftritt. Der *in vitro*-Trend, dass beide Flagellenmutanten mehr ^{13}C -markiertes PHB produzieren setzt sich *in vivo* auch fort (2-fach höhere Markierung als im Wildtypstamm). Zudem verhält sich die *keto*-Deletionsmutante hinsichtlich der Produktion von ^{13}C -markiertem PHB tendenziell reduziert im Vergleich zum Wildtypstamm, wie im *in vitro*-Modell beobachtet werden konnte (vergleiche vorausgehendes Kapitel III.2.1.2.2.).

2.2.3. Diskussion

Die Gattung *Legionella* gehört zu den fakultativ intrazellulären Pathogenen (Hacker and Heeseman, 2000). Das besondere am Infektionsmodell „*Legionella*“ ist die Etablierung von sogenannten „*Legionella-containing Vacuoles*“ (LCVs) (Horwitz, 1983b) bei gleichzeitiger Vermeidung der Phagozytose durch Verhinderung der Fusion mit dem antimikrobiellen Lysosom-Netzwerk (Fernandez-Moreira *et al.*, 2006). Dadurch ist *Legionella* befähigt in der nährstoffreichen Vakuole zu residieren und dort zu replizieren. *Legionella* wird aufgrund des ubiquitären Vorkommens v.a. freilebend in Süßwasserhabitaten oder in spezifischen Protisten als Umweltbakterium bezeichnet (Rowbotham, 1980; Fliermans *et al.*, 1981). Besonders gefährlich für den Menschen ist dabei das Auftreten von *L. pneumophila* in künstlichen Wasserreservoirs wie beispielsweise Warmwassersysteme, Klimaanlage, Whirlpools oder Raumbefeuchter (Atlas, 1999, Flannery *et al.*, 2006), da durch Inhalation von kontaminierten Aerosolen, vor allem bei den Risikogruppen Senioren und Immunsupprimierten eine atypische Lungenentzündung ausgelöst werden kann.

In der Natur ist *L. pneumophila* eng vergesellschaftet mit freilebenden Protozoen und repliziert – angepasst an die sehr nährstoffarme Umgebung im Süßwasser – in der Umwelt vorwiegend intrazellulär im Wirt (Gao *et al.*, 1997; Steinert *et al.*, 2007). Diese spezifische Adaptation hat vermutlich ein ganzes Set an Virulenzfaktoren generiert, das es *Legionella* erlaubt mit der eukaryotischen Wirtszelle nicht nur zu kommunizieren (Steinert *et al.*, 2007) sondern diese sogar vermutlich gezielt zu manipulieren.

Im vorausgehenden Kapitel konnte erfolgreich gezeigt werden, dass der Metabolismus von *Legionella* bestimmter Regulation - hervorgerufen durch die biphasische Lebensweise und der unterschiedlichen Virulenzausprägung – unterliegt. Dieses artifizielle *in vitro*-System spiegelt sehr gut die tatsächlichen Stoffflüsse im natürlichen System wieder, wie die Ergebnisse vorliegender *in vivo*-Infektionsversuche von *L. pneumophila* mit dem natürlichen Wirt

A. castellanii belegen. *A. castellanii* eignet sich besonders als vergleichender Modellorganismus für die Infektion von humanen Alveolarmakrophagen, da zum Einen *Acanthamoeba* dem humanen System auf zellulärer Ebene sehr ähnlich ist und zum Anderen dieselben Virulenzfaktoren zur erfolgreichen Infektion beider Zellsysteme (*Acanthamoebae*, humane Makrophagen) zum Einsatz kommt (Gao *et al.*, 1997). *A. castellanii* setzt mit einer relativ hohen Rate die im Medium angebotene [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose um und inkorporiert effizient die ^{13}C -Atome in das zelluläre Protein. Dabei findet auch ein Eintrag von ^{13}C in die aromatischen AS statt, wodurch ein aktiver Shikimat-Weg belegt ist (Abbildung 3.35; vergleiche auch Eylert, 2009). Im nährstoffarmen Infektionspuffer stellt die Amöbe ihren Stoffwechsel auf Gluconeogenese um. Dies ist besonders deutlich im Isotopologprofil von Serin, da vor allem [$^{13}\text{C}_1$]- und [$^{13}\text{C}_2$]-Isotopomere auftreten und nicht das [$^{13}\text{C}_3$]-Isotopomer, das direkt aus [$^{13}\text{C}_3$]-Pyruvat entstehen würde zu sehen ist.

Besonders interessant ist der Vergleich der ^{13}C -Profile von *L. pneumophila* aus den *in vitro*- und *in vivo*-Kulturen. Sowohl die ^{13}C -Muster aus den wachstumsunabhängigen Studien, als auch diejenigen in den wachstumsabhängigen Studien zeigen keinen relevanten Anteil an Gluconeogenese, somit ist diese Signatur eindeutig amöbenspezifisch. Zudem ist unter keinen *in vitro*- Bedingungen ein signifikanter Einbau von ^{13}C – weder aus Ser noch aus Glc – in die aromatischen AS Phe und Tyr vorhanden. Dies ist dementsprechend auch eindeutig typisch für *A. castellanii*. Wie bereits die wachstumsabhängigen Studien zeigen konnten, wird in der replikativen Phase vor allem auf AS als Kohlenstoff- und Energiequellen zurückgegriffen. Dies ist gut erklärbar, da im Genom von *L. pneumophila* zahlreiche Peptidasen (Hoffman *et al.*, 2008), Carboxypaptidasen (Berdal *et al.*, 1983) und Metalloproteasen (Rossier *et al.*, 2008) kodiert und deren Expression in der replikativen Phase hochreguliert werden (Brüggemann *et al.*, 2006). Dementsprechend findet in der *in vivo*-Kultur in *Legionella* ein 1:1 Eintrag von amöbengeneriertem Protein in des bakterielle Protein statt (Abbildung 3.35). Dabei werden die meisten AS unverstoffwechselt direkt in das bakterielle Protein assimiliert (^{13}C -Profile exakt gleich zwischen *A. castellanii* und *L. pneumophila*). Aktuelle Studien unterstützen diese These, da *Legionella* das Wirtszellproteasom rekrutiert (Price *et al.*, 2011) und durch den Einsatz von Proteasen Wirtszellprotein in AS spaltet. Besonders interessant ist der leicht erniedrigte ^{13}C -Überschuss, bei gleichzeitig erhöhtem M+1-Anteil in den legionellen AS Asp und Glu. Dies deutet daraufhin, dass diese beiden AS und damit auch ihre beiden Vorläufer OAA und α -KG einem Umbau unterliegen. So könnte der Verdünnungseffekt beispielsweise entstehen,

wenn aus dem Amöbenprotein unmarkierte ketogene AS (wie zum Beispiel Val, Thr, Tyr (nahezu unmarkiert in *A. castellanii* und damit nicht aus $[U-^{13}C_6]$ Glucose *de novo* synthetisiert, siehe Abbildung 3.35) zu Acetyl-CoA verstoffwechselt werden und so unmarkierte Intermediate (auf der Höhe von Acetyl-CoA) in den TCA-Zyklus eingeschleust werden würden. Dies würde zu keinem Verdünnungseffekt in Ala führen, was wiederum sehr gut mit den beobachteten Inkorporationsraten von Ala (von *Legionella*) übereinstimmt (Abbildung 3.35). Eine mögliche Ursache für diesen Eintrag und Umbau der ketogenen AS wäre, dass *L. pneumophila* zur erfolgreichen Replikation einen intakten und aktiven TCA-Zyklus benötigt (Abbildung 3.35). Womöglich sind es die energieverbrauchenden Transkriptions- und Translationsmaschinerien, die eine relativ hohe Rate an ATP benötigen, der durch den zentralen Knotenpunkt TCA bereitgestellt wird.

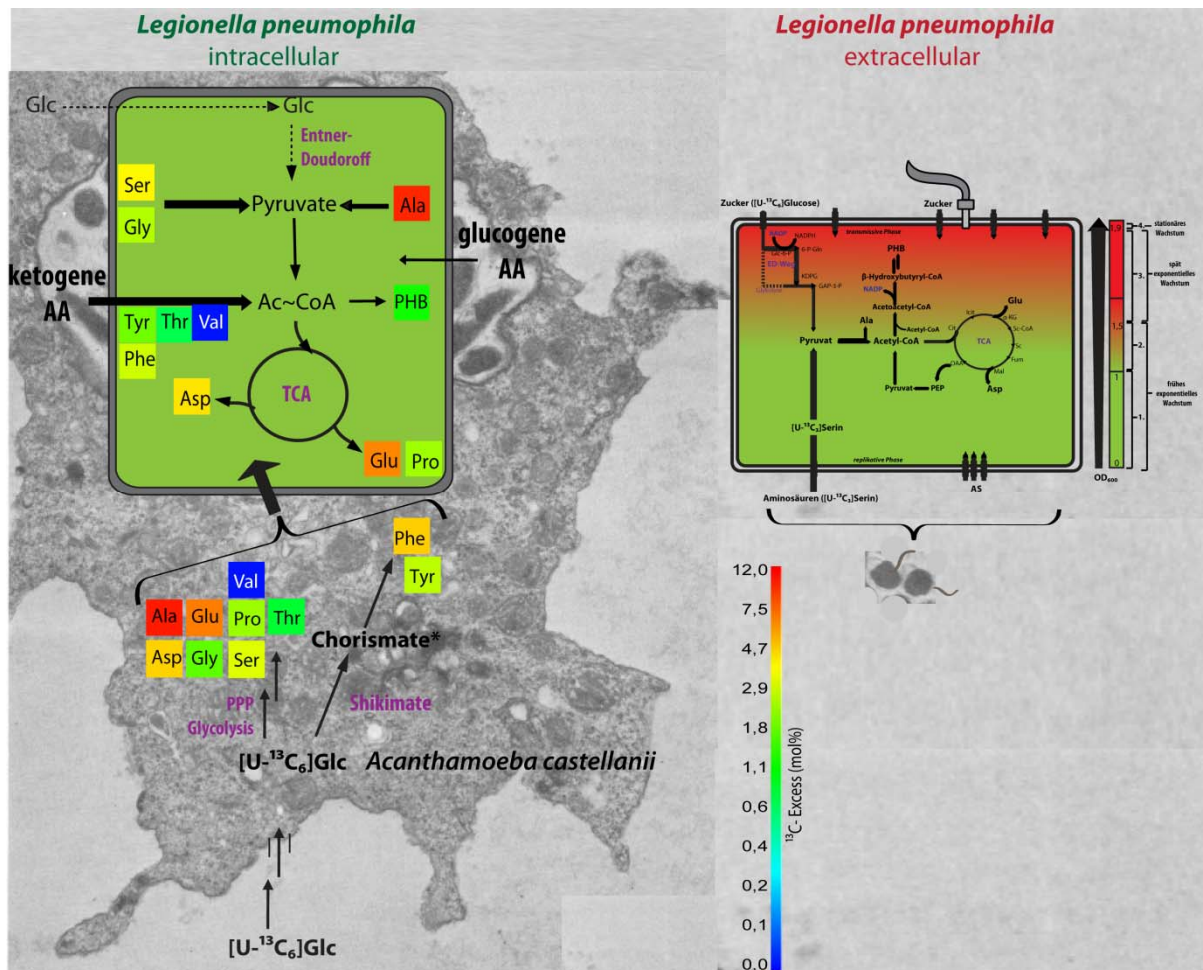


Abbildung 3.35: Rekonstruierte Stoffflüsse im Infektionsmodell *Acanthamoeba castellanii* mit *Legionella pneumophila* mit Vormarkierung von *A. castellanii* durch Anwesenheit von 10 mM $[U-^{13}C_6]$ Glucose im Medium. ^{13}C -Excess-Werte der gemessenen proteinogenen AS werden durch einen Farbcoderepräsentiert (aus Abbildung 3.30 und 3.32). Gegenübergestellt sind intrazelluläres und extrazelluläres Wachstum. Die intrazelluläre Phase wurde aus den *in vivo* Versuchen rekonstruiert, die extrazelluläre Phase wurde bereits im Kapitel zuvor diskutiert.

Der relativ geringe ^{13}C -Überschuss in dem Speicherpolymer PHB ist sehr gut übereinstimmend mit den wachstumsabhängigen Studien mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ als Substrat. Dort ist die PHB-Produktion aus angebotenen AS in der Phase kurz vor dem Eintreten in das stationäre Wachstum sehr gering. Da in dem *in vivo*-Infektionsmodell der Erntezeitpunkt so gewählt wurde, dass sich die Legionellen zum größten Teil noch in den LCVs befinden entspricht dies im *in vitro*-Wachstumsmodell die Phase 3. Diese Beobachtung ist zusätzlich konform zu den Ergebnissen von Brüggeman *et al.* (2006), die belegen, dass eine PHB-Produktion während beziehungsweise kurz nach der 3ten Phase hochreguliert wird. Somit ist anders als im *in vitro*-Modell, bei dem zwischen Phase 2 und 3 die PHB-Synthese aus AS angekurbelt ist, wohl im *in vivo*-Modell dies erst kurz vor dem Verlassen der LCVs möglicherweise durch Quorum Sensing reguliert der Fall. Zudem setzt sich der Trend, der in der *keto*-Deletionsmutante in den wachstumsabhängigen Studien beobachtet wurde fort mit einer gegenüber dem Wildtyp reduzierten Produktion von ^{13}C -markiertem PHB. Die beobachtete verstärkte ^{13}C -Inkorporationsrate in den *in vitro*-Versuchen mit ΔrpoN und ΔfleQ aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ findet sich (in abgeschwächter Form) im *in vivo*-Modell wieder. Da der Eintrag von C-Atomen aus Glucose erst in der späten Wachstumsphase geschieht (siehe Kapitel III. 2.1.2.2.) und im *in vivo* Modell der Erntezeitpunkt kurz davor gewählt ist, sind die zum *in vitro* ^{13}C -Excesswert reduzierten ^{13}C -Inkorporationsraten erklärbar. Die Rolle der Glucose in der PHB-Synthese im *in vivo*-Modell könnte mit weiterführenden Versuchen getestet werden. Dabei wäre ein späterer Erntezeitpunkt denkbar, in dem die Legionellen bereits die Vakuole verlassen haben und sich im Wirtszellcytosol befinden, da womöglicherweise erst zu diesem Zeitpunkt freie Glucose für *Legionella* leicht zugänglich sein könnte.

Zusammenfassend zeigen die *in vivo*-Infektionsmodelle einen guten Einblick in den Stoffwechsel von *Legionella* während der replikativen Phase. Wenn auch zahlreiche AS direkt assimiliert werden und 1:1 in das bakterielle Protein eingebaut werden, ist dennoch ein aktiver Metabolismus, vor allem ein intakter TCA-Zyklus für *Legionella* notwendig um erfolgreich intrazellulär zu replizieren.

Eine spannende Frage bleibt auf diesem Gebiet weiterhin, wie stark die Infektion von *Legionella* den Metabolismus des Wirtes beeinflusst. Dies könnte in weiterführenden Studien mit Zugabe von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ oder $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$ während Infektion geschehen. Zudem wäre es interessant Deletionsmutanten in CrsA im Infektionsmodell zu beobachten um zu testen welchen Einfluss dieser Regulator im natürlichen Wirts-Infektionsmodell auf den

Legionellen-Metabolismus ausübt. Des Weiteren können die Ergebnisse vorliegender Arbeit als Basis zu weiterführenden ^{13}C -Perturbationsstudien für ein Infektionssystem mit humanen Makrophagen dienen. Bisher konnte gezeigt werden, dass dieselben Virulenzeigenschaften, die es *Legionella* ermöglichen erfolgreich in *Acanthamoeba* zu replizieren, auch in humanen Zellen eingesetzt werden (Gao *et al.*, 1997).

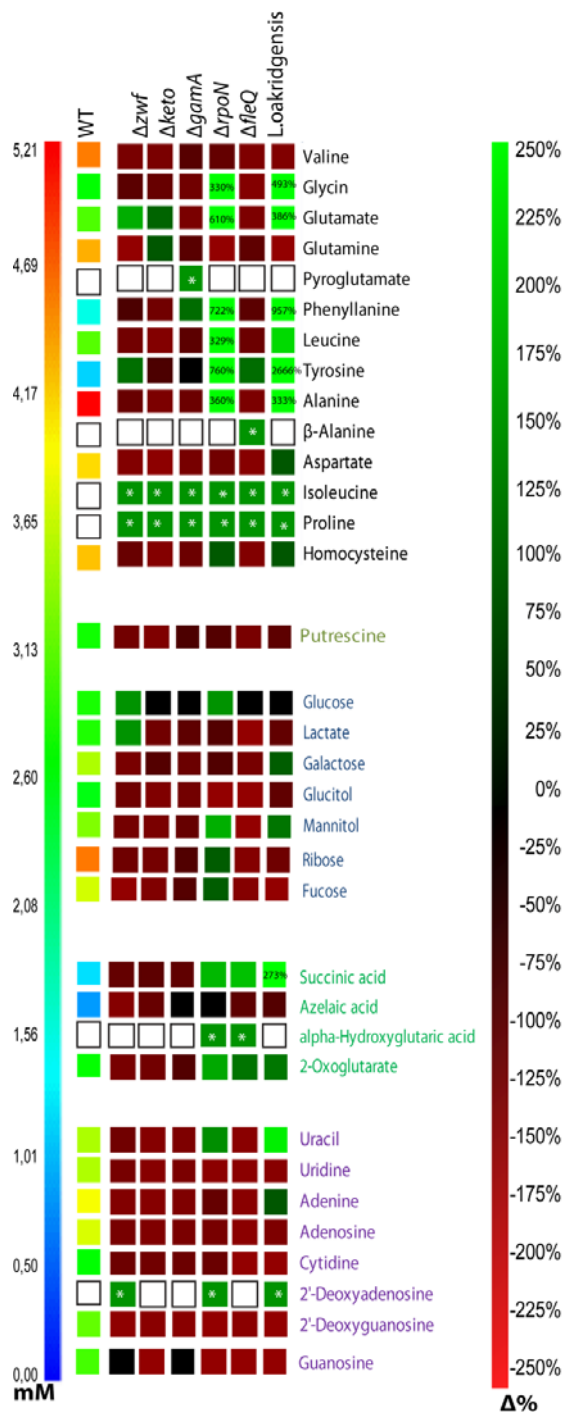
2.3. Metabolomics-Studien

Neben dem ^{13}C -Isotopolog-Profilung von *Legionella* und damit die Untersuchungen des Umfangs und der Art und Weise des Kohlenstoffeintrags aus den verschiedenen Substraten können Metabolomstudien den Wissenskatalog bestehend aus „Proteomics“- , „Genomics“- und „Transcriptom“-daten (siehe beispielsweise Cazalet *et al.*, 2004; Chien *et al.*, 2004; Molofsky and Swanson, 2004; Brüggeman *et al.*, 2006; Dalebroux and Swanson, 2012) über *Legionella* erweitern.

Da das Metabolom das System (die Zelle, den Organismus) zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt als das Genom, Transkriptom oder Proteom definiert ist dies dem tatsächlich resultierend Phänotyp am nächsten (Urbanczk-Wochaniak *et al.*, 2003). Die Herausforderung bei solchen Studien ist das extrem empfindliche Gleichgewicht der Metabolite, das sehr stark von Umweltfaktoren beeinflusst wird (Green *et al.*, 2008; Liebeke *et al.*, 2011). In der Praxis haben sich bis heute verschiedene Strategien etabliert (vergleiche Kapitel I.8), die Analytik der Wahl in vorliegender Arbeit ist das Metabolit-Profilung mit Hauptaugenmerk auf Methanol-lösliche Metabolite. Da diese Studien fokussiert sind auf die stabilen Metabolite (ohne rasanten Umsatz, wie das beispielsweise für ATP der Fall wäre) wurde auf ein übliches Quenching der Proben verzichtet und dies durch Einfrieren der Proben bei -20°C erreicht (siehe Kapitel II.4.3.). Zur Analyse der Proben kamen sowohl NMR-Spektroskopie als auch GC/MS zum Einsatz. Eine Quantifizierung erfolgte in der GC/MS-Analytik anhand des rechnerischen Vergleichs zwischen der Peakarea eines Signals und dem internen Standard Norvalin (5 mM Endkonzentration), wobei die Qualifizierung über die NIST-Bibliothek der Shimadzu-GC/MS-Postrun Software statt fand. Die Quantifizierung aus den ^1H -NMR-Spektren erfolgte anhand des manuellen Abgleichs der Signalhöhen im Spektrum mit denen der Standardspektren im ChenomX-Profilier (ausgehend von der Konzentration des TSP-Standards in der Probe). Die Qualifizierung erfolgte ebenfalls über den ChenomX-Profilier.

2.3.1. Ergebnisse der $^1\text{H-NMR}$ -Analytik

In den ^1H -Spektren konnten für *Legionella* (*L. pneumophila* Wildtypstamm und *zwf*-, *keto*-, *gamA*-, *rpoN*- und *fleQ*-Deletionsmutanten sowie *L. oakridgensis*) insgesamt 69 methanol-lösliche Metabolite detektiert werden (Abbildung 3.36 und 3.37). Darunter befanden sich 23 Intermediate, 4 Fettsäuren und Lipide, Nucleobasen (Uracil, Adenin,



Cytidin, Guanosin), die Dicarbonsäuren Succinat, Azelat und α -Hydroxyglutarat. Des Weiteren konnten neun verschiedene Zucker, und 14 AS, darunter Valin, Glycin, Glutamat, Glutamin, Phenylalanin, Leucin, Tyrosin, Alanin, Aspartat, Isoleucin, Prolin und Cystein gemessen werden. Ebenfalls konnte das Amid Putrescine, sowie der Speicherstoff PHB (beziehungsweise dessen Monomer 3-HB) detektiert werden.

Abbildung 3.36: Metabolom-Fingerprint (Aminosäuren, Amide und Zuckerverbindungen) von *L. pneumophila* Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ sowie *L. oakridgensis* mittels $^1\text{H-NMR}$. Linke Skala: Metabolitenmenge im WT, extrahiert aus 30 mg lyophilisiertem Bakterienpellet. Werte sind Mittelwerte dreier biologischer Replikate. Die Darstellung ist semi-logarithmisch, um auch kleine Konzentrationsunterschiede farblich hervorzuheben. Rechte Skala: Prozentuale Zu- (grün) oder Abnahme (rot) der Metabolitenkonzentration in den verschiedenen Stämmen verglichen zu *L. pneumophila* WT. Schwarzumrandete weiße Kästchen repräsentieren Metabolite, die nicht detektiert werden konnten; Grüne Boxen mit Sternen gekennzeichnet sind in den Vergleichsstämmen vorhanden, in *L. pneumophila* WT nicht.

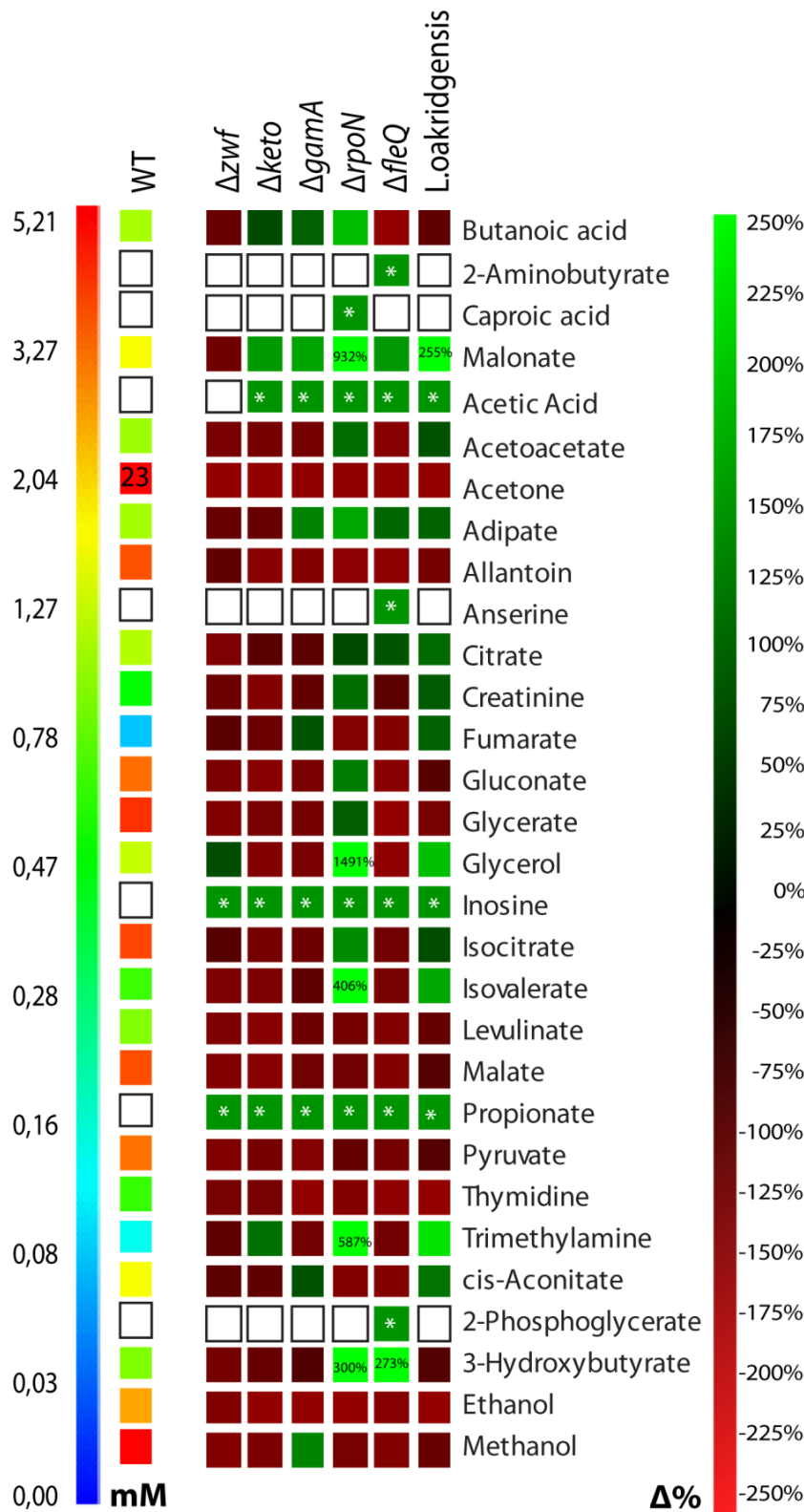


Abbildung 3.37: Metabolom-Vergleich (Speicherstoffe und Intermediate) zwischen *L. pneumophila* Wildtypstamm und den Deletions-mutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ und *L. oakridgensis* mittels 1H -NMR. *Linke Skala:* Metabolitenmenge im WT, extrahiert aus 30 mg lyophilisiertem Bakterien-pellet. Werte sind Mittelwerte dreier biologischer Replikate. Die Darstellung ist semi-logarithmisch, um auch kleine Konzentrations-unterschiede farblich hervor-zuheben. *Rechte Skala:* Prozentuale Zu-(grün) oder Abnahme (rot) der Metaboliten-konzentration in den verschiedenen Stämmen verglichen mit *L. pneumophila* WT. Schwarzumrandete weiße Kästchen repräsentieren Metabolite, die nicht detektiert werden konnten; Grüne Boxen mit Sternen gekennzeichnet sind in den Vergleichsstämmen vorhanden, in *L. pneumophila* WT nicht..

***L. pneumophila* Wildtypstamm:**

Durchschnittlich höchste Konzentrationen (extrahiert aus 30 mg Bakterienpellet) konnten für *L. pneumophila* WT im ¹H-Spektrum folgende Metabolite erzielen: Alanin (5,2 mM), Valin (3 mM), Isocitrat und Malat (2,7 mM), Glutamin und Pyruvat (2,3 mM), Cystein (2,1 mM), Aspartat (2 mM), Galactose und Malonat (1 mM) Glutamat, Citrat und Glycerol (0,8 mM), Leucin und Acetoacetat (0,7 mM), 3-HB (0,6 mM) des Weiteren Glycin, Putrescin, Lactat und Glucose (0,5 mM), sowie NADPH (0,2 mM).

zwf-Deletionsmutante:

Die *zwf*-Deletionsmutante unterscheidet sich vom Wildtypstamm im Wesentlichen durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Glu, Ile, Pro, Glc, Lac, Inosine, Propionat und Glycerol. Alle anderen Metabolite sind vergleichsweise zum Wildtypstamm mit ähnlicher (oder leicht reduzierter) Konzentration vorhanden.

keto-Deletionsmutante:

In der *keto*-Deletionsmutante werden gegenüber dem Wildtyp erhöhte Konzentrationen an Buttersäure (Baustein von PHB), Malonat, Inosin, sowie Glu, Ale und Pro gemessen. Die anderen methanol-löslichen Metabolitkonzentrationen entsprechen dem Wildtypstamm oder sind sehr gering kleiner.

gamA-Deletionsmutante:

Die Deletionsmutane in der Glycoamylase A hat erhöhte Konzentrationen gegenüber *L. pneumophila* WT in Phe, Ile und Pro, sowie in der Buttersäure, Malonat, Acetat, Adipate, Fumarat, Inosin, Propionat und Aconitat.

fleQ-Deletionsmutane:

In *L. pneumophila* Δ *fleQ* (Deletionsmutante in der Flagellenbiosynthese) konnten erhöhte Konzentrationen in Tyr, β -Ala, Ile, Pro, Succinat, Hydroxyglutarat und Ketoglutarat, sowie Aminobutytrat, Malonat, Acetat, Adipat, Citrat und Propionat detektiert werden. Auffälligerweise konnte ausschließlich in der *fleQ*-Deletionsmutante Anserin im Metabolom identifiziert werden. Gemeinsam mit der zweiten Deletionsmutante in der Flagellenbiosynthese Δ *rpoN* konnten stark erhöhte Konzentrationen an 3-HB (Monomer zu PHB) quantifiziert werden.

rpoN-Deletionsmutante und L. oakridgensis:

Besonders auffällig sind die im Vergleich zum Wildtypstamm stark erhöhten Konzentrationen an intrazellulärem Gly, Glu, Phe, Leu, Tyr, Ala, Ile und Pro, sowie Glucose, Mannitol und Ribose, des Weiteren Succinat, Hydroxyglutarat und Ketoglutarat, Malonat, Adipat, Citrat

und Glycerol, sowie Isocitrat, Isovalerat und Propionat sowohl in der *rpoN*-Deletionsmutante als auch im *L. oakridgensis* Stamm. Interessanterweise ähneln somit *L. pneumophila* $\Delta rpoN$ mehr *L. oakridgensis* vom Metabolom, als *L. pneumophila* WT. Eine Ausnahme besteht in der Konzentration an Buttersäure. Diese ist in $\Delta rpoN$ leicht erhöht gegenüber *L. pneumophila* WT und in *L. oakridgensis* leicht erniedrigt.

2.3.2. Ergebnisse der GC/MS-Analytik

Anhand der GC/MS-Chromatogramme konnten in *Legionella* (*L. pneumophila* Wildtypstamm und *zwf*-, *keto*-, *gamA*-, *rpoN*- und *fleQ*-Deletionsmutanten sowie *L. oakridgensis*) insgesamt 84 methanol-lösliche Metabolite detektiert werden (Abbildung 3.38 und 3.39). Dabei konnten vor allem verschiedene Fettsäuren und Lipide detektiert werden (30 Metabolite). Des Weiteren wurden die Hydroxysäure Arabinonsäure, der Speicherstoff PHB (beziehungsweise das Monomer 3-HB), die Nucleobasen Uracil und Uridin, sowie fünf verschiedene Dicarbonsäuren (Adipinsäure, OAA, Succinat, Azelat und α -Hydroxyglutarat) und diverse Zucker (21 Metabolite) identifiziert. Zudem konnten acht verschiedene Amide, unter anderem Putrescin, sowie acht Aminosäuren (Valin, Serin, Glycin, Threonin, Glutamat, Phenylalanin, Leucin und Tyrosin) quantifiziert werden.

***L. pneumophila* Wildtypstamm:**

Durchschnittlich höchste Konzentrationen (extrahiert aus 30 mg Bakterienpellet) konnten für *L. pneumophila* WT in Valin, Palmitat und Phosphorsäure (3,2 mM), Diplamitin (2,4 mM), Palmitin (1,4 mM), Glycerol (1,2 mM), Stearat und Adipinsäure (1 mM), sowie 3-HB (0,6 mM) quantifiziert werden.

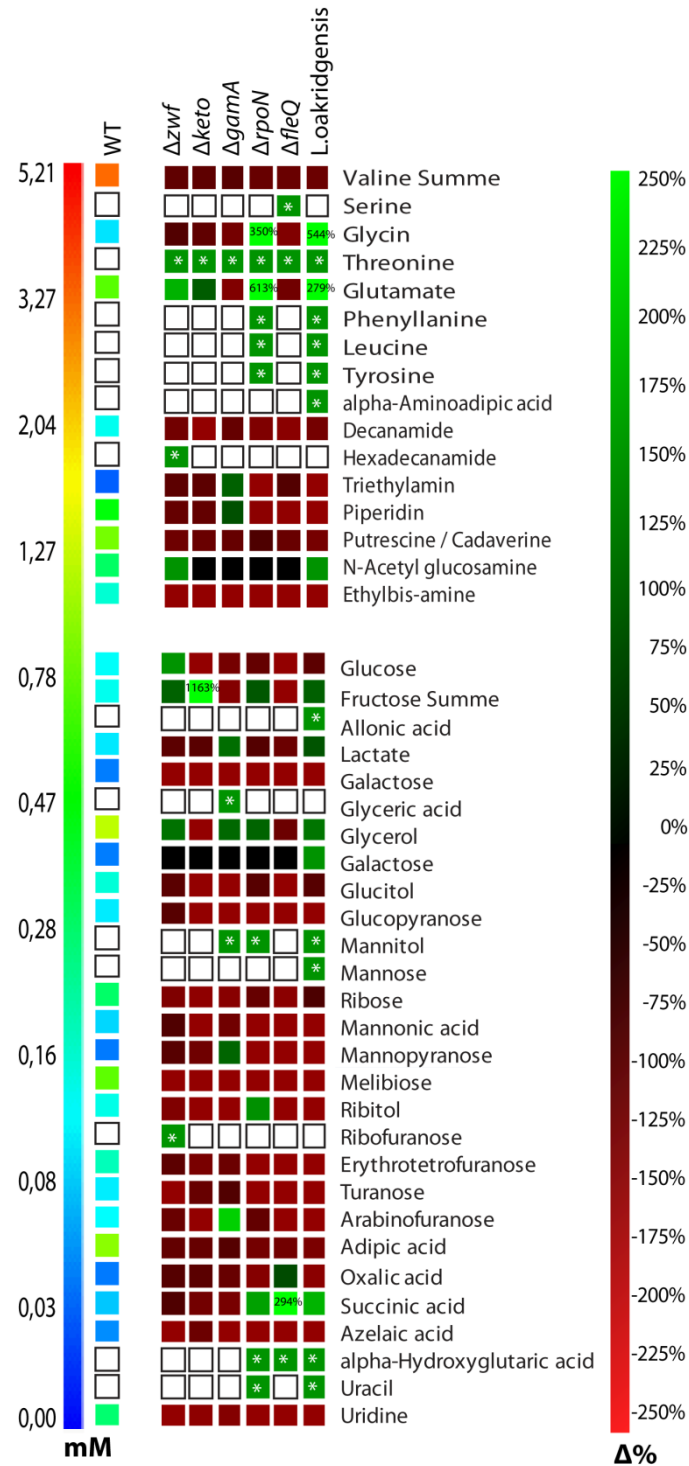


Abbildung 3.38: Metabolom-Vergleich (Aminosäuren, Amide und Zuckerverbindungen) zwischen *L. pneumophila* Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ und *L. oakridgensis* mittels GC/MS. Linke Skala: Metabolitenmenge im WT, extrahiert aus 30 mg lyophilisiertem Bakterienpellet. Werte sind Mittelwerte dreier biologischer Replikate. Die Darstellung ist semi-logarithmisch, um auch kleine Konzentrationsunterschiede farblich hervorzuheben. Rechte Skala: Prozentuale Zu- (grün) oder Abnahme (rot) der Metabolitenkonzentration in den verschiedenen Stämmen verglichen zum *L. pneumophila* Wildtypstamm. Schwarzumrandete weiße Kästchen repräsentieren Metabolite, die nicht detektiert werden konnten; Grüne Boxen mit Sternen gekennzeichnet sind in den Vergleichsstämmen vorhanden, in *L. pneumophila* WT nicht.

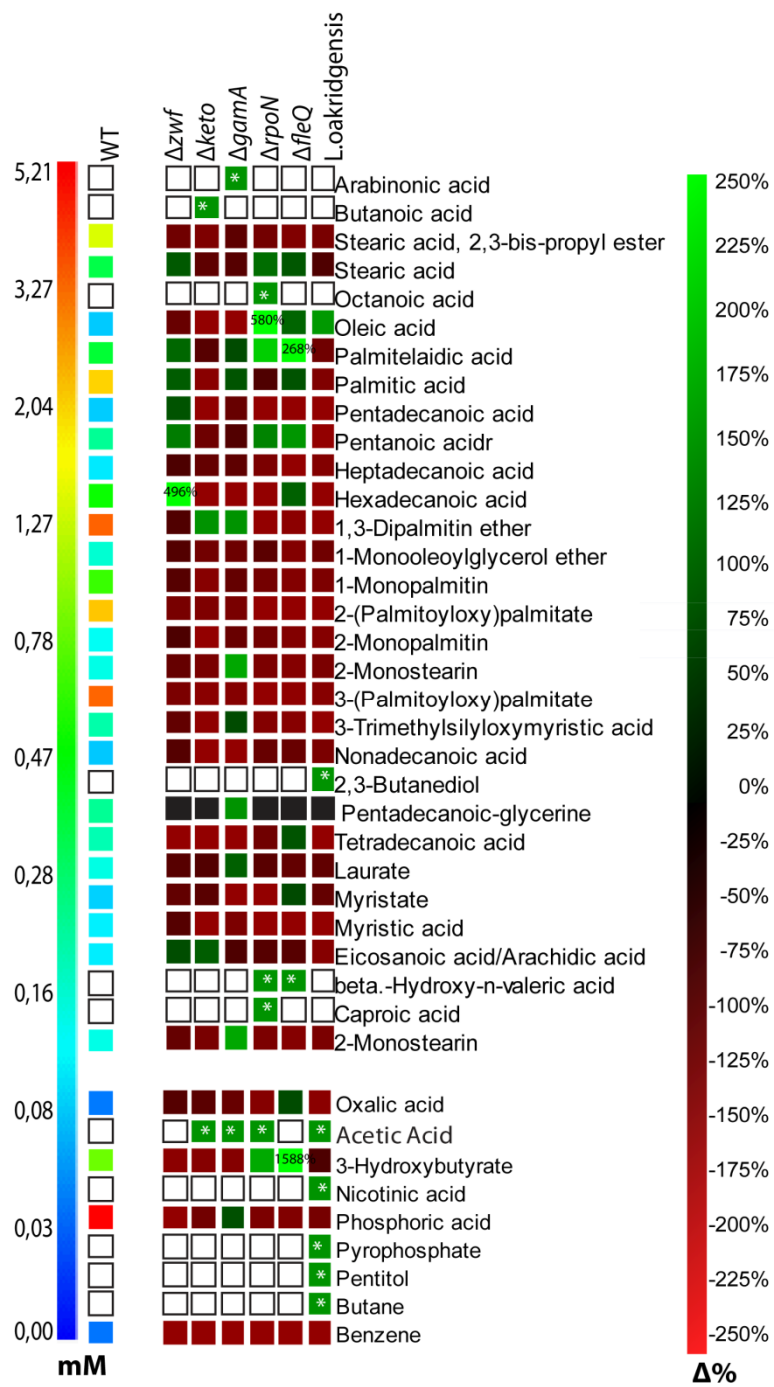


Abbildung 3.39: Metabolom-Vergleich (Speicherstoffe und Fettsäuren) zwischen *L. pneumophila* Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ und *L. oakridgensis* mittels GC/MS. Linke Skala: Metabolitenmenge im WT, extrahiert aus 30 mg lyophilisiertem Bakterienpellet. Werte sind Mittelwerte dreier biologischer Replikate. Die Darstellung ist semi-logarithmisch, um auch kleine Konzentrationsunterschiede farblich hervorzuheben. Rechte Skala: Prozentuale Zu- (grün) oder Abnahme (rot) der Metabolitenkonzentration in den verschiedenen Stämmen, im Vergleich zu *L. pneumophila* WT.

zwf-Deletionsmutante:

In der *zwf*-Deletionsmutante werden gegenüber dem *L. pneumophila* Wildtypstamm erhöhte intrazelluläre Konzentrationen an Glu, Thr, Fru, Glycerol, Palmitinsäure und Hexadecansäuren gemessen. Die anderen Methanol-löslichen Metabolite entsprechen in ihren Konzentrationen dem Wildtypstamm oder sind sehr gering reduziert.

keto-Deletionsmutante:

Die *keto*-Deletionsmutante unterscheidet sich vom Wildtypstamm im Wesentlichen durch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration an Buttersäure (Baustein von PHB), Thr, Glu, Fru, Acetat und Dipalmitinsäure. Alle anderen Metabolitkonzentrationen sind vergleichsweise zum Wildtypstamm mit ähnlicher (oder leicht reduzierter) Konzentration vorhanden.

gamA-Deletionsmutante:

In *L. pneumophila* Δ *gamA* lassen sich höhere Konzentrationen an Acetat, Thr, Arabinonsäure, Lactat, Glycerol und Mannitol gegenüber dem Wildtypstamm detektieren.

fleQ-Deletionsmutane:

In *L. pneumophila* Δ *fleQ* (Deletionsmutante in der Flagellenbiosynthese) konnten erhöhte Konzentrationen in Succinat, Hydroxyglutarat und Ketoglutarat, sowie Palmitinsäure und Stearinsäure quantifiziert werden. Auffälligerweise konnte ausschließlich in der *fleQ*-Deletionsmutante Serin mittels GC/MS detektiert werden. Gemeinsam mit der zweiten Deletionsmutante in der Flagellenbiosynthese Δ *rpoN* konnten stark erhöhte Konzentrationen an 3-HB (Monomer zu PHB) quantifiziert werden.

rpoN-Deletionsmutante und L. oakridgensis:

Besonders auffällig sind die im Vergleich zum Wildtypstamm stark erhöhten Konzentrationen an intrazellulärem freien AS Gly, Glu, Phe, Leu, Tyr, sowie Mannitol und Fru, des Weiteren Succinat, Hydroxyglutarat, Ketoglutarat und Glycerol sowohl in der *rpoN*-Deletionsmutante als auch im *L. oakridgensis* Wildtypstamm. Interessanterweise ähneln somit *L. pneumophila* Δ *rpoN* mehr *L. oakridgensis* von der phänotypischen Ausprägung der intrazellulären Metabolitkonzentrationen, als *L. pneumophila* WT.

2.3.3. Diskussion

Die Betrachtung der freien Metabolite zum Zeitpunkt der Zellernte zeigt im Gegensatz zu den Ergebnissen der proteinogenen Aminosäuren in den ^{13}C -Isotopolog-Studien eine Momentaufnahme des Stoffwechsellnetzwerks von *Legionella*. Dementsprechend stellt das in vorliegender Arbeit analysierte Metabolom zu einem bestimmten Zeitraum im Wachstum von *Legionella* am besten den metabolischen Phänotypen anschaulich dar. Aufgrund der Fülle des Metabolitenkatalogs lassen sich dadurch im Vergleich mit Transkriptomdaten einige Auffälligkeiten und Besonderheiten festmachen.

Die erhöhte intrazelluläre Konzentration an Glucose und Kohlenhydrate im Allgemeinen in der *zwf*-Deletionsmutante (Abbildung 3.40) stimmen gut mit den bereits beobachteten Ergebnissen aus den Isotopolog-Daten überein (siehe Kapitel III.2.1.). Da der ED-Weg in dieser Mutante blockiert ist, wird die Glucose über die Glycolyse abgebaut. Dies geschieht allerdings mit einer bis zu zehnfach niedrigeren Umsatzrate, so dass eine intrazelluläre Akkumulation von Glucose erklärbar ist.

Vergleicht man die Transkriptomdaten der beiden Flagellensynthese-Deletionsmutanten $\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$ von Albert-Weissenberger *et al.* (2010) mit vorliegender Metabolomstudie so ist die im Metabolitprofil beobachtete Hochregulation der PHB-Synthese vermutlich verursacht durch die Hochregulation der Acetoacetyl-CoA-Reduktase. Betrachtet man im Vergleich dazu die Isotopolog-Profile beider Mutanten ist ersichtlich, dass aus Glucose mehr PHB *de novo* synthetisiert wird, als das im Wildtypstamm der Fall ist, mit Serin als Vorstufe ist dieser Zusammenhang gegenteilig. Zudem sind in beiden Deletionsmutanten Aminosäuretransporter hochreguliert in $\Delta fleQ$ sind simultan noch Enzyme zum Aminosäureabbau (His-Operon) massiv runterreguliert (Albert-Weissenberger *et al.*, 2010), so dass eine Akkumulation der freien AS erklärbar wäre. Ganzheitlich betrachtet scheinen die Mutanten der Flagellenbiosynthese somit sowohl vom Trankriptom-, als auch vom Isotopolog- und Metabolitprofil eher dem transmissiven Stoffwechselltyp zu entsprechen. Dementzufolge könnten RpoN und FleQ in der replikativen Phase aktiv regulierend wirken, zumal durch beide laut Trankriptomdaten vor allem replikative Gene betroffen sind (Albert-Weissenberger *et al.*, 2010).

Eine weitere spannende Beobachtung ist die Ähnlichkeit der Metabolit-Profile von *L. pneumophila* $\Delta rpoN$ und *L. oakridgensis*. Aktuelle Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass *L. oakridgensis* eine natürliche Mutation in RpoN (Daten aus *L. oakridgensis* weisen auf einen framshift in RpoN hin, annotiert sind zwei Gene für RpoN (persönliche Mitteilung)) in

sich tragen (Heuner, *unpublished Data*). Des Weiteren konnte in *L. oakridgensis* ein erhöhter zellulärer Anteil an freien Fettsäuren beobachtet werden (Orrison *et al.*, 1983), was sehr gut korreliert mit einer im Vergleich zu *L. pneumophila* WT hohen intrazellulären Konzentration an Malonat.

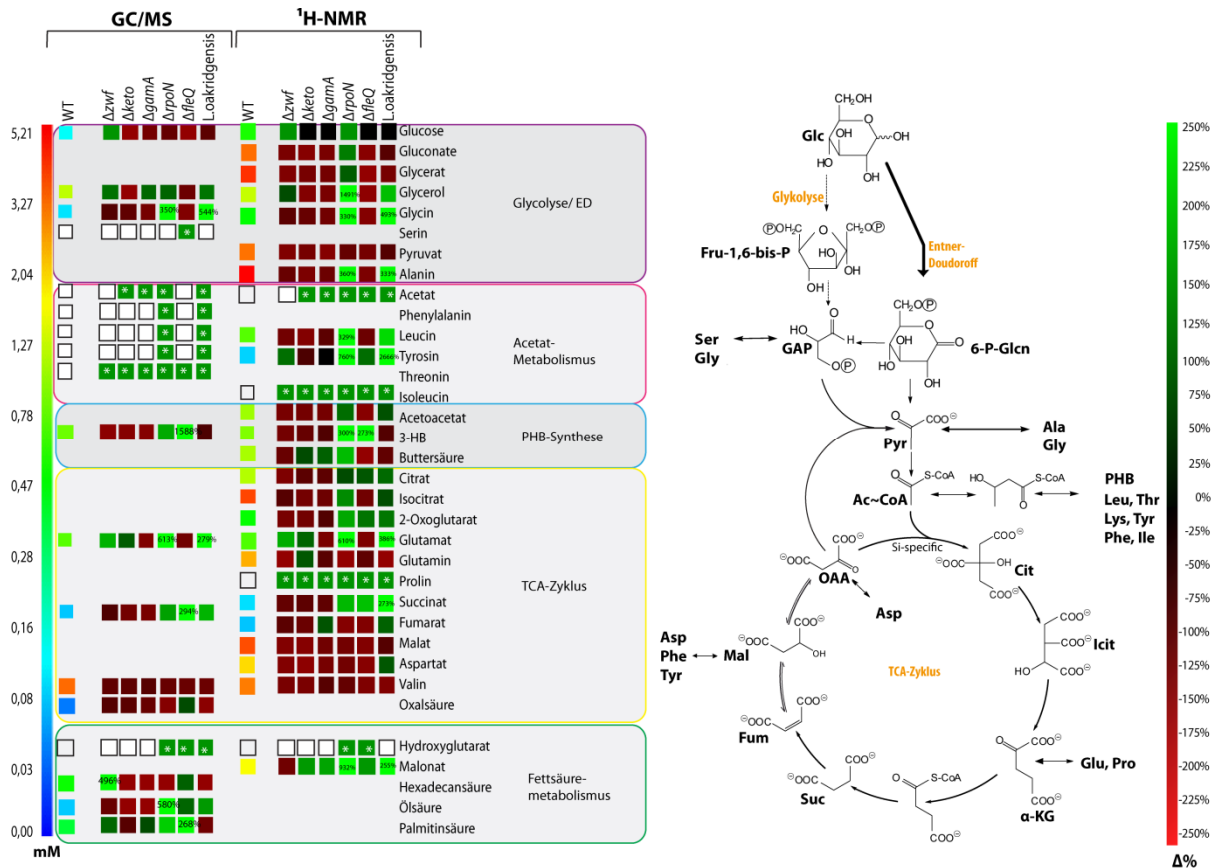


Abbildung 3.40: Zuordnung der detektierten intrazellulären freien Metabolite im Stoffwechselnetzwerk von *Legionella pneumophila*.

Die Ergebnisse des Metabolit-Profilings von *Legionella pneumophila* und *Legionella oakridgensis* aus vorliegender Arbeit wurden anhand NMR-Spektroskopie und GC/MS ermittelt. Die Herausforderung bestand dabei beide Datensätze zu synchronisieren, da auf unterschiedliche Bibliotheken zur Identifizierung der Metabolite zurückgegriffen wurde. Ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Metabolitstudien wäre es, beide Bibliotheken noch weiterführend anhand Standardsubstanzen auf den selben Katalogumfang zu erweitern, um das Screening im High-throughput Verfahren einsetzen zu können. Denkbare Anwendungen wären dabei zeitaufgelöste Metabolit-Fingerprint-Aufnahmen von

L. pneumophila Δ *keto* im Vergleich zum Wildtypstamm. Ein solches Metabolit-Profilung wäre besonders interessant um die Ursache der paradoxen Akkumulation des Speicherstoffs PHB in Δ *keto* trotz Deletion der aktiven β -Ketothiolase zu identifizieren. So könnten beispielsweise auch die Konzentrationsänderungen an Nährstoffen (AS, Zucker, Fettsäuren) über die Zeit im Medium und die Zunahme im intrazellulären Milieu bestimmt werden um aufzuklären, welche Substrate zur Kompensation des Verlusts der β -Ketothiolase maßgeblich beitragen.

3. Modulation des Kohlenstoffmetabolismus von primären und etablierten Mausmakrophagen durch Infektion mit *Listeria monocytogenes*

Erste Versuche geben Hinweise darauf, dass pathogene Bakterien gezielt an den Metabolismus der Wirtszelle angepasst sind und mehr noch diesen sogar spezifisch zu ihren Gunsten modifizieren können (Eylert *et al.*, 2008; Eylert *et al.*, 2010; Eisenreich *et al.*, 2010; Fuchs *et al.*, 2012; Tolman and Valvano, 2012). Aktuell wird diese Modulation durch chronische Infektionen des Magen-Darmtraktes auch in Zusammenhang mit Stoffwechselerkrankungen des Menschen genannt (Burcelin *et al.*, 2012). Somit ist es unabdingbar, die Art der Modifikation des Wirtsstoffwechsel bei Infektion genauer zu betrachten. Dies ist in einigen Vorgängerstudien bereits geschehen, ein möglicher Schwachpunkt dieser Experimente könnte darin liegen, dass etablierte (Tumor-) Zelllinien zum Einsatz kamen, welche zwar leicht kultiviert werden können, aber als Untersuchungsobjekte zur tatsächlichen Infektion in natürlichen Systemen nur Modellcharakter haben. Wie in Kapitel I.7 beschrieben, weisen Tumorzellen einen deregulierten Metabolismus auf, wodurch mögliche Modifikationen maskiert sein könnten. Deshalb werden im Folgenden bewusst die durch eine *Listerien*-Infektion ausgelösten Veränderungen im Kohlenstoffmetabolismus von primären Knochenmarksmakrophagen (BMM; von der Maus) mit jener von murinen etablierten Makrophagen (J774A.1; von der Maus) verglichen. Dazu wurden BMM und J774A.1 parallel mit *L. monocytogenes* in Gegenwart von 10 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose oder 2 mM [U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin infiziert. Anhand der ermittelten ^{13}C -Inkorporationsraten und der ^{13}C -Isotopolog-Verteilung der proteinogenen Aminosäuren werden die Anteile der Stoffwechselwege in uninfizierten und infizierten BMM und J774A.1 retrospektiv abgeleitet (wie in Kapitel I.2 mit I.3 geschildert).

3.1. Ergebnisse

3.1.1. Differentielle ^{13}C -Inkorporationsrate aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$

Da Glucose eine der wichtigsten Kohlenstoffquellen für Säugetierzellen darstellt, wurde zuerst die Menge an inkorporiertem ^{13}C aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ in die nicht-essentiellen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly und Ser bestimmt. Dazu wurden die BMM- und J774A.1-Zellen ohne und mit Infektion durch *L. monocytogenes* in RPMI (+10% FCS) supplementiert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ für 24 h inkubiert.

BMM:

Tabelle 3.5: ^{13}C -Excess-Werte nicht-essentieller, proteinogener Aminosäuren von BMM mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$.

BMM	uninfiziert - IFN- γ				uninfiziert + IFN- γ			
	I		II		I		II	
Ala	0,30%	0,02%	0,42%	0,01%	0,51%	0,06%	1,15%	0,02%
Asp	0,05%	0,04%	0,33%	0,06%	0,08%	0,02%	0,65%	0,03%
Glu	0,29%	0,02%	0,64%	0,11%	0,36%	0,04%	1,15%	0,03%
Gly	0,00%	0,00%	0,19%	0,02%	0,01%	0,03%	0,44%	0,02%
Ser	0,33%	0,21%	0,15%	0,00%	0,27%	0,07%	0,45%	0,02%
BMM	<i>Lm</i> -infiziert - IFN- γ				<i>Lm</i> -infiziert + IFN- γ			
	I		II		I		II	
Ala	0,93%	0,05%	1,93%	0,03%	1,61%	0,04%	2,54%	0,06%
Asp	0,44%	0,04%	1,44%	0,03%	0,66%	0,05%	1,43%	0,01%
Glu	1,25%	0,01%	3,04%	0,04%	1,62%	0,04%	2,86%	0,03%
Gly	0,00%	0,01%	0,63%	0,12%	0,10%	0,07%	0,66%	0,03%
Ser	0,35%	0,09%	0,28%	0,10%	0,53%	0,06%	0,40%	0,08%
BMM	UV- <i>Lm</i> -infiziert - IFN- γ				UV- <i>Lm</i> -infiziert + IFN- γ			
	I		II		I		II	
Ala	0,73%	0,00%	1,22%	0,05%	1,57%	0,14%	2,11%	0,01%
Asp	0,18%	0,16%	0,89%	0,04%	0,59%	0,03%	1,06%	0,01%
Glu	0,91%	0,02%	1,80%	0,04%	1,57%	0,01%	2,05%	0,00%
Gly	0,01%	0,02%	0,25%	0,04%	0,05%	0,04%	0,34%	0,04%
Ser	0,32%	0,07%	0,18%	0,02%	0,57%	0,15%	0,36%	0,04%

In uninfizierten BMM können geringe, aber reproduzierbare ^{13}C -Einbauraten in Ala (0,3 bis 0,4%) und Glu (0,3 bis 0,6%) beobachtet werden (in Tabelle 3.5 und Abbildung 3.41 dargestellt). Nach Zugabe von 20 ng/mL Interferon- γ erhöhen sich diese circa um den Faktor

2 (Ala: 0,5-1,2% und Glu: 0,4-1,2%). Wesentlich dramatischer steigt der ^{13}C -Einbau von Ala, Asp, Ser und Gly aus ^{13}C -Glucose durch die Infektion mit *L. monocytogenes* an (bis zu zehnfach höhere ^{13}C -Excess-Werte). Auch während der Infektion hat IFN- γ einen stimulierenden Effekt, jedoch nur bei Ala mit einem Faktor von 1,5. Angesichts einer Infektion mit UV-abgetöteten *L. monocytogenes* erhöht sich die ^{13}C -Inkorporationsrate in die nicht-essentiellen AS um einen ähnlichen Faktor wie es die Zugabe von IFN- γ erreicht (bis zu 2-fach). Während der Infektion mit UV-abgetöteten Listerien hat IFN- γ einen vergleichbar verstärkenden Effekt wie bei uninfizierten BMM.

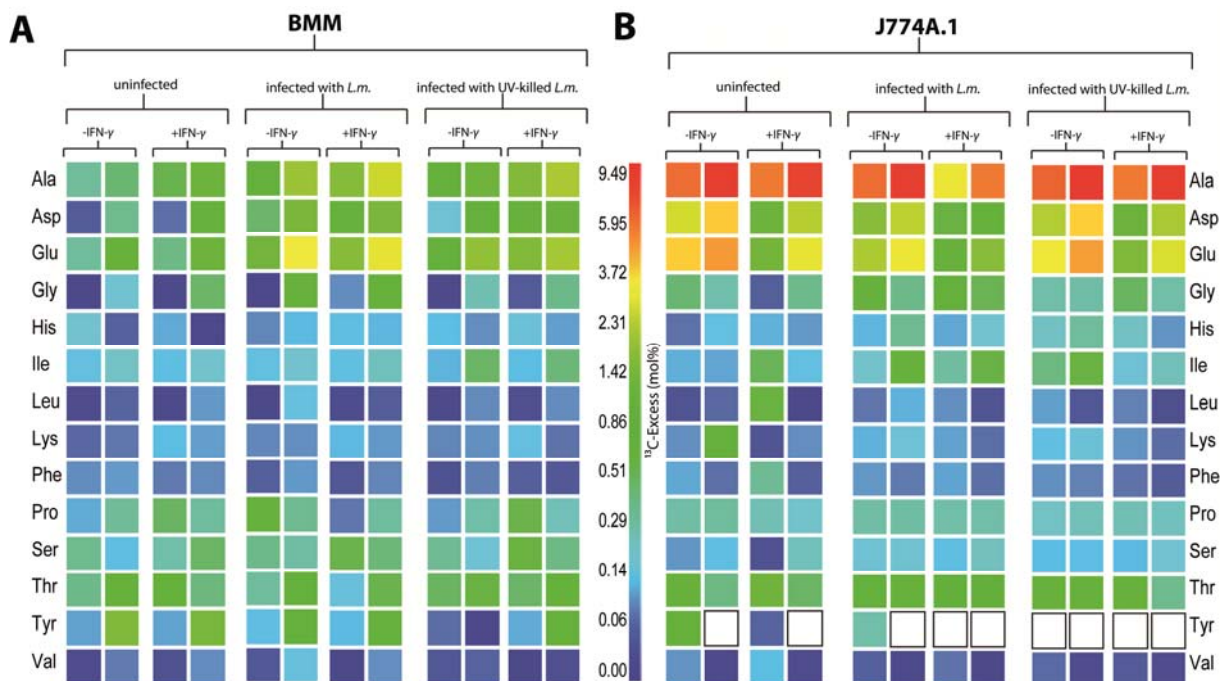


Abbildung 3.41: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von (A) BMM- und (B) J774A.1-Zellen. Die Zellen wurden mit und ohne *L. monocytogenes* und IFN- γ in Anwesenheit von 10 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose inkubiert. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt. Die Werte sind in quasi-logarithmischer Form dargestellt. Aminosäuren mit weißen Kästchen konnten nicht detektiert werden.

J774A.1:

Die J774A.1-Zellen weisen bereits im uninfizierten Zustand im Vergleich zu den BMM-Zellen hohe ^{13}C -Excess-Werte in Ala (5,8-8,8%), Asp (2,6-3,6%) und Glu (0,3-0,4%) auf (Faktor 5 und mehr; siehe Tabelle 3.6 und Abbildung 3.41). Anders als die BMM-Zellen reagieren sie jedoch auf Zugabe von IFN- γ mit einer verminderten *de novo*-Synthese von Ala (nur noch 80%), Asp (nur noch 62%) und Glu (nur noch 64%). Die Synthese von Gly und Ser aus Glucose ist vergleichsweise gering wie in den primären Makrophagen und wird auch nicht durch IFN- γ beeinflusst. Ähnlich wie der drosselnde Effekt von IFN- γ , wirkt sich

ebenso die Infektion von *L. monocytogenes* auf die *de novo*-Synthese von Asp und Glu aus Glucose in J774A.1 aus, nicht jedoch auf die Synthese von Ala, Gly und Ser. Noch dramatischer ist der inhibierende Effekt bei Infektion und gleichzeitiger Addition von IFN- γ (bei Ala nur noch 60%, Asp nur noch 26% und Glu nur noch 36% im Vergleich zum uninfizierten Zustand ohne IFN- γ (Tabelle 3.6)). Im Gegensatz zu den primären Makrophagen beantworten die J774A.1 die Infektion mit UV-abgetöteten Listerien nicht mit einer veränderten Rate an ^{13}C -Inkorporation aus Glucose. Ebenfalls reagieren sie ähnlich auf Zugabe von IFN- γ in Beisein von UV-abgetöteten Listerien wie im uninfizierten Zustand.

Tabelle 3.6: ^{13}C -Excess-Werte nicht-essentieller, proteinogener Aminosäuren von J774A.1 mit 10 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose.

J774A.1	uninfiziert - IFN- γ				uninfiziert + IFN- γ			
	I		II		I		II	
Ala	5,82%	0,04%	8,85%	0,04%	5,35%	0,07%	7,84%	0,08%
Asp	2,64%	0,03%	3,64%	0,03%	1,17%	0,02%	2,29%	0,06%
Glu	3,60%	0,05%	4,46%	0,06%	1,32%	0,03%	2,88%	0,03%
Gly	0,41%	0,03%	0,26%	0,01%	0,06%	0,01%	0,34%	0,03%
Ser	0,11%	0,01%	0,15%	0,06%	0,03%	0,03%	0,23%	0,05%

J774A.1	<i>Lm</i> -infiziert - IFN- γ				<i>Lm</i> -infiziert + IFN- γ			
	I		II		I		II	
Ala	5,82%	0,06%	8,79%	0,04%	2,94%	0,03%	5,35%	0,01%
Asp	1,65%	0,02%	2,36%	0,05%	0,55%	0,02%	0,97%	0,02%
Glu	2,14%	0,04%	2,94%	0,04%	0,99%	0,04%	1,66%	0,02%
Gly	0,58%	0,02%	0,35%	0,08%	0,75%	0,09%	0,50%	0,03%
Ser	0,18%	0,01%	0,19%	0,08%	0,15%	0,04%	0,23%	0,02%

J774A.1	UV- <i>Lm</i> -infiziert - IFN- γ				UV- <i>Lm</i> -infiziert + IFN- γ			
	I		II		I		II	
Ala	6,17%	0,02%	9,49%	0,33%	5,36%	0,05%	8,57%	0,00%
Asp	2,24%	0,04%	3,58%	0,07%	1,13%	0,02%	2,11%	0,03%
Glu	2,97%	0,06%	4,38%	0,04%	1,50%	0,01%	2,70%	0,01%
Gly	0,27%	0,09%	0,28%	0,02%	0,47%	0,02%	0,27%	0,06%
Ser	0,14%	0,01%	0,15%	0,07%	0,14%	0,00%	0,19%	0,01%

Aus den ^{13}C -Excess-Werten (in mol%) ist klar ersichtlich, dass sich die J774A.1 schon im uninfizierten Zustand von den primären BMM signifikant unterscheiden und auch eine Infektion disparat, bezüglich der *de novo*-Syntheserate von Ala, Asp und Glu beantworten.

3.1.2. ^{13}C -Isotopologmuster von BMM und J774A.1 mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$

Alle Intermediate der markierten und damit aus Glucose *de novo* synthetisierten Aminosäuren von BMM und J774A.1 stammen aus der Glycolyse (Ala, Ser, Gly), dem PPP (Ala, Ser und Gly) oder dem TCA-Zyklus (Asp und Glu). Alanin entsteht aus dem Intermediat Pyruvat, Serin aus 3-Phosphoglycerat, Glycin wiederum aus Serin, Aspartat aus OAA und Glutamat aus α -Ketoglutarat.

BMM:

Wie zuvor beschrieben, sind in den uninfizierten BMM lediglich geringe ^{13}C -Einbauraten in Ala und Glu vorhanden (siehe Abbildung 3.41; BMM und uninfected). Alanin ist unter diesen Bedingungen hauptsächlich M+3-markiert, was auf einen Abbau von Glucose über die Glycolyse hin zu $[\text{}^{13}\text{C}_3]$ -Pyruvat schließen lässt. Eine geringe M+2-Markierung kann auf die Verstoffwechslung von Glucose über den PPP-Weg deuten, dieser Weg spielt aber eine untergeordnete Rolle (< 3%) in der Synthese von Alanin unter diesen Bedingungen. Das vollmarkierte $[\text{}^{13}\text{C}_3]$ -Pyruvat wiederum wird durch die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) zu $^{13}\text{CO}_2$ und $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA abgebaut. Letzteres wird in den TCA-Zyklus eingeschleust und ergibt die 2-fach Markierung im Glutamat, das aus $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ - α -Ketoglutarat gebildet wird.

Wird IFN- γ zugegeben, steigt die ^{13}C -Inkorporationsrate bei uninfizierten BMM in Ala, Glu und Asp signifikant an. Bei Alanin erhöht sich der Anteil an M+2, was auf eine verstärkte PPP-Weg-Aktivität rückschließen lässt. Bei Glutamat nimmt M+3 zu, welches aus 3-fach markiertem α -Ketoglutarat synthetisiert wird, dessen Bildung über die Aktivität der ATP-abhängigen Pyruvat Carboxylase (PYC) durch Bereitstellung von 3-fach markiertem OAA aus $[\text{}^{13}\text{C}_3]$ -Pyruvat bedingt ist. Ebenso wie in Glutamat sind die M+2 und M+3 Isotopologe von Aspartat erklärbar. Die 2-fach Markierung entsteht dabei aus $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ -OAA, das aus $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA gebildet wurde. Der Überschuss an 3 ^{13}C -Atomen ist das Produkt der Reaktion von PYC mit $[\text{}^{13}\text{C}_3]$ -Pyruvat. Der relativ hohe Anteil an M+1 lässt sich ebenfalls über die Aktivität der Pyruvat Carboxylase erklären, die zur Bildung von $[\text{}^{13}\text{C}_1]$ -OAA aus $^{13}\text{CO}_2$ und unmarkiertem Pyruvat führt.

Eine Infektion mit *L. monocytogenes* erhöht nicht nur die ^{13}C -Excess-Werte von Ala, Asp und Glu, sondern verändert auch die Isotopolog-Komposition von Asp und Glu entscheidend (Abbildung 3.43). Bei Aspartat kommt es zu einer vermehrten M+2 und M+3 Markierung. Diese resultieren zum einen aus einer erhöhten TCA-Zyklus Aktivität, wodurch aus $[\text{}^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA, übertragen auf unmarkiertes OAA, 2-fach markiertes Citrat entsteht, das den

TCA-Zyklus durchläuft und [$^{13}\text{C}_2$]-OAA ergibt. Zum anderen entsteht die 3-fach Markierung infolge der PYC-Aktivität, die eine anaplerotische Funktion erfüllt (Abbildung 3.42, Flux 2). Zusätzlich zu den M+2-Isotopologen treten bei Glutamat während der Infektion auch gehäuft M+3, M+4 und M+5 Markierungen auf. Diese Markierungsmuster treten auf infolge der PYC- und PDH-katalysierten Reaktionen mit unterschiedlichen Kombinationen von markiertem oder unmarkiertem Pyruvat und CO_2 (Abbildung 3.42, Flux 1). So entstehen [$^{13}\text{C}_1$]-, [$^{13}\text{C}_3$]- oder [$^{13}\text{C}_4$]-OAA Isotopologe, die wiederum in Verbindung mit unmarkiertem oder [$^{13}\text{C}_2$]-Acetyl-CoA entsprechend die [$^{13}\text{C}_1$]-, [$^{13}\text{C}_3$]-, [$^{13}\text{C}_4$]-, und [$^{13}\text{C}_5$]- α -Ketoglutarat-Isotopologe und dementsprechend das gemessene Markierungsmuster von Glutamat ergeben (Abbildung 3.42).

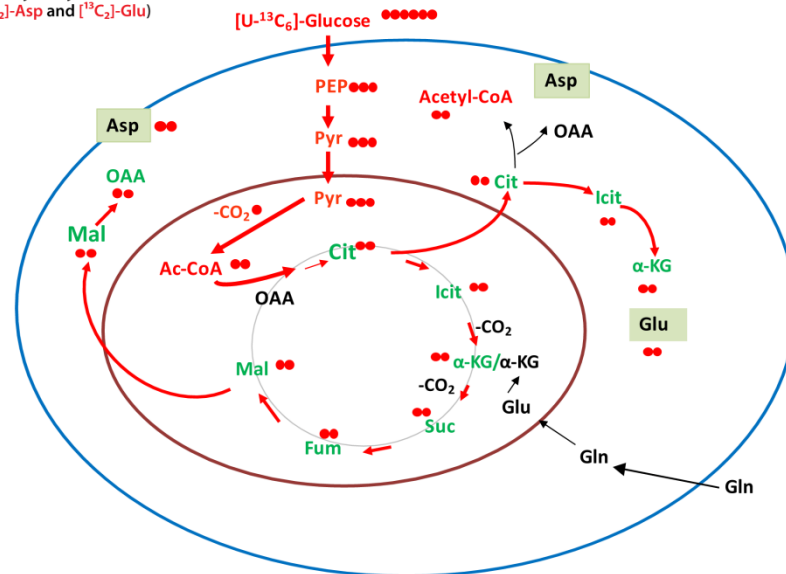
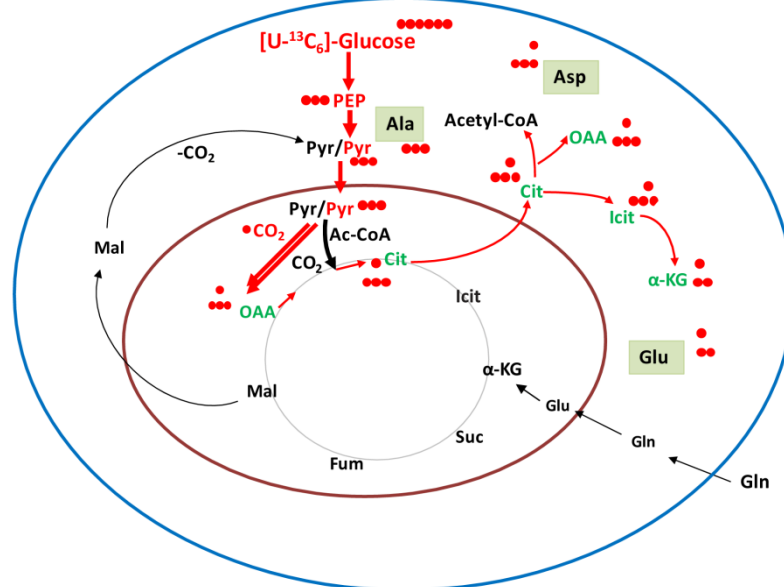
Flux 1 - Glycolysis via PDH/TCA(yielding $^{13}\text{C}_2$ -Asp and $^{13}\text{C}_2$ -Glu)**Flux 2 - via PYC/TCA**(yielding $^{13}\text{C}_1$ -Asp, $^{13}\text{C}_3$ -Asp, and $^{13}\text{C}_1$ -Glu, $^{13}\text{C}_2$ -Glu)

Abbildung 3.42: Stoffflüsse rekonstruiert anhand ^{13}C -Profile proteinogener AS gewonnen aus BMM kultiviert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$. **Blauer Kreis:** BMM-Zellmembran; **roter Kreis:** Mitochondrienmembran; **Farbige Punkte** repräsentieren ^{13}C -Atome im Molekül.

Ähnliche Isotopologmuster sind auch bei Infektion mit UV-abgetöteten *Listerien* zu sehen, lediglich die ^{13}C -Excess-Werte sind etwas niedriger. Dies spricht dafür, dass sowohl Glycolyse, PPP als auch TCA etwas angekurbelt werden, nicht jedoch in dem Ausmaß, wie es bei einer tatsächlichen Infektion mit lebenden *L. monocytogenes* geschieht.

Interessanterweise ist Prolin nahezu gar nicht markiert, obwohl die Synthese von Prolin über Glutamat als Zwischenstufe ähnliche Markierungsmuster wie in Glutamat hervorrufen

müsste. Anders als bei Ala, Asp und Glu, die lediglich eine Transaminierungsreaktion von ihren Vorläufern Pyruvat, OAA und α -Ketoglutarat entfernt sind und somit direkt den Einbau von Glucose widerspiegeln, sind die Biosynthesewege der anderen nicht-essentiellen AS stärker reguliert und vermutlich supprimiert, wenn die korrespondierenden freien AS im Medium vorhanden sind. Die *de novo*-Synthese von Pro benötigt zusätzlich einen relativ hohen Anteil an NADPH, wodurch die direkte Entstehung von Pro über Glu aus Glucose nicht zeitnah zu erwarten ist.

Die Zugabe von IFN- γ während der Infektion hat keinen signifikanten Effekt auf die Höhe der ^{13}C -Excess-Werte und die Isopolog-Muster der markierten AS.

Die Daten zeigen eine relativ geringe metabolische Aktivität der BMM-Zellen im uninfizierten Zustand. Dies ändert sich signifikant mit Infektion durch *L. monocytogenes* (in einem geringeren Ausmaß auch bei Zugabe von IFN- γ oder UV-abgetöteten Listerien) und resultiert in einer verstärkten glykolytischen Aktivität und einem erhöhten Pyruvat-Spiegel, der wiederum zu einer gesteigerten TCA-Zyklus-, sowie PDH- und PYC-Aktivität führt.

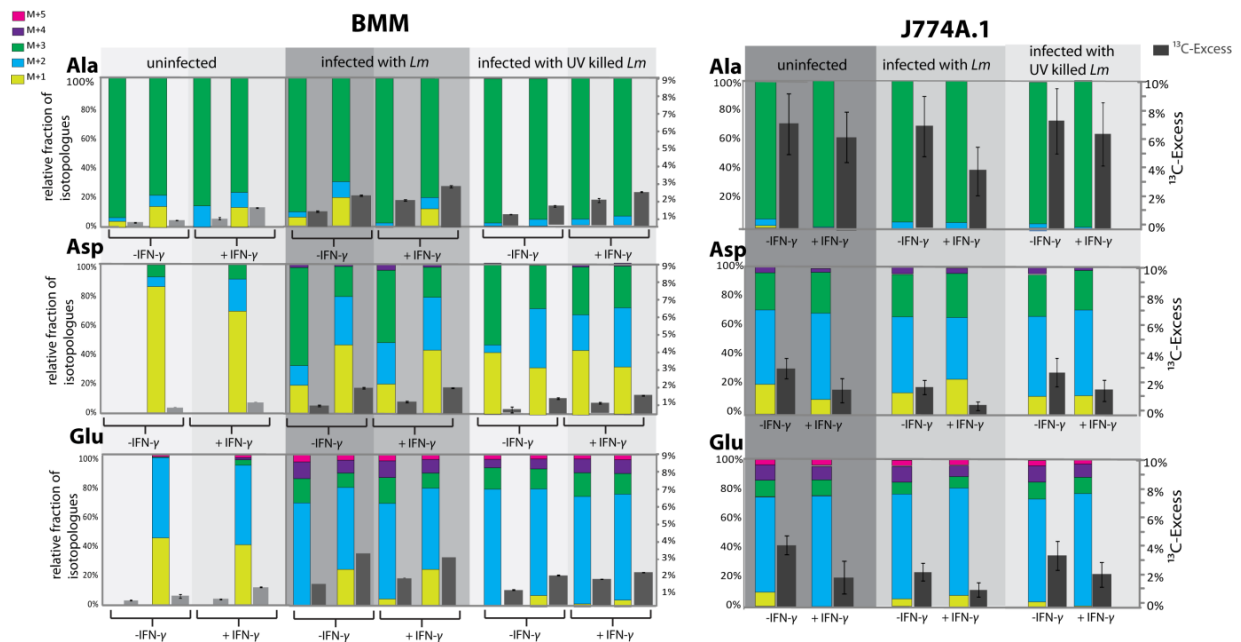


Abbildung 3.43: ^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS aus den Experimenten mit uninfizierten, *Lm*-infizierten und UV-abgetöteten-*Lm*-infizierten BMM und J774A.1 kultiviert mit 10 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]Glucose. Die Einzelexperimente von BMM sind separat aufgeführt, die Werte stellen dabei Mittelwerte von drei Messungen dar. Die J774A.1-Reihe ist als Mittelwert aus zwei biologischen Replikaten dargestellt, Fehlerbalken geben dabei die S.D. an.

J774A.1:

Wie bereits beschrieben, ist die Rate der ^{13}C -Inkorporation in die proteinogenen AS von uninfizierten J774A.1 Makrophagen um ein vielfaches höher als in den BMM-Zellen und wird anders als in den BMM nicht durch Infektion stimuliert (vergleiche Abbildung 3.41).

Die Isotopolog-Muster von Ala, Asp und Glu sowohl in uninfizierten als auch in infizierten J774A.1 sind denen der infizierten BMM sehr ähnlich. Alanin ist fast ausschließlich vollmarkiert. Dies entsteht durch $[^{13}\text{C}_3]$ -Pyruvat, welches durch den Abbau von $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose via Glycolyse produziert wird. Anders als in den BMM spielt somit der PPP-Weg kaum eine Rolle in der Verstoffwechslung von Glucose zu Pyruvat. Glutamat weist exakt das gleiche Muster wie in BMM auf, so dass vermutlich dieselben Synthesewege zu gleichen Anteilen genutzt werden, namentlich sind dabei für die M+2 und M+4-Isotopologe der TCA-Zyklus und „Recycling“ (= mehrmaliges Durchlaufen des TCA-Zyklus von OAA) verantwortlich. Die M+3 und M+5-Markierungen entstehen durch PYC- und PDH-katalysierte Reaktionen (siehe Abbildung 3.43). Aspartat ist hauptsächlich 2-fach markiert, was aus dem Eintritt von $[^{13}\text{C}_2]$ -Acetyl-CoA in den TCA-Zyklus hervorgeht. Im Vergleich zu BMM ist der Anteil an 3-fach Markierung, der durch die Pyruvat-Carboxylase-Aktivität entsteht, etwas niedriger. Hervorzuheben ist die signifikante Ähnlichkeit der Isotopolog-Muster und der ^{13}C -Excess-Werte der *L. monocytogenes* infizierten BMM mit den (uninfiziert und infizierten) J774A.1. Es ist anzunehmen, dass ähnliche Stoffwechselwege zu vergleichbaren Raten für die Glucose in den beiden Fällen stattfinden.

Die erhobenen Daten deuten an, dass die Glycolyse und zumindest die α -KG- und OAA-generierenden Schritte des TCA-Zyklus, die zudem eine essentielle Rolle im Anabolismus (AS-, Nukleotid- und Lipid-Biosynthese) einnehmen, hochaktiv in den J774A.1-Makrophagen sind und sich nicht signifikant bei Infektion mit *L. monocytogenes* verändern. In starkem Kontrast zu den BMM wird die ^{13}C -Einbaurrate etwas gedrosselt bei Anwesenheit von IFN- γ . Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dieser Cytokin Aktivator in primären, unmodifizierten Zellen eine ganz andere Wirkungsweise als in Tumorzellen hat. Diese Tatsache spiegelt sich auch im Metabolismus wieder und zeigt so eine Schnittstelle zwischen Stoffwechsel und Immunantwort in Wirtszellen auf.

3.1.3. Differentielle ^{13}C -Inkorporationsrate aus $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$

Glutamin wird von Säugerzellen häufig als zusätzliche „anaplerotische“ C-Quelle zur Aufrechterhaltung des TCA-Zyklus verwendet. Via Glutaminolyse wird exogenes Glutamin durch die Glutaminase-Aktivität zu Glutamat und weiter in den Mitochondrien durch die NAD-abhängige Glutamatdehydrogenase zu α -KG, das letztendlich in den TCA-Zyklus eingeschleust wird, abgebaut. Ausdifferenzierte Körperzellen nutzen diesen anaplerotischen Weg relativ wenig, in Tumorzellen macht dieser jedoch oft den Hauptanteil im Katabolismus aus (Wise *et al.*, 2008).

Es wird daher im Folgenden die Verstoffwechslung von Glutamin in BMM und J774A.1 im infizierten und uninfizierten Zustand durch die Zugabe von 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Gln}$ miteinander verglichen.

BMM:

In den primären Makrophagen ist Glutamat mit ca. 20% am höchsten markiert, gefolgt von Asp (3-4%), Pro (ca. 0,6%) und Ala (0,14%). Eine Addition von $\text{IFN-}\gamma$ erhöht lediglich die ^{13}C -Excess-Werte von Asp (um den Faktor 1,25) sowohl im uninfizierten als auch im infizierten Zustand (Tabelle 3.7 und Abbildung 3.44, **A**). Dies könnte eine stimulierende Wirkung von $\text{IFN-}\gamma$ auf die OAA-generierenden Schritte des TCA-Zyklus ohne Einfluss auf die Glutaminolyse andeuten. Die Infektion mit *L. monocytogenes* hat keinen signifikanten Effekt auf die Glutaminolyse-Aktivität.

J774A.1:

In den J774A.1-Zellen ist die Glutaminolyse fast doppelt so aktiv wie in den BMM. Die ^{13}C -Einbauraten von Glutamat liegen bei 30-40%, Aspartat ist zu 9-16% markiert und Ala und Pro haben einen ^{13}C -Überschuss von 0,4-0,6%. Auffällig ist bei den J774A.1 der drosselnde Effekt von $\text{IFN-}\gamma$ und Infektion auf die Glutaminolyse-Aktivität. Im uninfizierten Zustand sind sowohl Glutaminolyse als auch OAA-generierende Schritte des TCA-Zyklus verstärkt vorhanden (Tabelle 3.7 und Abbildung 3.44; **B**).

Tabelle 3.7: ^{13}C -Excess-Werte nicht-essentieller, proteinogener Aminosäuren von BMM und J774A.1 mit 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$; Aufgetragen sind Mittelwerte zweier biologischer Replikate (mit S.D.).

BMM	uninfiziert				infiziert mit <i>Lm</i>				infiziert mit UV-abgetöteten <i>Lm</i>			
	ohne IFN- γ		mit IFN- γ		ohne IFN- γ		mit IFN- γ		ohne IFN- γ		mit IFN- γ	
Ala	0,13%	0,02%	0,14%	0,00%	0,14%	0,01%	0,13%	0,02%	0,14%	0,00%	0,14%	0,00%
Asp	3,73%	0,25%	4,66%	0,02%	3,49%	0,25%	4,11%	0,39%	4,13%	0,00%	4,82%	0,17%
Glu	20,36%	0,02%	20,88%	0,13%	19,68%	1,02%	19,93%	0,31%	20,74%	0,24%	21,08%	0,29%
Gly	0,06%	0,04%	0,09%	0,01%	0,07%	0,02%	0,10%	0,05%	0,08%	0,06%	0,13%	0,01%
Pro	0,60%	0,11%	0,57%	0,04%	0,62%	0,07%	0,46%	0,02%	0,60%	0,05%	0,45%	0,00%
Ser	0,21%	0,10%	0,20%	0,06%	0,18%	0,05%	0,18%	0,02%	0,21%	0,01%	0,20%	0,01%
J774	uninfiziert				infiziert mit <i>Lm</i>				infiziert mit UV-abgetöteten <i>Lm</i>			
	ohne IFN- γ		mit IFN- γ		ohne IFN- γ		mit IFN- γ		ohne IFN- γ		mit IFN- γ	
Ala	0,52%	0,09%	0,37%	0,03%	0,43%	0,09%	0,30%	0,05%	0,49%	0,08%	0,38%	0,02%
Asp	15,86%	0,32%	10,87%	0,11%	14,27%	0,95%	8,97%	1,77%	15,41%	0,43%	10,41%	0,47%
Glu	37,18%	1,25%	33,38%	1,32%	33,94%	1,95%	30,44%	3,36%	35,73%	1,39%	32,09%	1,49%
Gly	0,14%	0,01%	0,07%	0,05%	0,10%	0,06%	0,11%	0,01%	0,06%	0,01%	0,11%	0,05%
Pro	0,48%	0,01%	0,29%	0,03%	0,52%	0,16%	0,29%	0,04%	0,46%	0,00%	0,32%	0,06%
Ser	0,14%	0,03%	0,15%	0,06%	0,16%	0,03%	0,12%	0,02%	0,20%	0,03%	0,18%	0,05%

Die Zugabe von IFN- γ drosselt im uninfizierten J774A.1-System neben der Glutaminolyse (um 12%) auch den TCA-Zyklus (Abnahme um 33%) (vergleichend dazu die Aspartat-Werte in Tabelle 3.FF). Eine Infektion mit (UV-abgetöteten und lebenden) *L. monocytogenes* hat keinen signifikanten Effekt auf die ^{13}C -Einbauraten oben genannter AS.

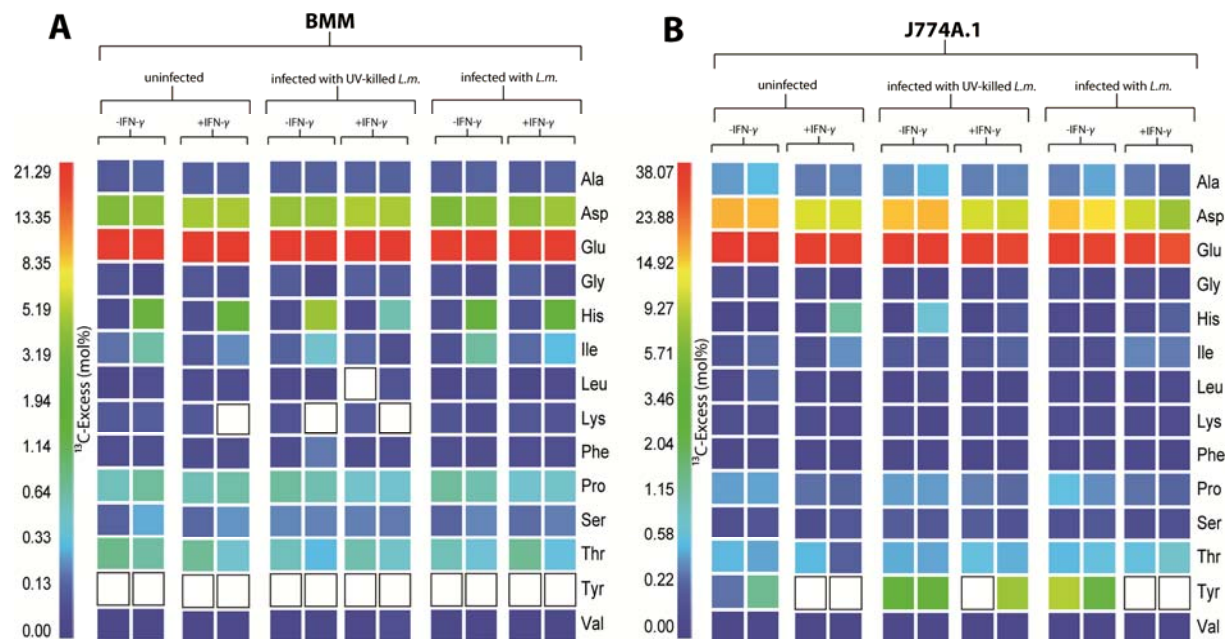


Abbildung 3.44: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von (A) BMM- und (B) J774A.1-Zellen, mit und ohne *L. monocytogenes* und IFN- γ in Anwesenheit von 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Gln}$ inkubiert. Für jedes Experiment gibt es ein unabhängiges biologische Replikate. Die Werte sind in quasi-logarithmischer Form dargestellt. AS mit weißen Kästchen wurden in der Probe nicht detektiert.

3.1.4. ^{13}C -Isotopologprofile von BMM und J774A.1 mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$

BMM:

Besonders auffallend sind die gleichbleibenden Isotopolog-Muster der drei höchstmarkierten *de novo* synthetisierten AS Glu, Asp und Ala in den verschiedenen Versuchsbedingungen (siehe Abbildung 3.HH). Es ist davon auszugehen, dass sowohl die Addition von IFN- γ , als auch die Infektion mit (UV-abgetöteten und lebenden) *L. monocytogenes* die Synthesewege von Glu, Asp und Ala aus der Vorstufe Glutamin nicht beeinflussen.

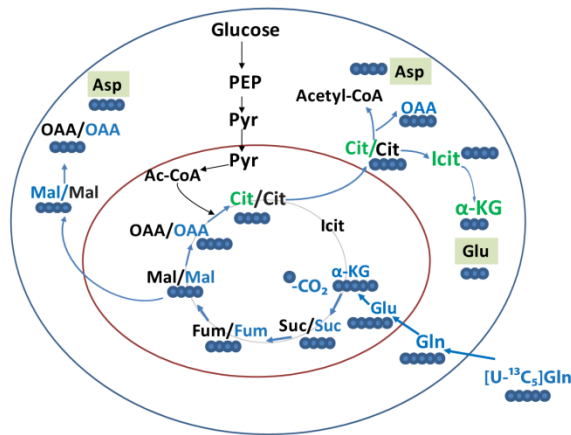
Die Vollmarkierung im *Glutamat* ist eine direkte Folge der Glutaminolyse von $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Glutamin}$. Daneben gibt es aber auch noch einen relativen Anteil an M+3-Isotopologen. Diese 3-fach Markierung entsteht, wenn $^{13}\text{C}_5\text{Glu}$ in $^{13}\text{C}_5\text{-}\alpha\text{-KG}$ in den Mitochondrien umgewandelt wird und letzteres dann in den TCA-Zyklus eingeschleust wird. Bei einer zweiten Runde des TCA-Zyklus wird unmarkiertes Acetyl-CoA auf $^{13}\text{C}_4\text{-OAA}$ übertragen und $^{13}\text{C}_4\text{-Cit}$ entsteht, welches wiederum $^{13}\text{C}_3\text{-Glu}$ ergibt (Abbildung 3.45, Flux1).

Auch bei *Aspartat* ist die Vollmarkierung, die aus dem direkten Eintritt von $^{13}\text{C}_5\text{-}\alpha\text{-KG}$ in den TCA-Zyklus resultiert, die dominante Markierung. Daneben erscheint auch noch ein relativer Anteil an M+2-Isotopologen, der durch die Aktivität des cytosolischen Malic Enzyms und der PDH-Aktivität auftritt. Durch Decarboxylierung von $^{13}\text{C}_3\text{-Pyruvat}$ entsteht $^{13}\text{CO}_2$ und $^{13}\text{C}_2\text{Acetyl-CoA}$. Letzteres wiederum tritt in den TCA-Zyklus ein und wird auf unmarkiertes OAA übertragen. Durch die Isocitratlyase wird $^{13}\text{C}_2\text{-Citrat}$ im Cytosol zu $^{13}\text{C}_2\text{-OAA}$ und Acetyl-CoA abgespalten und bedingt so die 2-fach Markierung in Glutamat und Aspartat.

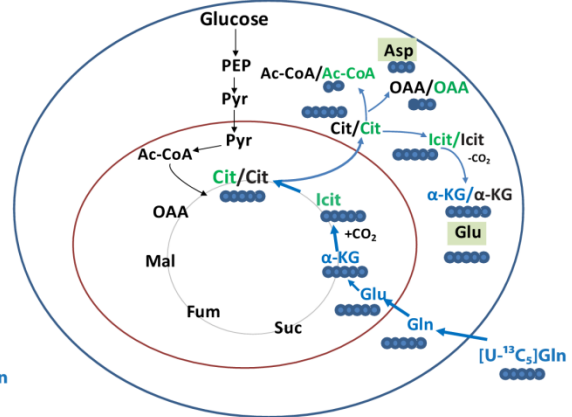
Die 3-fach Markierung im *Alanin* wird hervorgerufen durch die Pyruvat-Carboxylase und PEPCK-Aktivität. Dabei wird $^{13}\text{C}_4\text{-OAA}$ decarboxyliert zu $^{13}\text{C}_3\text{-PEP}$, das wiederum zu $^{13}\text{C}_3\text{-Pyruvat}$ umgewandelt wird. Aus $^{13}\text{C}_3\text{-Pyruvat}$ wird in einem Transaminierungsschritt $^{13}\text{C}_3\text{Ala}$ generiert.

Die glutaminolytische Aktivität der BMM ist, ähnlich wie die glykolytische Aktivität relativ gering. Anders als die Umsetzung von Glucose wird die Glutaminolyse durch eine Infektion mit *L. monocytogenes* nicht aktiviert.

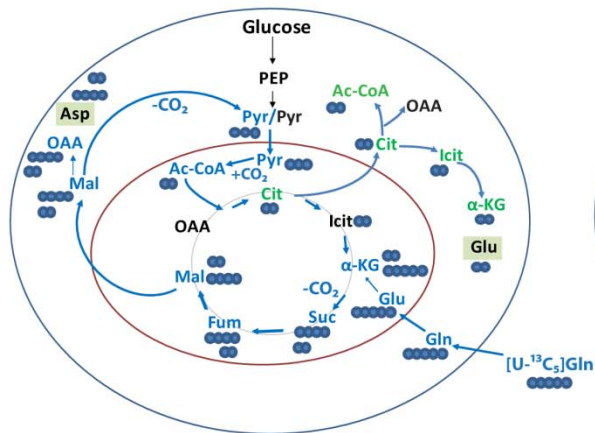
Flux 1 - canonical direction of TCA cycle
(yielding [¹³C₄]-Asp and [¹³C₃]-Glu)



Flux 2 - reverse ICD-2 reaction
(yielding [¹³C₃]-Asp and [¹³C₅]-Glu)



Flux 3 - via cytosolic ME and canonical TCA
(yielding [¹³C₂]-Asp, [¹³C₄]-Asp and [¹³C₂]-Glu)



Flux 4 - via PYC
(yielding [¹³C₁]-Asp and [¹³C₁]-Glu)

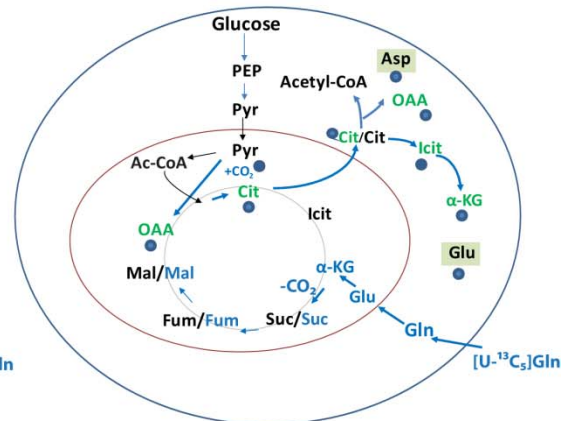


Abbildung 3.45: Stoffflüsse rekonstruiert anhand von ¹³C-Profilen proteinogener AS gewonnen aus BMM und J774A.1 kultiviert mit 2 mM [U-¹³C₅]Glutamin. Blauer Kreis: Zellmembran; Roter Kreis; Mitochondrium; Blaue Punkte: ¹³C-Atome.

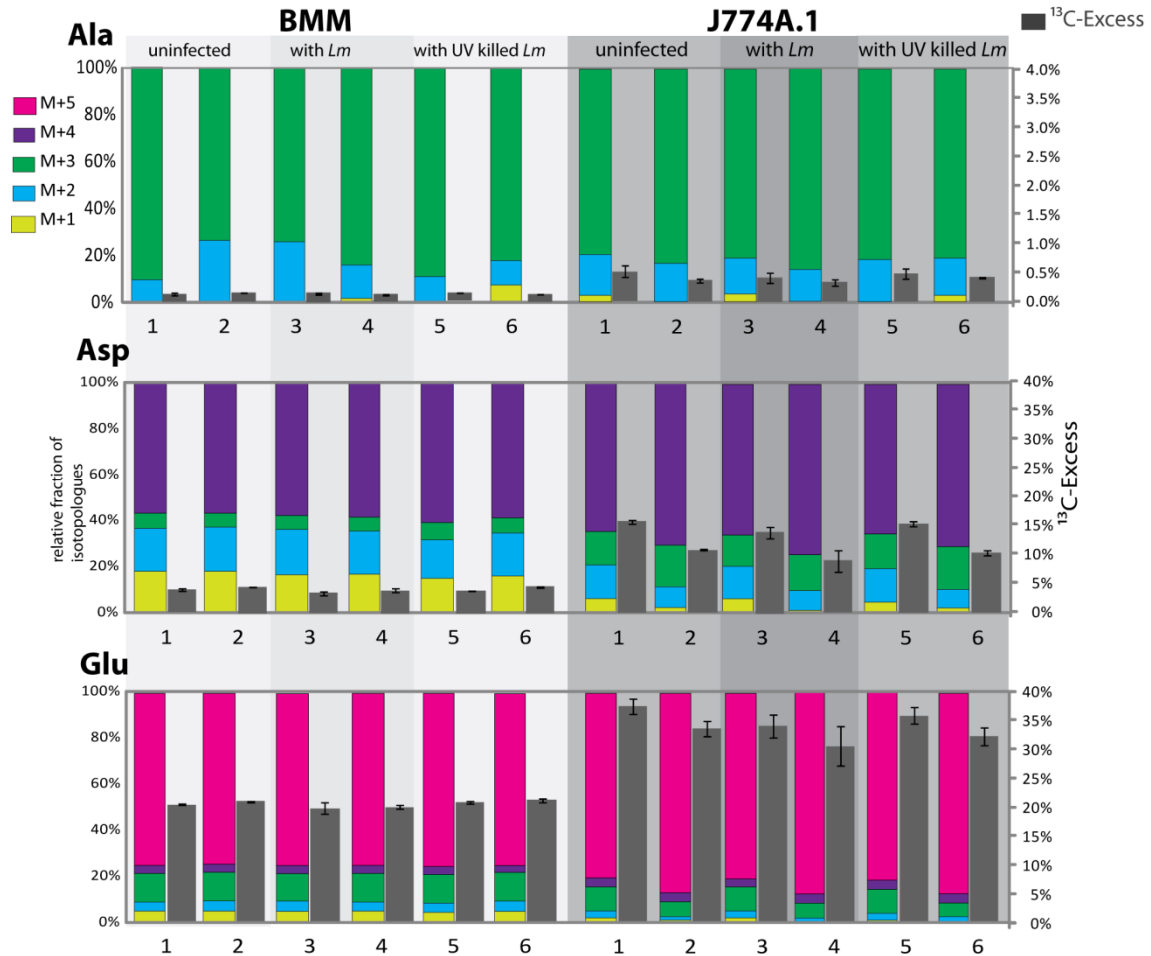


Abbildung 3.46: ^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS aus den Experimenten mit uninfizierten, *Lm*-infizierten und UV-abgetöteten-*Lm*-infizierten BMM und J774A.1 kultiviert mit 2 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_5$]Glutamin. Die Werte sind Mittelwerte aus zwei biologischen Replikaten, Fehlerbalken geben dabei die S.D. an. Ungerade Zahlen sind Experimente ohne IFN- γ , gerade Zahlen sind Experimente mit Zugabe von IFN- γ .

J774A.1:

Die Isotopolog-Muster von Ala, Asp und Glu in den J774A.1-Makrophagen entsprechen denen der BMM-Zellen. Die *de novo* Synthese dieser Aminosäuren aus Glutamin ist somit in J774A.1 wie oben beschrieben. Ebenso wie bei BMM hat eine Infektion mit *L. monocytogenes* keinen Effekt auf die Biosynthesewege von Ala, Asp und Glu.

Anders als bei den primären Makrophagen manifestiert sich jedoch der drosselnde Effekt von IFN- γ nicht nur in den ^{13}C -Inkorporationsraten, sondern auch in der Isotopolog-Verteilung von Asp und Glu. Unter Zugabe von IFN- γ wird eine weiterführende Verstoffwechslung, also ein Recycling im TCA-Zyklus relativ gesehen reduziert. Dies ist durch die prominentere Vollmarkierung beider AS zu erkennen. Dabei entsteht [$^{13}\text{C}_5$]Glutamat direkt aus

[¹³C₅]Glutamin und [¹³C₄]Aspartat aus [¹³C₄]-OAA.

Die Glutaminolyse ist in den J774A.1-Zellen viel aktiver als in den primären Zellen. Zudem hat der Cytokin Aktivator IFN- γ einen drosselnden Effekt sowohl auf die Glutaminolyse an sich als auch auf weiterführende Reaktionen im Glutaminstoffwechsel. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass IFN- γ in den J774A.1-Zellen eine andere Wirkungsweise als in unmodifizierten, primären Zellen entfaltet. Dieses Resultat bestätigt die oben geschilderten Ergebnisse der Glucose-Versuche.

3.1.5. ¹³C-Profil von cytosolischen *L. monocytogenes* kultiviert in BMM und J774A.1

[U-¹³C₆]Glucose-Experimente:

In den intrazellulär replizierenden *Listerien* werden die Aminosäuren Ala, Asp, Thr, Glu, Ser, Tyr, Lys und Gly (in absteigender Reihenfolge) markiert (vergleiche Tabelle 3.8 und Abbildung 3.47; A). Es spielt dabei keine Rolle, ob sie in primären Makrophagen oder in J774A.1-Zellen replizieren. Selbst die ¹³C-Excess-Werte sind ohne Addition von IFN- γ in beiden Infektionssystemen gleich. Vergleichbare Werte lieferten *in vivo* Studien mit J774A.1 (Eylert *et al.*, 2008), so dass man davon ausgehen kann, dass intrazellulären *Listerien* in diesen unterschiedlichen Wirtssystemen ähnliche C-Quellen zur Verfügung stehen. Unter Einfluss von IFN- γ verändern sich die ¹³C-Excess-Werte der listeriellen, proteinogenen AS in den primären Makrophagen nicht, hingegen in den J774A.1-Zellen werden diese um 1/3 reduziert.

Tabelle 3.8: ^{13}C -Excess-Werte proteinogener Aminosäuren von cytosolisch replizierenden *L. monocytogenes* in BMM und J774A.1 mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$; Werte sind um den Faktor des Wirtszellpellets korrigiert.

	BMM infiziert				J774A.1 infiziert			
	ohne IFN- γ I	ohne IFN- γ II	mit IFN- γ I	mit IFN- γ II	ohne IFN- γ I	ohne IFN- γ II	mit IFN- γ I	mit IFN- γ II
Ala	6,66%	9,77%	5,28%	8,18%	10,53%	9,24%	3,53%	3,58%
Asp	4,41%	7,48%	3,29%	7,05%	10,26%	8,64%	3,37%	2,99%
Glu	2,22%	2,53%	1,55%	2,33%	3,20%	2,41%	0,17%	0,00%
Gly	0,46%	0,00%	0,26%	0,33%	0,83%	0,74%	0,23%	0,12%
His	0,12%	0,25%	0,43%	0,18%	0,34%	0,61%	1,04%	0,00%
Ile	0,68%	0,00%	0,42%	0,00%	0,28%	0,00%	0,00%	0,00%
Leu	0,00%	1,99%	0,00%	4,75%	0,40%	0,00%	0,09%	0,00%
Lys	0,49%	0,78%	0,25%	0,58%	1,11%	0,95%	2,48%	0,00%
Phe	0,50%	0,00%	0,44%	0,65%	0,35%	0,00%	2,07%	0,16%
Pro	0,02%	0,39%	0,22%	0,34%	0,22%	0,17%	0,13%	0,00%
Ser	1,32%	2,97%	0,94%	1,81%	3,17%	2,84%	0,49%	0,80%
Thr	2,46%	4,48%	1,40%	3,62%	5,01%	3,93%	1,21%	1,33%
Tyr	0,99%	2,08%	0,73%	1,80%	2,25%	1,95%	1,04%	0,00%
Val	0,13%	0,00%	0,09%	0,28%	0,32%	0,28%	0,68%	0,27%

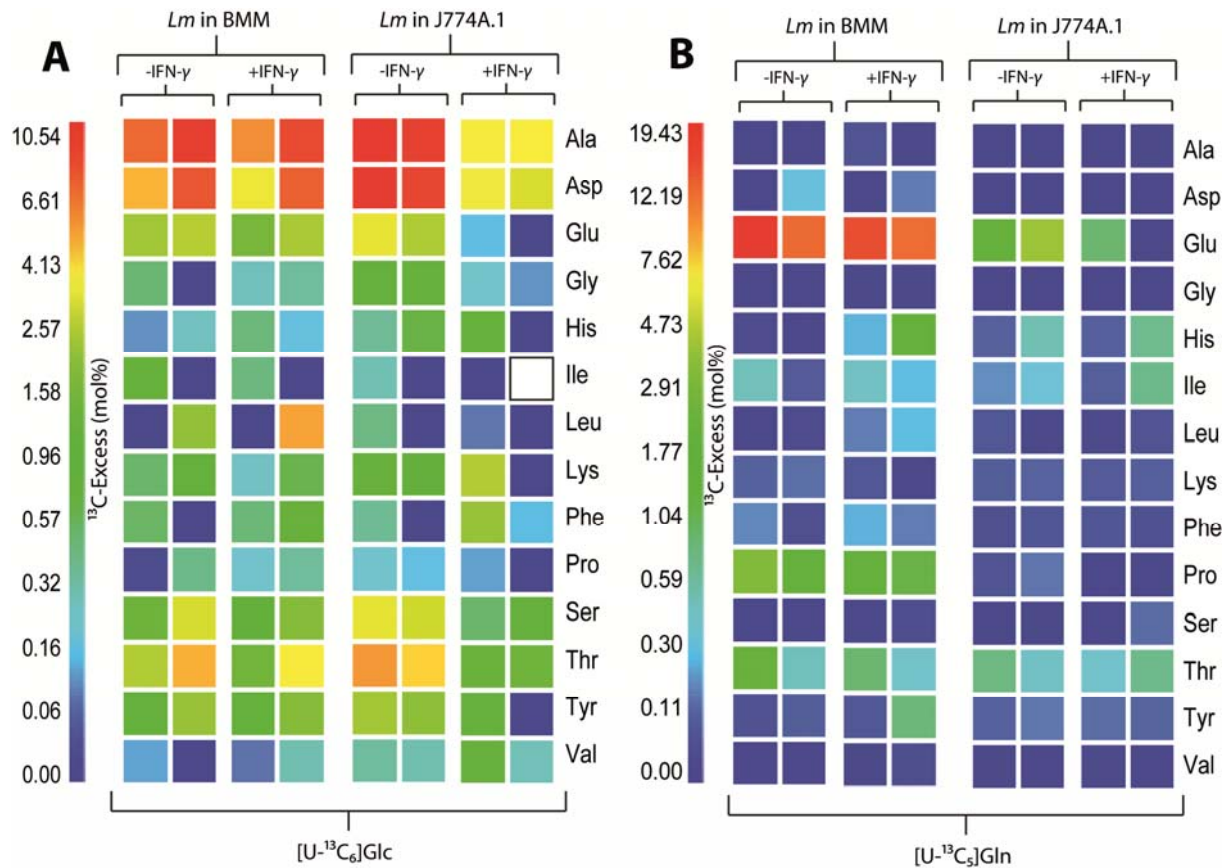


Abbildung 3.47: Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von intrazellulär replizierenden *L. monocytogenes* in BMM und J774A.1-Zellen mit **(A)** 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glc}$ und **(B)** 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]\text{Gln}$. Für jedes Experiment wurde ein unabhängiges biologische Replikat durchgeführt. Die Werte sind in quasi-logarithmischer Form dargestellt, um auch geringe Unterschiede sichtbar zu machen. AS mit weißen Kästchen konnten in der Probe nicht detektiert werden.

Die Isotopologmuster und damit die Art der *de novo*-Synthesewege von Ala, Asp und Glu ist bei *L. monocytogenes* in den zwei Wirtszellensystemen gleich und verändert sich auch nicht bei Zugabe von IFN- γ (siehe Abbildung 3.48). Zudem sind die Isotopolog-Muster signifikant unterschiedlich zu den Wirtszell-Mustern. Dementsprechend werden diese AS von den *Listerien* auf andere Weise synthetisiert als in den Wirtszellen.

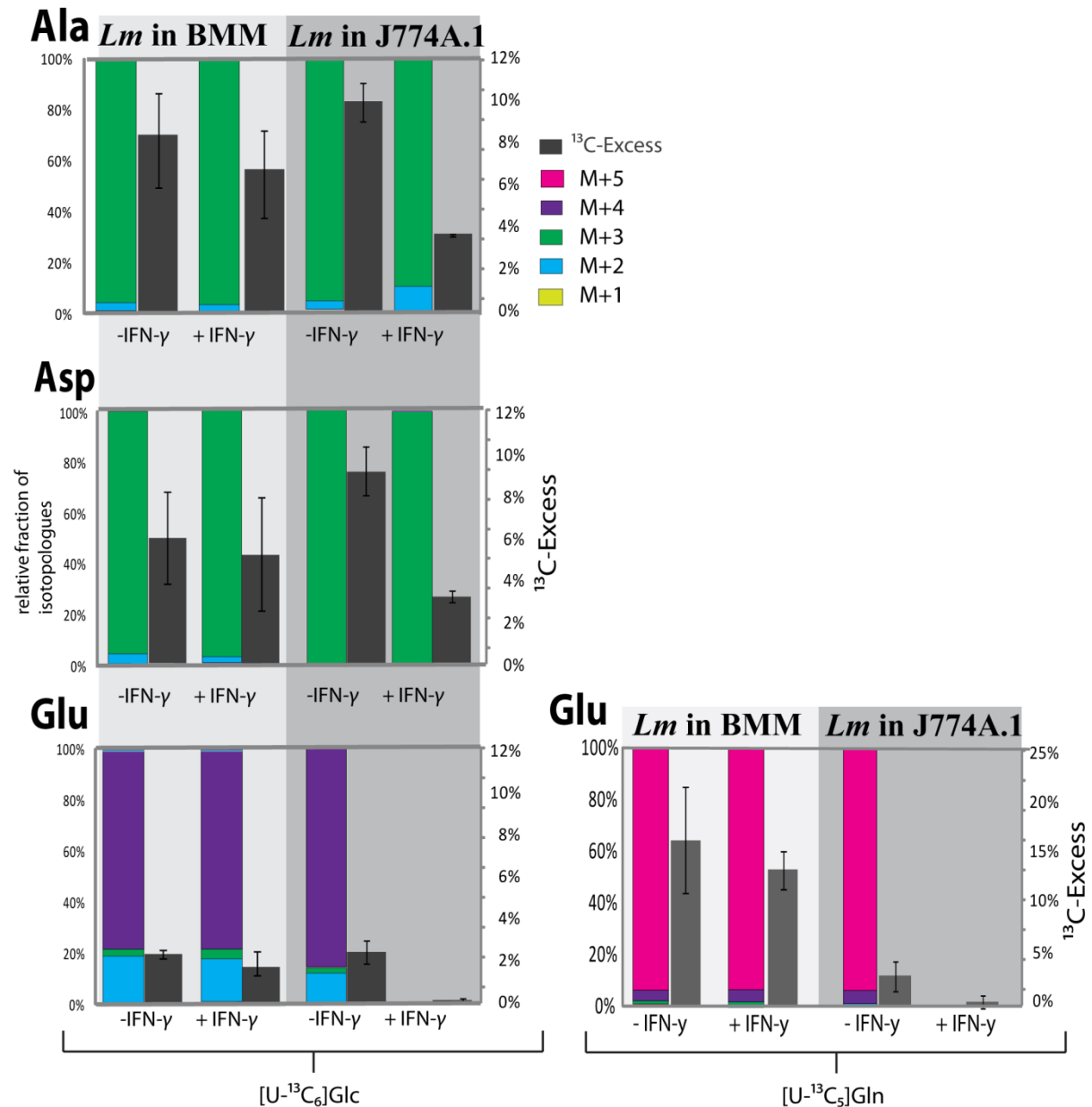


Abbildung 3.48: ^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS von intrazellulär replizierenden *L. monocytogenes* in BMM und J774A.1 kultiviert mit 10 mM $[U-^{13}C_6]Glucose$ und 2 mM $[U-^{13}C_5]Glutamin$. Die Werte sind um den Faktor des Wirtzellpellets (sowohl die ^{13}C - Excess-Werte, als auch die Isotopolog-Werte) korrigiert.

Übereinstimmend mit vorausgehenden Studien intrazellulärer *Listerien* in J774A.1-Zellen (Eylert *et al.*, 2008) ist anzunehmen, dass die markierten Aminosäuren Ala, Asp und Glu weniger aus der Wirtszelle aufgenommen werden, als vielmehr aus Glucose, oder glykolytischen Zwischenstufen entstehen. Alanin ist hauptsächlich vollmarkiert und geht aus $[^{13}C_3]Pyruvat$ hervor, welches wiederum aus $[^{13}C_3]$ -markierten Vorstufen wie $[^{13}C_6]Glc-6-P$ stammt. Aspartat ist fast ausschließlich M+3-markiert. Dies entsteht durch die Pyruvat-Kinase

Aktivität, wobei [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat carboxyliert wird zu [$^{13}\text{C}_3$]OAA. Weiterführend wird auf [$^{13}\text{C}_3$]OAA auch [$^{13}\text{C}_2$]-Acetyl-CoA, das ebenfalls aus [$^{13}\text{C}_3$]Pyruvat entsteht, übertragen. Dadurch entsteht [$^{13}\text{C}_5$]Citrat und weiter [$^{13}\text{C}_4$]- α -KG, welches zu 4-fach markiertem Glutamat wird (vergleiche auch Eylert *et al.*, 2008).

[U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin-Experimente:

Wird dem Infektionssystem 2 mM [U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin zugegeben, so wird in den BMM von listeriellen, proteinogenen Aminosäuren Glutamat (ca. 15%) und Prolin (ca. 2%) markiert (siehe Abbildung 3. 47; **B**). Glutamat ist dabei fast ausschließlich vollmarkiert und stammt direkt aus [U- $^{13}\text{C}_5$]Glutamin. Das ^{13}C -markierte Prolin entsteht direkt aus dem markierten Glutamat. Eine weitere Verstoffwechslung von [$^{13}\text{C}_4$]- α -KG im TCA-Zyklus findet nicht statt, da *Listerien* einen unterbrochenen TCA-Zyklus besitzen und nicht über das Enzym α -KG-Dehydrogenase verfügen (vergleiche Eylert *et al.*, 2008, Fuchs *et al.*, 2012). Somit ist auch die nicht vorhandene ^{13}C -Markierung in Asp und Ala erklärbar.

Anders als in den BMM-intrazellulär replizierenden *Listerien* findet sich in den J774A.1-infizierenden *Listerien* nur eine relativ geringe ^{13}C -Markierung in Glutamat (ca. 3%; ohne IFN- γ). Unter Einfluss von IFN- γ ist die Entstehung der [$^{13}\text{C}_5$]Glu-Markierung sogar nahezu inhibiert (vergleiche dazu Abbildung 3.47; **B** und 3.48).

3.2. Diskussion

Glucose und Glutamin stellen für Säugerzellen die Hauptquellen an Kohlenstoff dar. Deren Verstoffwechslung über die Glykolyse, den PPP-Weg, den TCA-Zyklus und die Glutaminolyse liefert Energie und Bereitstellung von Intermediaten, die wichtig für anabole Prozesse in proliferierenden Zellen sind. Die Ergebnisse des Isotopolog-Profilings von primären Mausmakrophagen und etablierten J774A.1-Makrophagen im Vergleich zeigten eine eindeutig unterschiedliche Effizienz und Regulation des Kohlenstoffmetabolismus in beiden Zelltypen. Die glycolytische und glutaminolytische Aktivität ist in den primären Makrophagen relativ gering, jedoch in den neoplastischen J774A.1-Zellen vergleichsweise hoch (siehe Abbildung 349; **A** und **B**). Die J774A.1-Zelllinie stammt von einem Maustumor ab und exprimiert konstitutiv c-Myc (Fan and Barendsen *et al.*, 1993). Dieser Transkriptionsfaktor induziert die Expression von Genen für die Glucosetransporter GLUT1, mehrere glycolytische Enzyme und die Lactat-Dehydrogenase (LDH-A) (Osthus *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004; Dang and Lee *et al.*, 2009). Gleichzeitig wird durch Myc auch das

transkriptionelle Programm für die Glutaminolyse, durch verstärkte Expression von Glutamin-Transportern und mitochondrialer Glutaminase (GLS) hochreguliert (Wise *et al.*, 2008).

BMM:

Aus den ^{13}C -Einbauraten und ^{13}C -Isotopolog-Profilen der am höchsten markierten Aminosäuren Ala, Glu und Asp geht hervor, dass die primären Makrophagen durch eine Infektion mit lebenden *L. monocytogenes* und in geringerem Ausmaß auch durch IFN- γ und UV-abgetötete *L. monocytogenes* in ihrem Metabolismus aktiviert werden. Diese Induktion des Stoffwechsels basiert hauptsächlich auf der Hochregulierung der Glycolyse (siehe Abbildung 3. 49; **A, rote Pfeile**) unter allen drei Bedingungen. Die glutaminolytische Aktivität bleibt allerdings davon unbeeinflusst. Die stimulierende Eigenschaft von IFN- γ wird vermutlich verursacht durch die verstärkte Expression von induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS oder NOS2) (DeStefano and Maiuri *et al.*, 2006; Jarasch and Martin *et al.*, 2005). Ein erhöhter intrazellulärer NO-Anteil führt zu einer verstärkten Glucose-Aufnahme und -Verstoffwechslung in Makrophagen und anderen Zellen (Mateo and Reichner *et al.*, 1995). Eine vergleichbare Induktion von iNOS wird hervorgerufen durch Oberflächenproteine von lebenden und UV-abgetöteten Bakterien durch die PAMP-induzierte NF- κ B Aktivierung. Dies kann die leichte Aktivierung der Glycolyse in den Experimenten mit UV-abgetöteten *L. monocytogenes* erklären. Eine Infektion mit lebenden *L. monocytogenes* erfordert jedoch nicht nur die erfolgreiche Aufnahme der *Listerien* in die Zelle sondern auch die Freisetzung ins Cytosol, welche vermutlich unter anderem die stärkere Aktivierung der Glycolyse verursacht.

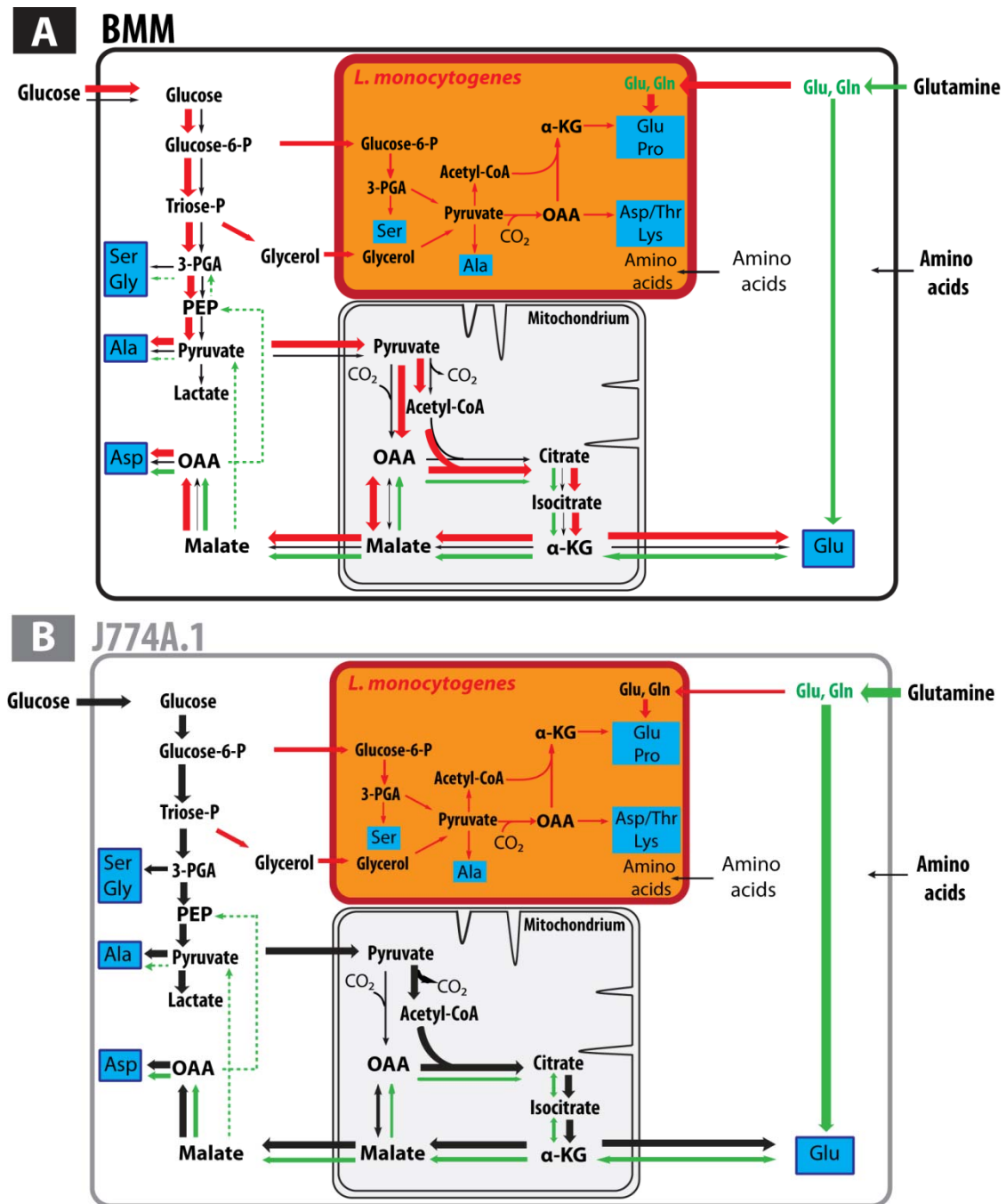


Abbildung 3.49: Stoffwechselraten in (A) BMM und (B) J774A.1-Zellen kultiviert mit 10 mM [U-¹³C₆]Glucose und 2 mM [U-¹³C₅]Glutamin mit (rote Pfeile in BMM) und ohne (schwarze Pfeile in BMM) Infektion durch *L. monocytogenes*.

Des Weiteren könnte der verstärkte glycolytische Metabolismus der BMM-Zellen durch eine HIF-1 Aktivierung (Stabilisierung der HIF-1α-Untereinheit) hervorgerufen werden. Dieser Einfluss von HIF-1 konnte bereits oft in Infektionsstudien mit extra- und intrazellulären pathogenen Bakterien beobachtet werden. Gleichzeitig inhibiert jedoch aktives HIF-1 die PDH-Aktivität, durch Hochregulation der PDH-Kinase. Dies führt wiederum zu einem verminderten Stofffluss in den TCA-Zyklus. Eine Reduzierung der zellulären Konzentration

an aktivem p53 induziert die Glycolyse ohne Einfluss auf den TCA-Zyklus. Die erhöhten *de novo*-Syntheseraten von Glutamat und Aspartat von BMM im infizierten Zustand erfordern jedoch eine verstärkte Pyruvat Dehydrogenase-, Pyruvat Carboxylase-, Citrat Synthase-, Isocitrat Dehydrogenase- (IDH1 und IDH2) und ATP-abhängige Citrat Lyase- (und Malic Enzym)-Aktivität (siehe Abbildung 3. 49; **A**, rote Pfeile). Gerade der Hauptanteil an [¹³C₂]-Glu in den [U-¹³C₆]Glucose-Experimenten beweist die erhöhte Aktivität der PDH (Abbildung 3.KK; C). Eine spannende Frage bleibt weiterhin, welcher Wirtszell-Regulator während der Infektion mit *L. monocytogenes* für die Aktivierung des Kohlenstoffmetabolismus verantwortlich ist und welcher listerielle Virulenzfaktor dieses auslöst.

J774A.1:

Der Kohlenstoffmetabolismus der etablierten J774A.1-Zellen zeigt bereits im uninfizierten Zustand die erwartete erhöhte, Myc-induzierte glykolytische und glutaminolytische Aktivität (Abbildung 3. 49; **B**). Die fast doppelt so hohe Glutaminolyse könnte in J774A.1 eine anaplerotische Funktion erfüllen, da in Tumorzellen ein reduktiver TCA-Zyklus, ausgehend von α -KG zu Citrat (durch mitochondriale IDH2 katalysiert) ablaufen kann (Holleran *et al.*, 1995). Diese Citrat-auffüllende Reaktion scheint HIF-1 reguliert zu sein (Wise and Ward *et al.*, 2011). Der Metabolismus von J774A.1 wird, im Gegensatz zu den primären Makrophagen, nicht durch die Infektion mit (lebenden, oder UV-abgetöteten) *L. monocytogenes* signifikant verändert (Abbildung 3. 49; **B**). Zusätzlich entfaltet der cytokine Aktivator IFN- γ in den J774A.1-Zellen eine signifikant andere Wirkung als in den BMM. Unter Zugabe von IFN- γ wird die glykolytische Aktivität um ein Drittel herabgesetzt. Dies ist ersichtlich durch einen verminderten ¹³C-Überschuss in Ala, Asp und Glu bei den [U-¹³C₆]Glucose Versuchen. In den J774A.1-Zellen ist die Glutaminolyse fast doppelt so aktiv, wie in den BMM. Auffällig ist der hemmende Effekt von IFN- γ und Infektion auf die Glutaminolyse-Aktivität. Im uninfizierten Zustand sind sowohl Glutaminolyse als auch OAA-generierende Schritte des TCA-Zyklus verstärkt vorhanden. Allerdings setzt die Zugabe von IFN- γ im uninfizierten J774A.1-System neben der Glutaminolyse an sich (um 12%) auch den TCA-Zyklus (Abnahme um 33%) herab. Dies kann an der vermehrten Produktion von ROS (siehe oben), gefolgt von einer reduzierten Zellvitalität liegen. Da die Infektion von *L. monocytogenes* keinen Metabolismus-modulierenden Effekt auf die etablierten Tumor-stämmigen Makrophagen hat, lässt sich vermuten, dass der hochregulierte, entartete

Stoffwechsel der J774A.1-Zellen bereits alle nötigen Intermediate und Metabolite für eine erfolgreiche intrazelluläre Replikation von *L. monocytogenes* bereitstellt und es keiner weiteren Aktivierung mehr bedarf. Weitergehend könnte es aber auch sein, dass die Virulenzfaktoren von *Listeria* an den Knotenpunkten im Wirtszellmetabolismus angreifen, die durch die Tumorgenese bereits in den Krebszellen modifiziert sind. Somit ist der modulierende Einfluss von *Listeria*-Virulenzfaktoren auf den Wirtszellmetabolismus in Studien mit etablierten Zelllinien maskiert. Weiterhin bleibt abzuklären, welcher listerielle Virulenzfaktor mit dem Wirtszellstoffwechsel interagiert.

L. monocytogenes:

Interessanterweise ist der intrazelluläre Kohlenstoffmetabolismus von *L. monocytogenes* in primären Makrophagen sehr ähnlich zu jenem in J774A.1-Zellen (ohne IFN- γ). Nicht nur Ala, Asp und Glu, sondern auch Ser, Gly, Pro, Thr und Lys werden ^{13}C -markiert und damit aus ^{13}C -tragenden Vorstufen *de novo* synthetisiert (Abbildung 3.49). So liegt es nahe, dass die intrazellulären Listerien die relativ geringe Aminosäurekonzentration im Cytosol wahrnehmen anders als die Wirtszellen, die aus dem Medium die unmarkierten AS aufnehmen und in Wirtszellprotein inkorporieren, diese selbst produzieren. Wie durch vorausgehende Studien mit J774A.1-Zellen bekannt ist, bevorzugen intrazelluläre *L. monocytogenes* Glycerol und Glucose-6-Phosphat als cytosolisch verfügbare C-Quellen (Eylert *et al.*, 2008). Die Verfügbarkeit dieser Intermediate ist allein abhängig von der glycolytischen Aktivität und nicht von der Glutaminolyse. Die Zugänglichkeit glykolytischer Intermediate für *L. monocytogenes* im Cytosol von J774A.1 scheint unter Einfluss von IFN- γ herabgesetzt zu sein (siehe Abbildung 3.47; A). Einhergehend wird die Glycolyse durch IFN- γ in den etablierten Zellen gedrosselt. Die Daten der Glutamin-Versuche deuten an, dass intrazelluläre Listerien unabhängig von der Glutaminolyse des Wirts sind. Weder beeinflussen sie bei Infektion die glutaminolytische Aktivität des Wirts, noch findet ein signifikanter Umbau und Verstoffwechslung von ^{13}C aus Glutamin statt. Dies liegt vermutlich daran, dass Listerien einen unvollständigen TCA-Zyklus aufweisen und keine α -KG-Dehydrogenase besitzen. Die BMM (und J774A.1 ohne IFN- γ) infizierenden Listerien weisen lediglich einen signifikanten ^{13}C -Überschuss in Glu und weiterführend in Pro auf, welches direkt aus Glutamin stammt. Unter IFN- γ Zugabe im J774A.1-Infektionssystem kommt es sogar zur kompletten Inhibierung der ^{13}C -Markierung aus exogenem Glutamin. So ist zu vermuten, dass der Zugriff auf das cytosolische Glutamin (und dessen Abbauprodukte) durch den Einfluss von IFN- γ für Listerien in den Tumorzellen komplett blockiert ist.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass *L. monocytogenes* in der Lage ist, sowohl den eigenen Metabolismus (Eisenreich *et al.*, 2006; Eylert *et al.*, 2008) als auch den Wirtszellmetabolismus (zumindest von primären, phagozytischen Zellen) unter Ausprägung von Virulenzfaktoren zum eigenen Vorteil zu modifizieren (Abbildung 3.49, A). Diese Modifikation resultiert *a priori* in einem deregulierten Kohlenhydratstoffwechsel, ähnlich jenem von Tumorzellen.

IV. ZUSAMMENFASSUNG

Durch die universell einsetzbare Methode des "Isotopolog-Profilings" konnten wichtige Schnittstellen zwischen aktiven Stoffwechselwegen und Virulenzfaktoren der fakultativ intrazellulären Pathogene *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* und *Legionella pneumophila* unter medizinisch relevanten Bedingungen aufgedeckt werden. Dabei kamen als bioanalytische Methoden sowohl NMR-Spektroskopie als auch GC/MS-Analytik zum Einsatz.

Durch den Einsatz verschiedener ^{13}C -markierter Substrate konnten neue Erkenntnisse über die Physiologie von *Yersinia enterocolitica* gewonnen werden. Im Speziellen konnte durch Einsatz von $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ die wichtige Rolle der Phosphoenolpyruvatcarboxylase (PEPC) in der $^{13}\text{CO}_2$ -Fixierung unter anaerobischen Bedingungen bestätigt werden. Daneben konnte ein paralleler $^{13}\text{CO}_2$ -fixierender Schritt im C1-Metabolismus aufgedeckt werden, welcher vermutlich durch die Glycinsynthase Aktivität gesteuert wird und zu einfach markiertem Glycin führt. Die Beobachtung, dass Glutamin die Hauptkohlenstoff- und damit vermutlich auch Hauptstickstoffquelle zur Synthese der Effektorproteine (YOPS) ist, deckt eine wichtige Schnittstelle zwischen Metabolismus und Virulenz in *Yersinia* auf. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass beide YscM-Gene Einfluss auf die ^{13}C -Einbauraten in das zelluläre Protein haben. Dies führt zur Annahme, dass beide Genprodukte stimulierende Effekte auf die Glutaminolyse, bzw. die Aufnahme von exogenem Glutamin in das Zellprotein haben. Denkbar sind daher antiyersinielle Wirkstoffe, die eine Aufnahme von Glutamin in *Yersinia* blockieren und somit die massive YOPS-Synthese im virulenten Stadium hemmen könnten.

Die Betrachtung der ^{13}C -Isotopolog- und Metabolit-Profile von *Legionella pneumophila* und *Legionella oakridgensis* führten zu zahlreichen neuen Erkenntnissen im Stoffwechselnetzwerk beider Umweltpathogene. Anhand einer Deletionsmutante des Entner-Doudoroff-(ED)-Wegs (Δzwf) und dem Einsatz von $[1,2-^{13}\text{C}_2]$ Glucose konnte der ED-Weg als Hauptabbauweg von Glucose in *L. pneumophila* identifiziert werden. Die glykolytische Aktivität ist im geringen Ausmaß (zehnfach geringer aktiv als ED-Weg) vorhanden, kann jedoch einen fehlenden ED-Weg nicht kompensieren. So ist ein aktiver ED-Weg essentiell für die Fitness von *L. pneumophila*. Bereits bekannt ist, dass *Legionella* während der intrazellulären Replikation das Proteasom der Wirtszelle rekrutiert und aktiv Aminosäuren als Kohlenstoffquelle nutzt. Anhand wachstumsphasenaufgelöster Studien konnte erstmals eine metabolische Anpassung von *Legionella* an den biphasischen Lebenszyklus nachgewiesen werden. Dabei spielen vor allem in den frühen Phasen der Replikation Aminosäuren eine bedeutende Rolle zur *de novo*-Biosynthese von Proteinen und Polyhydroxybutyrat (PHB). In den späteren Wachstumsphasen am Übergang in das transmissive Stadium spielt verstärkt auch Glucose eine Rolle im Kohlenstoffmetabolismus von *Legionella*. Somit konnte eindeutig eine Interaktion zwischen Metabolismus und Virulenzausprägung festgestellt werden. Die wachstumsphasenabhängige Nutzung

der Kohlenstoffquellen ist auch in der Produktion des Speicherstoffs PHB wiederzufinden. Denkbar wäre daher eine verstärkte Synthese von PHB aus der freien Glucose im Cytosol des Wirtes nachdem *Legionella* die Replikationsvakuole verlassen hat. Die Verwertung von Glucose als Kohlenstoffquelle ist demnach in *L. pneumophila* eng verbunden mit der biphasischen Lebensweise. Es findet sogar eine Spaltung von Stärke durch die Eukaryoten-ähnliche Glukoamylase A statt. Die Kohlenstoffatome der so gewonnenen Glucosemoleküle finden sich dann in der Lipidfraktion (beispielsweise PHB) wieder. Mit der Produktion von PHB hat *L. pneumophila* vermutlich zwei wichtige Prozesse vereint. Zum einen dient das gespeicherte PHB in nährstoffarmer, abiotischer Umgebung als Kohlenstoff- und Energiequelle. Zum anderen scheint die Rückgewinnung an Reduktionsäquivalenten und die Vermeidung eines Überschusses an Acetyl-CoA/Acetoacetyl-CoA eine wichtige Funktion zur Aufrechterhaltung des Stoffwechselnetzwerks zu haben. Dies zeigt sich vor allem im Phänotyp einer β -Ketothiolase-Deletionsmutante, in welcher vermehrt PHB produziert wird, obwohl die Synthese aus Acetyl-CoA vermindert ist. Erste Experimente weisen darauf hin, dass dabei keine Vernetzung der β -Oxidation von Fettsäuren mit der PHB-Synthese auf der Stufe von Crotonyl-CoA, bzw. D- β -Hydroxybutyryl-CoA vorhanden ist, sondern in *Legionella* ein alternativer Weg zum Aufbau von PHB existiert. Dies könnte vermutlich über einen Seitenweg im Methylcitratzyklus mit Glutamat oder Threonin als Vorstufen geschehen. Isotopolog- und Metabolit-Profile von Deletionsmutanten in der Flagellenbiosynthese ($\Delta rpoN$ und $\Delta fleQ$) zeigen die Tendenz zu einem transmissiven Stoffwechselphänotyp. Demzufolge könnten beide Gene in der replikativen Phase aktiv regulierend im Metabolismus von *L. pneumophila* wirken. Dies würde mit bereits bekannten Transkriptomdaten korrelieren.

Die ^{13}C -Isotopologprofile von *L. oakridgensis* belegen die fehlende Fähigkeit Glucose als Kohlenstoffquelle nutzen zu können. Dementsprechend findet im Vergleich zu *L. pneumophila* eine verstärkte Verwendung von Serin zur *de novo* Biosynthese von proteinogenen Aminosäuren und PHB statt. Vorläufige Ergebnisse deuten daraufhin, dass *L. oakridgensis* eine natürliche Deletion in *rpoN* in sich trägt. Insbesondere ist das Metabolit-Profil von *L. oakridgensis* sehr ähnlich zu jenem der *rpoN*-Deletionsmutante und würde diese Theorie somit stützen.

In Infektionsstudien mit *Acanthamoeba castellanii* konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* zur intrazellulären Replikation vor allem Aminosäuren als Kohlenstoff- und Energiequellen nutzt. Für *L. pneumophila* ist zur erfolgreichen Vermehrung in der Vakuole ein intakter Citratzyklus essentiell. Dies ist besonders in den Unterschieden der ^{13}C -Profile von *Legionella* und *Acanthamoeba* bei Aspartat und Glutamat zu sehen. Erniedrigte ^{13}C -Überschussraten in Aspartat und Glutamat von Legionellen werden vermutlich verursacht durch eine Verstoffwechslung von unmarkierten ketogenen Amöben-Aminosäuren.

Über die metabolische Antwort von Organismen auf eine Infektion durch intrazelluläre Bakterien ist

bisher wenig bekannt. Dies liegt vor allem daran, dass in vielen Infektionsstudien bisher nur transformierte Zelllinien als Modellsysteme Verwendung finden, aber keine primären Zellen, die bei einer Infektionskrankheit, wie z.B. Listeriose, tatsächlich befallen werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der Kohlenstoffmetabolismus von primären Zellen, hier von primären Mausmakrophagen näher unter die Lupe genommen, insbesondere um deren metabolische Anpassung an eine Infektion mit *L. monocytogenes* im Vergleich mit einer transformierten, neoplastischen Zelllinie, hier von J774A.1 Zellen zu nachzuweisen. Dazu wurde während der Infektion das Medium mit [U-¹³C₆]Glucose oder [U-¹³C₅]Glutamin supplementiert. Anhand der ¹³C-Profile der proteinständigen Aminosäuren sowohl von beiden Wirtszellen, als auch von den intrazellulär replizierenden *L. monocytogenes* wurden die aktiven Stoffwechselwege identifiziert und quantifiziert. In den primären Makrophagen induzierte die Infektion mit lebenden *L. monocytogenes* die glykolytische Aktivität und verursachte einen verstärkten Fluss von Pyruvat in den Citratzyklus durch eine erhöhte Pyruvatdehydrogenase- und Pyruvatcarboxylase-Aktivität. Im Gegensatz dazu war die glykolytische Aktivität in den uninfizierten J444A.1 Zellen bereits sehr hoch. Dies veränderte sich auch in den infizierten J774A.1 Zellen nicht. Bemerkenswerterweise war der beobachtete Kohlenstoffmetabolismus in *Listeria* in beiden Zellsystemen ähnlich. Vermutlich ist eine erfolgreiche intracytosolische Replikation von *Listeria* damit hauptsächlich abhängig von der glykolytischen Aktivität ihrer Wirtszellen.

In einer Gesamtsicht der hier präsentierten Ergebnisse aus den Studien mit unterschiedlichen pathogenen Bakterien und unterschiedlichen Wirtszellen wird die enorme Vielfältigkeit von Mechanismen zur Anpassung von Mikroorganismen an die jeweiligen Wirtsorganismen deutlich. Die hier erzielten Befunde belegen, dass in diesem Wechselspiel mehr als bisher gedacht Vorgänge beteiligt sind, die direkt zentrale Stoffwechselforgänge im Pathogen, aber auch im Wirt steuern.

V. SUMMARY

Important interfaces between active pathways and virulence factors in *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* and *Legionella pneumophila* have been disclosed via the universally applicable method of ^{13}C –Isotopologue-profiling under medically relevant conditions.

By using several different ^{13}C -labelled substrates as precursors for amino acids derived from protein further aspects of *Yersinia enterocolitica*'s physiology have been disclosed. The use of $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ as substrate enabled us to prove once more the important role of Phosphoenolpyruvate carboxylase in $^{13}\text{CO}_2$ fixation under anaplerotic conditions. In addition to PEPC an alternative way of $^{13}\text{CO}_2$ fixation has been observed as a part of C1 metabolism which results in uniformly labelled glycine and which is conceivably closely connected with glycine synthase activity. The fact that glutamine seems to be the main carbon and therefore probably also the main nitrogen source for the synthesis of *Yersinia* outer proteins (YOPS) enforces the conclusion that it is an important point of interaction between *Yersinia*'s metabolism and virulence. Furthermore, both YscM genes seem to have a particular influence on the rate of incorporation of ^{13}C into cellular protein. Thus it may reasonably be supposed that both genes have a stimulating influence on glutaminolysis, i.e. the resorption of exogenous glutamine with the simultaneous input/introduction of carbon into cellular protein. It seems therefore justified to suggest that further research into active agents against *Yersinia* may focus on possibilities of blocking its resorption of glutamine which may very likely result in inhibiting the massive synthesis of YOPS during *Yersinia*'s virulent stage.

Legionella pneumophila's as well as *Legionella oakridgensis*' ^{13}C isotopologue and metabolite profiles led to a significant number of new discoveries regarding the metabolic flux systems of these environmental pathogens:

By means of a mutant strain of the Entner-Doudoroff pathway (Δzwf) which lacks in glucose-6-phosphate-dehydrogenase as well as $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glucose}$ this pathway has most likely been singled out as the predominant pathway for the catabolism of glucose in *L. pneumophila*. A minimal level of glycolytic activity can be perceived (at a tenfold lower degree than activity along the Entner-Doudoroff pathway), however, it is in no way near sufficient to be able compensate for a lacking Entner-Doudoroff pathway. An active and functioning Entner-Doudoroff pathway can therefore be seen as an essential prerequisite for the fitness of *L. pneumophila*. It is already well known that, during intracellular reproduction,

L. pneumophila recruits the host cell's proteasome and actively uses amino acids as its main carbon source. Growth dependent experiments have recently been able to demonstrate that *Legionella* adjust its metabolism to the biphasic lifecycle. Especially during the early stages of replication amino acids are essential for the *de novo* biosynthesis of protein and PHB. When entering the transmissive stage *Legionella*'s carbon metabolism tends to depend on glucose in an increasing degree. Thus a strong correlation can be said to exist between *Legionella*'s metabolism and its expression of pathogenic factors. The production of PHB in *Legionella* displays a pattern of usage regarding its carbon sources which is again related to *Legionella*'s stages of growth. Thus it seems reasonable to assume that *Legionella*'s synthesis of PHB from the host cell's glucose in the cytosol will increase after the vacuole has been left. The importance of *Legionella*'s utilisation of glucose as a carbon source can therefore hardly be underestimated. This study has been able to show that a natural glucose polymere such as starch is degraded via glycoamylase A. The carbon atoms of the resulting glucose molecules are then to be found incorporated into the lipid fraction PHB. It is to be assumed that *L. pneumophila* manages to combine the two following important processes by the production of PHB. Not only does this endogenous storage polymer enable *L. pneumophila* to survive even in an abiotic low-nutrient environment but the recycling of reducing equivalents as well as the steady state of Acetyl-CoA/Acetoacetyl-CoA does also seem to play an important role in maintaining *L. pneumophila*'s metabolic network. The metabolism of a phenotype of a β -ketothiolase mutant strain is a particularly suitable to demonstrate the interrelatedness of these processes. The sharply reduced production of PHB from Acetyl-CoA in this particular strain does paradoxically seem to be compensated with a massive synthesis of PHB from various prestages. First results indicate that there is no relevant connection between the β -oxidation of fatty and the synthesis of PHB from Crotonyl-CoA and/or D- β -Hydroxybutyryl-CoA. Rather, *Legionella* seems to possess an alternative way of PHB generation. This way may very well be one of the bypaths of the methylcitrate pathway, or usage of glutamate and threonine as precursors.

The isotopologue as well as metabolite profiles of two deletion mutant strains in flagellar biosynthesis (RpoN/FleQ) exhibit tendencies towards a transmissive phenotype metabolism. Thus, both genes are most likely involved in the regulation of *Legionella*'s metabolism during its replicative stage. This claim does also coincide with already published transcriptome data.

The ^{13}C Isotopologue profiles of *L. oakridgensis* indicate its inability to use glucose as a carbon substrate. Thus, *L. oakridgensis* has to make use of serine for its *de novo* biosynthesis of protein derived amino acids and PHB to a significantly higher degree than *L. pneumophila*. Preliminary results even indicate that *L. oakridgensis* carries a natural deletion in *RpoN*. This seems to be further confirmed by the remarkable similarities between the metabolite profiles of *L. oakridgensis* and the *L. pneumophila rpoN* mutant strain.

Infection studies with *Acanthamoeba castellanii* have shown that *L. pneumophila* predominantly relies on amino acids as carbon substrate and energy source for intracellular replication. *L. pneumophila*, however, depends on an intact TCA-cycle for successful intracellular replication. The differences between the ^{13}C -profiles of *Legionella* and *Acanthamoeba* regarding aspartate and glutamate illustrate this particularly well. These differences may be supposed to originate in the metabolisation of protein-derived amino acids derived from amoebae protein.

Relatively little is known about the metabolic response of host cells to bacterial infections. This is largely due to the fact that, to date, the majority of infection studies chose to refrain from the use of primary host cells. This study, however, has compared the carbon metabolism of primary mouse macrophages under the influence of an infection with *L. monocytogenes* to the carbon metabolism of established J774A.1 cells with ^{13}C labelled glucose or glutamine as a carbon source in both cases. The ^{13}C -profiles of protein derived amino acids from labelled host cells as well as from the intracellular replicating *L. monocytogenes* were then used to identify and quantify active metabolic pathways. Live *L. monocytogenes*, infecting primary cells, induced a raised level of glycolytic activity as well as a raised flux of pyruvate into the TCA cycle via pyruvate dehydrogenase and pyruvate carboxylase in the host cells. No significant change was perceived in uninfected J774A.1 cells where glycolytic activity stayed on a constantly high level. The ^{13}C -profiles of amino acids from intracellular *L. monocytogenes* were similar regardless whether the bacteria replicated in BMM or J774A.1 cells. The data shows that *L. monocytogenes* infection adjusts the metabolism of BMM cells by activating glycolysis and the TCA cycle, but not glutaminolysis, to similar levels that are already present in uninfected J774A.1 cells. The results provide direct evidence that the carbon metabolism of intracellular *L. monocytogenes* mainly depends on the glycolytic activity of the host cell which can be triggered by the bacteria if required.

By means of the variety of results we demonstrate the enormous diversity of microbial adaptation to host cells. These results provide direct evidence that the interplay between pathogens and host cells affects more processes than expected concerning central metabolic pathways in the bacteria as well as in host cells.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abd, H.; Johansson, T.; Golovliov, I.; Sandstrom, G.; Forsman, M.** (2003): Survival and Growth of *Francisella tularensis* in *Acanthamoeba castellanii*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 69 (1), S. 600–606.
- Abu Kwaik, Y.** (1996): The Phagosome Containing *Legionella pneumophila* within the Protozoan *Hartmannella vermiformis* Is Surrounded by the Rough Endoplasmatic Reticulum. In: *Applied And Environmental Microbiology* 62 (2), S. 2022–2028.
- Achtman, M.** (1999): *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24), S. 14043–14048.
- Adam, P.; Gütlich, M.; Oschkinat, H.; Bacher, A.; Eisenreich, W.** (2005): Studies of interdemiary metabolism in cultured cells of the insect *Spodoptera frugiperda* using ¹³C- or ¹⁵N-labelled traces. In: *BioMed. Central Biochemistry* 6 (24).
- Aderem, A.; Ulevitch, R. J.** (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. In: *Nature Reviews* 406, S. 782–787.
- Adkins, I. M.; Koeberle, S.; Grobner, S.; Bohn, E.; Autenrieth, I. B.; Borgmann, S.; Autenrieth S.B.** (2008): *Y. enterocolitica* inhibits antigen degradation in dendritic cells. In: *Microbes and Infection* 10, S. 798–806.
- Aepfelbacher, M.; Heesemann, J.** (2005): Modulation of Rho GTPases and the actin cytoskeleton by YopT of *Yersinia*. In: *Curr Top Microbiol Immunol.* 291 (4), S. 167–175.
- Aepfelbacher, M.; Zumbihl, R.; Ruckdeschel, K.; Jacobi, C. A.; Barz, C.; Heesemann, J.** (2005): The Tranquilizing Injection of *Yersinia* Proteins: A Pathogens Strategy to Resist Host Defense. In: *Biological Chemistry*, S. 795–802.
- Albert-Weissenberger, C.; Sahr, T.; Sismeiro, O.; Hacker, J.; Heuner, K.; Buchrieser, C.** (2010): Control of Flagellar Gene Regulation in *Legionella pneumophila* and Its Relation to Growth Phase. In: *Journal of Bacteriology* 192 (2), S. 446–455.
- Amann, R.; Springer, N.; Schönhuber, W.; Ludwig, W.; Schmid, E. N.; Müller, K.; Michel, R.** (1997): Obligate Intracellular Bacterial Parasites of *Acanthamoeba* Related to *Chlamydia* spp. In: *Applied And Environmental Microbiology* 63 (1), S. 115–121.
- Amor, J. C.; Swails, J.; Zhu, X.; Roy, C. R.; Nagai, H.; Ingmundson, A.; Xiaodong, C.; Kahn, R., A.** (2005): The Structure of RalF, an ADP-ribosylation Factor Guanine Nucleotide Exchange Factor from *Legionella pneumophila*, Reveals the Presence of a Cap over the Active Site. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (2), S. 1392–1400.
- Anderson, A. J. and Dawes, E. A.** (1990): Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. In: *Microbiological Reviews* 54 (4).
- Anderson, I. J.; Watkins, R. F.; Samuelson, J.; Spencer, D. F.; Majoros, W. H.; Gray, M. W.; Loftus, B. J.** (2005): Gene Discovery in the *Acanthamoeba castellanii* Genome. In: *Protist* 156, S. 203–214.
- Anderson, R. L. and Wood, W. A.** (1969): Carbohydrate metabolism in microorganisms. In: *Annual Review of Microbiology* 23, S. 539–578.

- Aragon, V.; Kurtz, S.; Cianciotto, N. P.** (2001): *Legionella pneumophila* Major Acid Phosphatase and Its Role in Intracellular Infection. In: *Infection and Immunity* 69 (1), S. 177–185.
- Atlas, R. M.** (1999): *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. In: *Environ Microbiol* 1 (4), S. 283–293.
- Baeuerle, P. A.; Henkel, T.** (1994): Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System. In: *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1), S. 141–179.
- Barry L., W. and Gotay, A.** (2010): Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis in Synergeyes Contact Lens Wear: Clinical and Confocal Microscopy Findings. In: *Eye & Contact Lens: Science & Clinical Practice* 36 (3), S. 164–169.
- Baskerville, A., Dowsett, A.B., Fitzgeorge, R.B., Hambleton, P., & Broster, M.** (1983). Ultrastructure of pulmonary alveoli and macrophages in experimental Legionnaires' disease. *J Pathol*, 140, 77-90.
- Benson, R. F. and Fields, B. S.** (1998): Classification of the genus *Legionella*. In: *Seminars in Respiratory Infect.* 13 (2), S. 90–99.
- Bentley, R. and Haslam, E.** (1990): The Shikimate Pathway — A Metabolic Tree with Many Branche. In: *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 25 (5), S. 307–384.
- Berk, S. G.; Ting, R. S.; Turner, G. W.; Ashburn, R. J.** (1998): Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. In: *Applied And Environmental Microbiology* 64, S. 279–286.
- Blädel, I.** (2008): Untersuchungen zum Metabolismus von Glukose bei *Legionella pneumophila*. Diplomarbeit. Universität Würzburg, Würzburg.
- Boldrick, J. C.; Alizadeh, A. A.; Diehn, M.; Dudoit, S.; Long Lui, C.; Belcher, C. E. Botstein, D.; Staudt, L., M.; Brown, P., O.; Relman, D., A.** (2002): Stereotyped and specific gene expression programs in human innate immune responses to bacteria. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2), S. 972–977.
- Bosshardt, S. C.; Benson, R. F.; Fields, B. S.** (1997): Flagella are positive predictor for virulence in *Legionella*. In: *Microbial Pathogenesis* 23, S. 107–112.
- Bowers, B., & Korn, E.D.** (1968). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii*. I. The trophozoite. *JCell Biol*, 39, 95-111.
- Bradley, R. M.; Gander, R. M.; Patel, S. K.; Kaplan, H. S.** (1997): Inhibitory effect of 0 degree C storage on the proliferation of *Yersinia enterocolitica* in donated blood. In: *Transfusion* 37 (7), S. 691–695.
- Brauman, J. I.** (1966): Least Squares Analysis and Simplification of Multi-Isotope Mass Spectra. In: *Anal. Chem.* 38 (4), S. 607–610.
- Breier, M.** (2012): Isotopologuntersuchungen an pathogenen Bakterien: Methodenentwicklung und Anwendung am Beispiel *Yersinia enterocolitica*. Master's Thesis. Technische Universität München. Biochemie
- Brehm, K.; Kreft, J.; Ripio, M. T.; Vázquez-Boland, J. A.** (1996): Regulation of virulence gene expression in pathogenic *Listeria*. In: *Microbiologica* 12 (2), S. 219–236.

- Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G., & McDade, J.E.** (1979). Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familianova. *Ann Intern Med*, 90, 656-658
- Brodsky, I. E.; Pal, N. W.; Sadanand, S.; Ryndak, M. B.; Sutterwala, F. S.; Flavell, R. A.; Bliska, J., B.; Medzhitov, R.** (2010): A *Yersinia* Effector Protein Promotes Virulence by Preventing Inflammasome Recognition of the Type III Secretion System. In: *Cell Host & Microbe* 7, S. 376–387.
- Brown, S. A.; Palmer, K. L.; Whiteley, M.** (2008): Revisiting the host as a growth medium. In: *Nat Rev Micro* 6 (9), S. 657–666.
- Brubaker, R. R.** (2005): Influence of Na⁺ Dicarboxylic Amino Acids, and pH in Modulating the Low-Calcium Response of *Yersinia pestis*. In: *Infection and Immunity* 73 (8), S. 4743–4752.
- Brüggemann, H.; Hagman, A.; Jules, M.; Sismeiro, O.; Dillies, M.; Gouyette, C.; Kunst, F.; Steinert, M.; Heuner, K.; Coppée, J.; Buchrieser, C.** (2006): Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*. In: *Cell Microbiol* 8 (8), S. 1228–1240.
- Bryant, R. J.; Woods, L. E.; Coleman, D. C.; Fairbanks, B. C.; McCellan, J. F.; Cole, C. V.** (1982): Interactions of Bacterial and Amoebal Populations in Soil Microcosms with Fluctuating Moisture Content. In: *Applied And Environmental Microbiology* 43 (4), S. 747–752.
- Buchrieser, C.; Rusniok, C.; Kunst, F.; Cossart, P.; Glaser, P.** (2003): Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity. In: *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 35, S. 207–213.
- Buck, E. de; Anne, J.; Lammertyn, E.** (2007): The role of protein secretion systems in the virulence of the intracellular pathogen *Legionella pneumophila*. In: *Microbiology* 153 (12), S. 3948–3953.
- Burcelin, R.; Garidou, L.; Pomié, C.** (2012): Immuno-microbiota cross and talk: The new paradigm of metabolic diseases. In: *Seminars in Immunology* 24 (67-74).
- Byrne, B. and Swanson, M., S.** (1998): Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. In: *Infection and Immunity* 66 (7), S. 3029–3034.
- Cambronne, E. D.; Cheng, L.; Schneewind, O.** (2000): LcrQ/YscM1, regulators of the *Yersinia yop* virulon, are injected into host cells by chaperone-dependent mechanism. In: *Mol Microbiol* 37, S. 263–273.
- Cambronne, E. D.; Sorg, J. A.; Schneewind, O.** (2004): Binding of SycH Chaperone to YscM1 and YscM2 Activates Effector yop Expression in *Yersinia enterocolitica*. In: *Journal of Bacteriology* 186 (3), S. 829–841.
- Camejo, A.; Carvalho, F.; Reis, O.; Letao, E.; Sousa, S.; Cabanes, D.** (2011): The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. In: *Virulence* 2 (5), S. 397-394.
- Carter, P. B.; Zahorchak, R. J.; Brubaker, R. R.** (1980): Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. In: *Infection and Immunity* 28 (2), S. 638–640.
- Cazalet, C.; Rusniok, C.; Brüggemann, H.; Zidane, N.; Magnier, A.; Ma, Laurence et al.** (2004): Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. In: *Nat Genet* 36 (11), S. 1165–1173.

- Cervený, K. L.** (2012): Cancer Metabolism. In: *Cell* 148, S. 383–384.
- Chatterjee, S. S.; Hossain, H.; Otten, S.; Kuenne, C.; Kuchmina, K.; Machata, S.; Domann, E.; Chakraborty, T.; Hain, T.** (2006): Intracellular Gene Expression Profile of *Listeria monocytogenes*. In: *Infection and Immunity* 74 (2), S. 1323–1338.
- Chen, J.; deFelipe, K. S.; Clarke, M.; Lu, H.; Anderson, R.; Segal, G.; Shuman, H. A.** (2004): *Legionella* Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. In: *Science* 303 (5662), S. 1358–1361.
- Chen, L.; Peng, Z.; Bateman, E.** (2004): *In vivo* interactions of the *Acanthamoeba* TBP gene promoter. In: *Nucleic Acids Research* 32 (4), S. 1251–1260.
- Cheng, T.; Sudderth, J.; Yang, C.; Mullen, A. R.; Jin, E. S.; Matés, J. M.; DeBerardinis, R. J.** (2011): Pyruvate carboxylase is required for glutamine-independent growth of tumor cells. In: *PNAS* 108 (21), S. 8674–8679.
- Chico-Calero, I.; Suárez, M.; Gonzalez-Zorn, B.; Scotti, M.; Slaghuis, J.; Goebel, W.; Vázquez-Boland, J. A.** (2001): Hpt, a bacterial homolog of the microsomal glucose- 6-phosphate translocase, mediates rapid intracellular proliferation in *Listeria*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (1), S. 431–436.
- Chien, M.; Morozova, I.; Shi, S.; Sheng, H.; Chen, J.; Gomez, S. M. et al.** (2004): The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*. In: *Science* 305, S. 1966–1968.
- Christie, P. J. and Vogel, J. P.** (2000): Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver molecules to host cells. In: *Trends in Microbiology* 8 (8), S. 354–360.
- Cianciotto, N. P.** (2005): Type II Secretion: A Protein Secretion System For All Seasons. In: *Trends in Microbiology* 13 (12), S. 581–588.
- Cornelis, G. R.; Boland, A.; Boyd, A. P.; Geuijen, C.; Iriarte, M.; Neyt, C.; Sory, M.; Stainier, I.** (1998): The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64 (4), S. 1315–1352.
- Cossart, P. and Sansonetti, P. J.** (2004): Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens. In: *Science* 304 (5668), S. 242–248.
- Dalebroux, Z. D.; Edwards, R. L.; Swanson, M. S.** (2009): SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. In: *Molecular Microbiology* 71 (3), S. 640–658.
- Dalebroux, Z. D.; Swanson, M. S.** (2012): ppGpp: magic beyond RNA polymerase. In: *Nat Rev Micro* 10 (3), S. 203–212.
- Dalebroux, Z. D.; Yagi, B. F.; Sahr, T.; Buchrieser, C.; Swanson, M. S.** (2010): Distinct roles of ppGpp and DksA in *Legionella pneumophila* differentiation. In: *Mol Microbiol* 76 (1), S. 200–219.
- Dang, C. V.; Kim, J.; Gao, P.; Yustein, J.** (2008): The interplay between MYC and HIF in cancer. In: *Nature Reviews* 8, S. 51–56.
- Dang, C.V., Le, A., Gao, P.** (2009). MYC-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities *Clin Cancer Res* 15, 6479-83.
- DeBerardinis, R. J.; Mancuso, A.; Daikhin, E.; Nissim, I.; Yudkoff, M.; Wehrli, S.; Thompson, C. B.** (2007): Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in

Glutamine Metabolism that exceeds the requirement for Protein and nucleotide synthesis. In: *PNAS* 104 (49), S. 19345–19350.

DebRoy, S.; Dao, J.; Soderberg, M.; Rossier, O.; Cianciotto, N. P. (2006): *Legionella pneumophila* type II secretome reveals unique exoproteins and a chitinase that promotes bacterial persistence in the lung. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (50), S. 19146–19151.

Delor, I. and Cornelis, G. R. (1992): Role of *Yersinia enterocolitica* Yst toxin in experimental infection of young rabbits. In: *Infection and Immunity* 60, S. 4269–4277.

Deretik, V. and Levine, B. (2009): Autophagy, Immunity, and Microbial Adaptions. In: *Cell Host & Microbe* 5, S. 527–549.

De Stefano, D., Maiuri, M.C., Iovine, B., Ialenti, A., Bevilacqua, M.A., Carnuccio, R. (2006). The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages. *J Mol Med* 84, 65-7.

Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. (2007): Mass Spectrometry Based Metabolomics. In: *Mass Spectrom Rev.* 26 (1), S. 51–78.

Deutscher, J.; Francke, C.; Postma, P. W. (2006): How Phosphotransferase System-Related Protein Phosphorylation Regulates Carbohydrate Metabolism in Bacteria. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70 (4), S. 939–1031.

Diederer, B. M. W. (2008): *Legionella spp.* and Legionnaires' disease. In: *Journal of Infection* 56 (1), S. 1–12.

Dittmann, S.; Schmid, A.; Richter, S.; Trülsch, K.; Heesemann, J.; Wilharm, G.: The *Yersinia enterocolitica* type three secretion chaperone SycO is integrated into the Yop regulatory network and binds to the Yop secretion protein YscM1. In: *BMC Microbiology* 7, S. 67.

Dunlop, E. A.; Tee, A. R. (2009): Mammalian target of rapamycin complex 1: signalling inputs, substrates and feedback mechanisms. In: *Cellular Signalling* 21 (6), S. 827–835.

Dunn, W. B.; Bailey, N. J. C.; Johnson, H. E. (2005): Measuring the metabolome: current analytical technologies. In: *Analyst* 130, S. 606–625.

Dussurget, O.; Pizarro-Cerda, J.; Cossart, P. (2004): Molecular Determinants of *Listeria monocytogenes* virulence. In: *Annual Review of Microbiology* 58, S. 587–610.

Edwards, R. L.; Dalebroux, Z. D.; Swanson, M. S. (2009): *Legionella pneumophila* couples fatty acid flux to microbial differentiation and virulence. In: *Molecular Microbiology* 71 (5), S. 1190–1204.

Eisenreich, W. (2006): ¹³C isotopologue perturbation studies of *Listeria monocytogenes* carbon metabolism and its modulation by the virulence regulator PrfA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (7), S. 2040–2045.

Eisenreich, W. and Bacher, A. (2007): Advances of high-resolution NMR techniques in the structural and metabolic analysis of plant biochemistry. In: *Phytochemistry* 68, S. 2799–2815.

Eisenreich, W.; Dandekar, T.; Goebel, W.(2010): Carbon metabolism of intracellular bacterial pathogens and possible links to virulence. In: *Nature Reviews* 8, S. 401–412.

Eisenreich, W.; Huber, C.; Kutzner, E.; Knispel, N.; Schramek, N.:(submitted) Isotopologue profiling - towards a better understanding of metabolic pathways. In: *Molecular*

Plant Biology Handbook Series The Handbook of Plant Metabolomics (Metabolite Profiling and Networking).

Entner, N. and Doudoroff, M. (1952): Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. In: *The Journal of biological Chemistry* 196, S. 853–862.

Eppinger, M.; Rosovitz, M. J.; Fricke, Wolfgang F.; Rasko, D., A.; Kokorina, G.; Fayolle, C. et al. (2007): The Complete Genome Sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the Causative Agent of Far East Scarlet-Like Fever. In: *PLoS Genet* 3 (8), S. e142.

Ernst, R., R. (1992): Nuclear Magnetic Resonance Fourier Transform Spectroscopy. Nobel Lecture. Eidgenössische Technische Hochschule. Laboratorium für Physikalische Chemie, ETH-Zentrum, Zürich, Switzerland, 09.12.1992.

Eylert, E. (2009): Isotopologprofile zur Bestimmung von Stoffwechselwegen und -flüssen in Mikroorganismen und Insekten, Technische Universität München. Biochemie.

Eylert, E.; Herrmann, V.; Jules, M.; Gillmaier, N.; Lautner, M.; Buchrieser, C.; Eisenreich, W.; Heuner, K. (2010): Isotopologue Profiling of *Legionella pneumophila*: ROLE OF SERINE AND GLUCOSE AS CARBON SUBSTRATES. In: *Journal of Biological Chemistry* 285 (29), S. 22232–22243.

Eylert, E.; Schär, J.; Mertins, S.; Stoll, R.; Bacher, A.; Goebel, W.; Eisenreich, W. (2008): Carbon metabolism of *Listeria monocytogenes* growing inside macrophages. In: *Molecular Microbiology* 69 (4), S. 1008–1017.

Famili, I.; Förster, J.; Nielsen, J.; Palsson, B. O. (2003): *Saccharomyces cerevisiae* phenotypes can be predicted by using constraint-based analysis of a genome-scale reconstructed metabolic network. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (23), S. 13134–13139.

Fan K, Barendsen N, Sensenbrenner L, Chen BD. (1993). Deregulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) receptor in murine macrophage cell line J774A.1. *J Cell Physiol* 154:535-42

Faucher, S., P.; Mueller, C., A.; Shuman, H., A. (2011): *Legionella pneumophila* transcriptome during intracellular multiplication in human macrophages. In: *frontiers in Microbiology*. Doi: 10.3389/fmicrob.2011.0060

Fernandez-Moreira, E.; Helbig, J., H; Swanson, M., S (2006): Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusion of phagosomes with lysosomes. In: *Infect Immun* 74 (6), S. 3285–3295.

Fettes, P. S.; Forsbach-Birk, V.; Lynch, D.; Marre, R. (2001): Overexpression of a *Legionella pneumophila* homologue of the *E. coli* regulator *csrA* affects cell size, flagellation, and pigmentation. In: *Int J. Med Microbiol* 291 (5), S. 353–360.

Fiehn, O. (2001): Combining genomics, metabolome analysis, and biochemical modelling to understand metabolic networks. In: *Comparative and Functional Genomics* 2, S. 255–268.

Fields, B. S. (1996): The molecular ecology of legionellae. In: *Trends in Microbiology* 4 (7), S. 286–290.

Fields, B. S.; Benson, R. F.; Besser, R. E. (2002): *Legionella* and Legionnaires' Disease: 25 Years of Investigation. In: *Clinical Microbiology Reviews* 15 (3), S. 506–526.

Flannagan, R. S.; Cosio, G.; Grinstein, S. (2009): Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. In: *Nat Rev Micro* 7, S. 355–366.

- Flannery, B.; Gelling, L. B.; Vugia, D. J.; Weintraub, J. M.; Salerno, J. J.; Conroy, M. J.; Stevens, V., A.; Rose, C.; Moore, M., R.; Fields, B., S.; Besser, R., E.** (2006): Reducing *Legionella* Colonization of Water Systems with Monochloramine. In: *Emerging Infectious Diseases* 12 (4), S. 588–596.
- Fliermanns, C. B.; Cherry, W. B.; Orrison, L. H.; Smith, S. J.; Tison, D. L.; Pope, D. H.** (1981): Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. In: *Applied and Environmental Microbiology* 41 (1), S. 9–16.
- Frederiksen, W.** (1980): A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (Bacterium enterocoliticum and Pasteurella X). In: *Proc. 14 th Scyn. Congr. Path. Microbiol.*, S. 103–104.
- Fredriksson-Ahomaa, M.; Stolle, A.; Korkeala, H.** (2006): Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. In: *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 47 (3), S. 315–329.
- Friebolin, H.** (2006): Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. 4. Aufl. Heidelberg, Germany: Wiley-VCH.
- Fraser, D.W., Tsai, T.R., Orenstein, W., Parkin, W.E., Beecham, H.J., Sharrar, R.G., Harris, J., Mallison, G.F., Martin, S.M., McDade, J.E., Shepard, C.C., & Brachman, P.S.** (1977) Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med*, 297, 1189-1197.
- Fuchs, G.** (2011): Alternative Pathways of Carbon Dioxide Fixation: Insights into Early Evolution of Life? In: *Annual Review of Microbiology* 65, S. 631–658.
- Fuchs, T. M.; Eisenreich, W.; Kern, T.; Dandekar, T.** (2012): Toward a systemic understanding of *Listeria monocytogenes* metabolism during infection. In: *Molecular Immunology - frontiers in Microbiology* 3.
- Fukui, T., Shiomi, N., & Doi, Y.** (1998). Expression and characterization of (R)-specific enoyl coenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol*, 180, 667-673.
- Gaillard, J. L.; Berche, P.; Frehel, C.; Gouln, E.; Cossart, P.** (1991): Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. In: *Cell* 65 (7), S. 1127–1141.
- Gao, L.; Harb, O. S.; Abu Kwaik, Y.** (1997): Utilization of Similar Mechanisms by *Legionella pneumophila* To Parasitize Two Evolutionarily Distant Host Cells, Mammalian Macrophages and Protozoa. In: *Infection and Immunity* 65 (11), S. 4738–4746.
- Garduno, R. A.; Garduno, E.; Hiltz, M.; Hoffman, P. S.** (2002): Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms. In: *Infection and Immunity* 70 (11), S. 6273–6283.
- George, J. R.; Pine, L.; Reeves, M. W.; Harrell, W. K.** (1980): Amino Acid Requirements of *Legionella pneumophila*. In: *Journal of Clinical Microbiology* 11 (3), S. 286–291.
- Glaser, P.; Frangeul, L.; Buchrieser, C.; Rusniok, C.; Amend, A.; Baquero, F.; Berche, P.; Bloecker, H.; Brandt, P.; Chakraborty, T.; Charbit, A.; Chetouani, Couve, E.; de Daruvar, A.; Dehoux, P.; Domann, E.; Dominguez-Bernal, G.; Duchaud, E.; Durant, L.; Dussurget, O.; Entian, K.; Fshih, H.; Garcia-Del Partillo, F.; Garrido, P.; Gautier, L.; Goebel, W.; Gomez-Lopez, N.; Hain, T.; Hauf, J.; Jackson, D.; Jones, L.; Kaerst, U.;**

- Kreft, J.; Kuhn, M.; Kunst, F.; Kurapkat, G.; Medueno, E.; Maitourman, A., Vicente, J., M.; Ng, E.; Nedjiari, H.; Nordsiek, G.; Novella, S.; de Pablos, B.; Perez-Diaz, J.; Purcell, R.; Rimmel, B.; Rose, M.; Schlueter, T.; simones, N.; Tierrez, A.; Vasquez-Boland, J.; Voss, H.; Wehland, J.; Cossart, P.** (2001): Comparative Genomics of *Listeria* Species. In: *Science* 294, S. 849–852.
- Glick, T.H., Gregg, M.B., Berman, B., Mallison, G., Rhodes, W.W., Jr., & Kassinoff, I.** (1978). Pontiac fever. An epidemic of unknown etiology in a health department: I. Clinical and epidemiologic aspects. *Am J Epidemiol*, 107, 149-160.
- Glöckner, G.; Albert-Weissenberger, C.; Weinmann, E.; Jacobi, S.; Schunder, E.; Steinert, M.** (2008): Identification and characterization of a new conjugation (type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. In: *Int J Med Microbiol* 298 (5-6), S. 411–428.
- Goguen, J. D.; Yother, J.; Straley, S. C.** (1984): Genetic analysis of the low calcium response in *Yersinia pestis* mu d1 (Ap lac) insertion mutants. In: *Journal of Bacteriology* 160 (2).
- Goody, P. R.; Heller, K.; Oesterlin, L. K.; Müller, M. P.; Itzen, A.; Goody, R. S.** (2012): Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins. In: *European Molecular Biology Organization*, S. 1–11.
- Gordan, J. D.; Thompson, C. B.; Simon, M. C.** (2007): HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. In: *Cancer Cell* 12 (2), S. 108–113.
- Green, C. B.; Takahashi, J. S.; Bass, J.** (2008): The Meter of Metabolism. In: *Cell* 134, S. 728–742.
- Griffin, J. L.** (2004): Metabolic profiles to define the genome: can we hear the phenotypes? In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359 (1446), S. 857–871.
- Griffin, J. L. and Shockcor, J. P.** (2004): Metabolic Profiles of cancer cells. In: *Nature Reviews* 4, S. 551–561.
- Haas, A.** (2007): The Phagosome: Compartment with a License to Kill. In: *Traffic* 8 (4), S. 311–330.
- Hacker, J. and Heesemann, J.** (2000): Molekulare Infektionsbiologie – Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Zellen. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg
- Hain, T.; Chatterjee, S. S.; Ghai, R.; Kuenne, C. T.; Billion, A.; Steinweg, C.** (2007): Pathogenomics of *Listeria* spp. In: *International Journal of Medical Microbiology* 297, S. 541–557.
- Hales, L. M. and Shuman, H. A.** (1999): *Legionella pneumophila* Contains a Type II General Secretion Pathway Required for Growth in *Amoebae* as Well as for Secretion of the Msp Protease. In: *Infect Immun* 67 (7), S. 3662–3666.
- Hamon, M.; Bierne, H.; Cossart, P.** (2006): *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. In: *Nat Rev Micro* 4 (6), S. 423–434.
- Harada, E.; Iida, K.; Shiota, S.; Nakayama, H.; Yoshida, S.** (2010): Glucose Metabolism in *Legionella pneumophila*: Dependence on the Entner-Doudoroff Pathway and Connection with Intracellular Bacterial Growth. In: *Journal of Bacteriology* 192 (11), S. 2892–2899.

- Hayashi, T.; Nakamichi, M.; Naitou, H.; Ohashi, N.; Imai, Y.; Miyake, M.** (2010): Proteomic Analysis of Growth Phase Dependent Expression of *Legionella pneumophila* Proteins Which Involves Regulation of Bacterial Virulence Traits. In: *PLoS ONE* 5 (7), S. e11718.
- Heesemann, J. and Laufs, R.** (1983): Construction of a Mobilizable *Yersinia enterocolitica* Virulence Plasmid. In: *Journal of Bacteriology* 155 (2), S. 761–767.
- Hermawan, S. and Jendrossek, D.** (2007): Microscopical investigation of poly (3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*. In: *FEMS Microbiology Letters*, S. 60–64.
- Herrmann, K. M.; Weaver, L. M.** (1999): THE SHIKIMATE PATHWAY. In: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50 (1), S. 473–503.
- Herrmann, V.** (2012): Die Funktion von Glukose im Lebenszyklus von *Legionella pneumophila*. Dissertation. Humboldt-Universität Berlin, Berlin. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
- Hesse, M.; Meier, H.; Zeeh, B.** (2005): Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 7. Aufl. Stuttgart ;, New York: Thieme.
- Heuner, K.; Brand, B. C.; Hacker, J.** (1999): The expression of the flagellum of *Legionella pneumophila* is modulated by different environmental factors. In: *FEMS Microbiology Letters* 175 (1), S. 69–77.
- Heuner, K.; Dietrich, Claudia; Skriwan, Carina; Steinert, Michael; Hacker, Jörg** (2002): Influence of the Alternative sigma28 Factor on Virulence and Flagellum Expression of *Legionella pneumophila*. In: *Infection and Immunity* 70 (3), S. 1604–1608.
- Higgins, M. K.; Morgan, S. L.; Fox, A.; Bly, R.S** (1994): Differentiation of Isomeric Alditol Hexaacetates and Identification of Aldoheoses by Electron Impact Mass Spectrometry. In: *Anal. Chem.* 66 (17), S. 2656–2668.
- Higuchi, K.; Kupferberg, L.; Smith, J.** (1959): Studies on the nutrition and physiology of *Pasteurella pestis*. III. Effects of calcium ions on the growth of virulent and avirulent strains of *Pasteurella pestis*. In: *Journal of Bacteriology* 77, S. 317–321.
- Hilbi, H.; Haas, A.** (2012): Secretive Bacterial Pathogens and the Secretory Pathway. In: *Traffic*, S. 1–11.
- Hilbi, H.; Jarraud, S.; Hartland, E.; Buchrieser, C.** (2010): Update on Legionnaires' disease: pathogenesis, epidemiology, detection and control. In: *Mol Microbiol* 76 (1), S. 1–11.
- Hilbi, H.; Segal, G.; Shuman, H. A.** (2001): IcM/Dot-dependent upregulation of phagocytosis by *Legionella pneumophila*. In: *Mol Microbiol* 42, S. 603–617.
- Holleran, A.L., Briscoe, D.A., Fiskum, G., Kelleher, J.K.** (1995). Glutamine metabolism in AS-30D hepatoma cells. Evidence for its conversion into lipids via reductive carboxylation. *Mol Cell Biochem* 152, 95-101.
- Horwitz, M. A.** (1983a): The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. In: *Journal of Experimental Medicine* 158 (6), S. 2108–2126.
- Horwitz, M. A.** (1983b): Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. In: *Journal of Experimental Medicine* 158 (4), S. 1319–1331.

- Horwitz, M. A.** (1984): *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. In: *The Journal of Cell Biology* 99 (6), S. 1936–1943.
- Hsu, P. P. and Sabatini, D. M.** (2008): Cancer Cell Metabolism: Warburg and beyond. In: *Cell Essay* 134, S. 703–707.
- Hubber, A. and Roy, C. R.** (2010): Modulation of Host Cell Function by *Legionella pneumophila* Type IV Effectors. In: *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26 (1), S. 261–283.
- Huber, H.; Gallenberger, M.; Jahn, U.; Eylert, E.; Berg, I. A.; Kockelkorn, D; Eisenreich, W.; Fuchs, G.** (2008): A dicarboxylate/4-hydroxybutyrate autotrophic carbon assimilation cycle in the hyperthermophilic Archaeum *Ignicoccus hospitalis*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (22), S. 7851–7856.
- Hwang, C.; Sinskey, A.; Lodish, H.** (1992): Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum. In: *Science* 257 (5076), S. 1496–1502.
- Im, K.; Shin, H., J.; Seo, D., W., Jeon, S., H.; Kim, T., E** (1999): Pathogenicity of Korean isolates of *Acanthamoeba* by obtaining zymodemes of five isoenzymes- In: *Korean J. Parasitol.* 37 (2): 85-92
- Isberg, R. R.; O'Connor, T.; Heidtmann, M.** (2009): The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cozy niche inside host cells. In: *Nat Rev Micro* 7 (1), S. 12–24.
- James, B. W.; Mauchline, S.; Dennis, P. J.; Keevil, C. W.; Wait, R.** (1999): Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. In: *Applied And Environmental Microbiology* 65 (2), S. 822–827.
- Jarasch, N., Martin, U., Kamphausen, E., Zell, R., Wutzler, P., Henke, A.** (2005). Interferon-gamma-induced activation of nitric oxide-mediated antiviral activity of macrophages caused by a recombinant coxsackievirus B3. *Viral Immunol* 18, 355-64.
- Johnson, J.; Jinneman, K.; Stelma, G.; Smith, B. G.; Lye, D.; Messer, J.; Ulaskek, J.; Evsen, L.; Gendel, S.; Bennet, W.; Swaminathan, B.; Pruckler, J.; Steigerwalt, A.; Kathariou, S.; Yildirim, S.; Volokohv, D.; Rasooly, A.; Chizhikov, A.; Wiedmanm, M.; Fortes, E.; Duvall, R., E.; Hitchins, D.** (2004): Natural Atypical *Listeria innocua* Strains with *Listeria monocytogenes* Pathogenicity Island 1 Genes. In: *Applied and Environmental Microbiology* 70 (7), S. 4256–4266.
- Joseph, B.; Goebel, W.** (2007): Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. In: *Microbes and Infection* 9, S. 1188–1195.
- Joseph, B.; Mertins, S.; Stoll, R.; Schar, J.; Umesha, K. R.; Luo, Q.; Müller-Altrock, A.; Goebel, W.** (2008): Glycerol Metabolism and PrfA Activity in *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of Bacteriology* 190 (15), S. 5412–5430.
- Joseph, B.; Przybilla, K.; Stuhler, C.; Schauer, K.; Slaghuis, J.; Fuchs, T. M.; Goebel, W.** (2005): Identification of *Listeria monocytogenes* Genes Contributing to Intracellular Replication by Expression Profiling and Mutant Screening. In: *Journal of Bacteriology* 188 (2), S. 556–568.
- Joshi, A. D. and Swanson, M. S.** (2011): Secrets of a successful pathogen: *legionella* resistance to progression along the autophagic pathway. In: *Front Microbiol* 2, S. 138.
- Kagan, Jonathan C.; Roy, Craig R.** (2002): *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. In: *Nat Cell Biol* 4 (12), S. 945–954.

- Katz, S. M. and Hammel, J. M.** (1987): The effect of drying, heat, and pH on the survival of *Legionella pneumophila*. In: *Annual Clinical Lab. Science* 17 (3), S. 150–156.
- Kaufmann, A.F., McDade, J.E., Patton, C.M., Bennett, J.V., Skaliy, P., Feeley, J.C., Anderson, D.C., Potter, M.E., Newhouse, V.F., Gregg, M.B., & Brachman, P.S.** (1981). Pontiac fever: isolation of the etiologic agent (*Legionella pneumophila*) and demonstration of its mode of transmission. *Am J Epidemiol*, 114, 337-347
- Kerr, M. C. and Teasdale, R. D.** (2009): Defining Macropinocytosis. In: *Traffic* 10 (4), S. 364–371.
- Kim, J.W., Zeller, K.I., Wang, Y., Jegga, A.G., Aronow, B.J., O'Donnell, K.A., Dang, C.V.** (2004). Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol Cell Biol* 24, 5923-36.
- Koornhof, H. J.; Smego, Jr. R.; Nicol, M.** (1999): *Yersiniosis* II: The pathogenesis of *Yersinia* infections. In: *European Journal of Clinical Microbiol. Infect. Dis.* 18, S. 87–112.
- Korotkova, N. and Lidstrom, M. E.** (2001): Connection between Poly-β-Hydroxybutyrate Biosynthesis and Growth on C1 and C2 Compounds in the Methylophile *Methylobacterium extorquens* AM1. In: *Journal of Bacteriology* 183 (3), S. 1038–1046.
- Korzekwa, Kenneth; Howald, William N.; Trager, William F.** (1990): The use of Brauman's least squares approach for the quantification of deuterated chlorophenols. In: *Biol. Mass Spectrom.* 19 (4), S. 211–217.
- Kroemer, G. and Pouyssegur, J.** (2008): Tumor Cell Metabolism: Cancer's Achilles' Heel. In: *Cancer Cell Review* 13, S. 472–482.
- Kumar, Y. and Valdivia, R. H.** (2009): Leading a Sheltered Life: Intracellular Pathogens and Maintenance of Vacuolar Compartments. In: *Cell Host & Microbe* 5, S. 593–601.
- Kunau, W. H.; Dommès, V.; Schulz, H.** (1995): beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes and bacteria: a century of continued progress. In: *Progress in Lipid Research* 34 (4), S. 267–342.
- Langenbach, S., Rehm, B.H., & Steinbuchel, A.** (1997). Functional expression of the PHA synthase gene *phaC1* from *Pseudomonas aeruginosa* in *Escherichia coli* results in poly (3-hydroxyalkanoate) synthesis. *FEMS Microbiol Lett*, 150, 303-309.
- Lee, V., T.; Anderson, D., M.; Schneewind, O.** (1998): Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. In: *Mol Microbiol* 28 (3), S. 593–601.
- Lee, W.-N P.; Byerley, L., O.; Bergner, E. A.; Edmond, J.** (1991): Mass isotopomer analysis: Theoretical and practical considerations. In: *Biol. Mass Spectrom.* 20 (8), S. 451–458.
- Leimeister-Wächter, M.; Haffner, C.; Domann, E.; Goebel, W.** (1990): Identification of a gene that positively regulates expression of listeriolysin, the major virulence factor of *Listeria monocytogenes*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, S. 8336–8340.
- Liebeke, M.; Dörries, K.; Zühlke, D.; Bernhardt, J.; Fuchs, S.; Pane-Farré, J.; Engelmann, S.; Völker, U.; Bode, R.; Dandekar, T.; Lindequist, U.; Hecker, M.; Lalk, M.** (2011): A metabolomics and proteomics study of the adaption of *Staphylococcus aureus* to glucose starvation. In: *Molecular BioSystems* 7, S. 1241–1253.

- Locasale, J. W.; Cantley, L. C.** (2010): Altered metabolism in cancer. In: *BMC Biology* 8 (88).
- Lottspeich and Friedrich** (Hg.) (2006): Bioanalytik. 2. Aufl. München ;, Heidelberg: Spektrum.
- Luck, P. C.; Jacobs, E.; Roske, I.; Schroter-Bobsin, U.; Dumke, R.; Gronow, S.** (2010): *Legionella dresdenensis* sp. nov., isolated from river water. In: *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* 60 (11), S. 2557–2562.
- Mackaness, G. B.** (1964): THE IMMUNOLOGICAL BASIS OF ACQUIRED CELLULAR RESISTANCE. In: *Journal of Experimental Medicine* 120 (1), S. 105–120.
- Marquis, H.; Bouwer, H. G. A.; Hinrichs, D. J.; Portnoy, D. J.** (1993): Intracytoplasmic Growth and Virulence of *Listeria monocytogenes* Auxotrophic Mutants. In: *Infection and Immunity* 61 (9), S. 3756–3760.
- Marshall, M.; Naumovitz, D.; Ortega, Y.; Sterling, C. R.** (1997): Waterborne Protozoan Pathogens. In: *Clinical Microbiology Reviews* 10 (1), S. 67–85.
- Mateo, R.B., Reichner, J.S., Mastrofrancesco, B., Kraft-Stolar, D., Albina, J.E.** (1995). Impact of nitric oxide on macrophage glucose metabolism and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity. *Am J Physiol.* **268**, C669-75.
- Mauchline, W. S.; Araujo, R.; Wait, R.; Dowsett, A. B.; Dennis, P. J.; Keevil, C. W.** (1992): Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration. In: *Microbiology* 138 (11), S. 2371–2380.
- McDade, J.E., Shepard, C.C., Fraser, D.W., Tsai, T.R., Redus, M.A., & Dowdle, W.R.** (1977). Legionnaires' disease: isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *N Engl J Med*, 297, 1197-1203
- McMurry, J. and Begley, T.** (2006): Organische Chemie der biologischen Stoffwechselwege. 1. Aufl. Heidelberg, Germany: ELSEVIER GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.
- Mertins, S.; Joseph, B.; Goetz, M.; Ecke, R.; Seidel, G.; Sprehe, M.; Hillen, W.; Goebel, W.; Müller-Altrock, S.** (2007): Interference of Components of the Phosphoenolpyruvate Phosphotransferase System with the Central Virulence Gene Regulator PrfA of *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of Bacteriology* 189 (2), S. 473–490.
- Meyer-Morse, N.; Robbins, J. R.; Rae, C. S.; Mochegova, S. N.; Swanson, M. S.; Zhao, Z.; Virgin, H.; Portnoy, D.** (2010): *Listeriolysin O* is necessary and sufficient to induce autophagy during *Listeria monocytogenes* infection. In: *PLoS One* 5 (1), S. e8610.
- Molofsky, A. B.; Swanson, M. S.** (2003): *Legionella pneumophila* CsrA is a pivotal repressor of transmission traits and activator of replication. In: *Molecular Microbiology* 50 (2), S. 445–461.
- Molofsky, Ari B.; Swanson, Michele S.** (2004): Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. In: *Molecular Microbiology* 53 (1), S. 29–40.
- Moreno-Sanchez, R.; Rodrigues-Enriquez, S.; Mann-Hernandez, A.; Saavedra, E.** (2007): Energy Metabolism in Tumor cells. In: *FEBS Journal* 274, S. 1393–1418.
- Mothes, G.; Rivera, I. S.; Babel, W.** (1997): Competition between β -ketothiolase and citrat synthase during poly(β -hydroxybutyrate) synthesis in *Methylobacterium rhodesianum*. In: *Archives of Microbiology* 166, S. 405–410.

- Munoz-Eliás, E. J. and McKinney, J. D.** (2006): Carbon Metabolism of intracellular bacteria. In: *Cell Microbiol* 8 (1), S. 10–22.
- Nau, G. J.; Richmond, J. F. L.; Schlesinger, A.; Jennings, e. G.; Lander, E. S.; Young, R. A.** (2002): Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (3), S. 1503–1508.
- Nau, G. J.; Schlesinger, A.; Richmond, J. F. L.; Young, R. A.** (2003): Cumulative Toll-Like Receptor Activation in Human Macrophages Treated with Whole Bacteria. In: *The Journal of Immunology* 170, S. 5203–5209.
- Neumeister, B.; Schöninger, S.; Faigle, M.; Eichner, M.; Dietz, K.** (1997): Multiplication of Different *Legionella* species in Mono Mac 6 Cells and in *Acanthamoeba castellanii*. In: *Applied And Environmental Microbiology* 63 (4), S. 1219–1224.
- Nothelfer, K.; Dias Rodrigues, C.; Bobard, A.; Phalipon, A.; Enninga, J.** (2011): Monitoring *Shigella flexneri* vacuolar escape by flow cytometry. In: *Virulence* 2 (1), S. 54–57.
- Oldham, L. J. and Rogers, F. G.** (1985): Adhesion, Penetration and Intracellular Replication of *Legionella pneumophila*: an in vitro Model of Pathogenesis. In: *Microbiology* 131 (4), S. 697–706.
- Oliver, S. G.; Winson, M. K.; Kell, D. B.; Baganz, F.** (1998): Systematic functional analysis of the yeast genome. In: *Trends in Biotechnology* 16 (9), S. 373–378.
- Orrison, Leta H.; Cherry, W. B.; Tyndall, R. L.; Fliermans, C. B.; Gough, S. B.; Lambert, M.A; McDougal, L., K.; Bibb, W.; Brenner, D., J.** (1983): *Legionella oakridgensis*: Unusual New Species Isolated from Cooling Tower Water. In: *Applied And Environmental Microbiology* 45 (2), S. 536–545.
- Osthus, R.C., Shim, H., Kim, S., Li, Q., Reddy, R., Mukherjee, M., Xu, Y., Wonsey, D., Lee, L.A., Dang, C.V.** (2000). Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by c-Myc. *J Biol Chem* **275**, 21797-800.
- Pfeiffer, T.; Schuster, S.; Bonhoeffer, S.** (2001): Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. In: *Science* 292 (5516), S. 504–507.
- Pickup, J. F. and McPherson, K.** (1976): Theoretical considerations in stable isotope dilution mass spectrometry for organic analysis. In: *Anal. Chem.* 48 (13), S. 1885–1890.
- Pine, L.; George, J. R.; Reeves, M. W.; Harrell, W. K.** (1979): Development of a Chemically Defined Liquid Medium for Growth of *Legionella pneumophila*. In: *Journal of Bacteriology* 9 (5), S. 615–626.
- Pine, L.; Hoffman, P.; Malcom, G.; Benson, R. F.; Keen, M. G.** (1984): Determination of catalase, peroxidase, and superoxide dismutase within the Genus of *Legionella*. In: *J Clin Microbiol.* 20(3): S. 421 – 429.
- Presti, L. F.; Riffard, S.; Jarraudm S.; Le Gallou, F.; Richet, H.; Vandenesch, F.; Etienne, J.** (2000): Isolation of *Legionella oakridgensis* from two patients with pleural effusion living in the same geographical area. In: *J Clin Microbiol.* 38 (8), S. 3128 – 30
- Price, C., T., D.; Al-Quadani, T.; Santic, M., Rosenshine, I.; Abu-Kwaik, Y.** (2011): Host Proteasomal Degradation Generates Amino Acids Essential for Intracellular Bacterial Growth. In: *Science* 334, S. 1553 - 1557

- Potrykus, K. and Cashel, M.** (2008): (p)ppGpp: Still Magical?*. In: *Annual Review of Microbiology* 62, S. 35–51.
- Putzker, M.; Sauer, H.; Sobe, D.** (2001): Plague and other human infections caused by *Yersinia* species. In: *Clin Lab* 47 (9-10), S. 453–466.
- Puzio-Kuter, A. M.** (2011): The Role of p53 in Metabolic Regulation. In: *Genes & Cancer* 2 (4), S. 385–391.
- Ray, K.; Marteyn, B.; Sansonetti, P. J.; Tang, C. M.** (2009): Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. In: *Nature Reviews* 7, S. 333–340.
- Rehm, B.H. A.** (2010): Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. In: *Nat Rev Micro* 8 (8), S. 578–592.
- Ripio, M. T.; Brehm, K.; Lara, M.; Suárez, M.; Vázquez-Boland, J. A.** (1997): Glucose-1-Phosphate Utilization by *Listeria monocytogenes* Is PrfA Dependent and Coordinately Expressed with Virulence Factors. In: *Journal of Bacteriology* 179 (22), S. 7174–7180.
- Rodríguez-Zaragoza, R.** (1994): Ecology of Free-Living *Amoeba*. In: *Crit Rev Microbiol* 20, S. 225–241.
- Rowbotham, T. J.** (1980): Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. In: *Journal of Clinical Pathology* 33 (12), S. 1179–1183.
- Rowbotham, T. J.** (1986): Current views on relationships between amoeba, *legionellae* and man. In: *Isr J Med Sci* 22 (9), S. 678–689.
- Roy, C.R., Berger, K.H., & Isberg, R.R.** (1998). *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake. *Mol Microbiol*, 28, 663-674.
- Sansonetti, P. J.** (2001): Phagocytosis of bacterial pathogens: implications in the host response. In: *Seminars in Immunology* 13, S. 281–390.
- Sansonetti, P. J.** (2010): To be or not to be a pathogen: that is the mucosally relevant question. In: *Mucosal Immunol* 4 (1), S. 8–14.
- Sansonetti, P. J.; Di Santo, J. P.** (2007): Debugging how Bacteria Manipulate the Immune Response. In: *Immunity* 26 (2), S. 149–161.
- Schär, J.; Stoll, R.; Schauer, K.; Loeffler, D. I. M.; Eylert, E.; Joseph, B. Eisenreich, W.; Fuchs, T.; Goebel, W.** (2010): Pyruvate Carboxylase Plays a Crucial Role in Carbon Metabolism of Extra- and Intracellularly Replicating *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of Bacteriology* 192 (7), S. 1774–1784.
- Schauer, K.; Stolz, J.; Scherer, S.; Fuchs, T. M.** (2009): Both Thiamine Uptake and Biosynthesis of Thiamine Precursors Are Required for Intracellular Replication of *Listeria monocytogenes*. In: *Journal of Bacteriology* 191 (7), S. 2218–2227.
- Schleifstein, J.L and Coleman, M.B** (1939): An unidentified microorganism resembling *B. lignerie* and *Pasteurella pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. In: *NY State Journal of Medicine* 39, S. 1749–1753.
- Schmid A.; Neumayer, W.; Trülsch, K.; Israel, L.; Imhof, A.; Roessle, M.; Sauer, G.; Richter, S.; Lauw, S.; Eylert, E.; Eisenreich, W.; Heesemann, J.; Wilharm, G.** (2009):

Cross-talk between Type Three Secretion System and Metabolism in *Yersinia*. In: *Journal of Biological Chemistry* 284 (18), S. 12165–12177.

Schmidt, C. W. (2004): Metabolomics: What's happening downstream of DNA. In: *Environmental Health Perspectives* 112 (7), S. 410–415.

Schmitz-Esser, S.; Tischler, P.; Arnold, R.; Montanaro, J.; Wagner, M.; Rattei, T.; Horn, M. (2010): The Genome of the Amoeba Symbiont "*Candidatus Amoebophilus asiaticus*" Reveals Common Mechanisms For Host Cell Interaction among Amoeba-Associated Bacteria. In: *Journal of Bacteriology* 192 (4), S. 1045–1057.

Schneider, J.; Baldwin, A. D.; Kiick, K. L. (2010): Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. In: *Biopolymers* 94 (1), S. 128–140.

Segal, G. and Shuman, H. A. (1999): *Legionella pneumophila* Utilizes the Same Genes To Multiply within *Acanthamoeba castellanii* and Human Macrophages. In: *Infection and Immunity* 67 (5), S. 2117–2124.

Shin, S. and Roy, C. R. (2008): Host cell processes that influence the intracellular survival of *Legionella pneumophila*. In: *Cell Microbiol* 10 (6), S. 1209–1220.

Smith, E. and Morowitz, H. J. (2004): Universality in intermediary metabolism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (36), S. 13168–13173.

Söderberg, M. A.; Rossier, O.; Cianciotto, N. P. (2004): The Type II Protein Secretion System of *Legionella pneumophila* Promotes Growth at Low Temperatures. In: *Journal of Bacteriology* 186 (12), S. 3712–3720.

Song, Y. (2004): Complete Genome Sequence of *Yersinia pestis* Strain 91001, an Isolate Avirulent to Humans. In: *DNA Research* 11 (3), S. 179–197.

Stainier, I.; Iriarte, M.; Cornelis, G. R. (1997): YscM1 and YscM2, two *Yersinia enterocolitica* proteins causing downregulation of yop transcription. In: *Molecular Microbiology* 26 (04), S. 833–843.

Steinbüchel, A. (Hg.) (2005): Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthases: The Key Enzymes of PHA Synthesis. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Steinbüchel, A. and Schlegel, H. G. (1991): Physiology and molecular genetics of poly(?-hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. In: *Mol Microbiol* 5 (3), S. 535–542.

Steinbüchel, A., & Hein, S. (2001). Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 71, 81-123.

Steinert, M. and Hacker, J. (1996): *Legionella pneumophila*: Umweltbakterium und Erreger der Legionärskrankheit. In: *Biologie in unserer Zeit* 26 (1), S. 8–15.

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. In: *Microbiology* 156 (4), S. 1069–1083.

Sturgill-Koszycki, S.; Swanson, M. S. (2000): *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. In: *J Exp Med* 192 (9), S. 1261–1272.

Swanson, M. S. and Isberg, R. R. (1995): Association of *Legionella pneumophila* with the Macrophage Endoplasmic Reticulum. In: *Infect Immun* 63 (9), S. 3609–3620.

- Swanson, M.S., and Hammer, B.K.** (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annu Rev Microbiol*, 54, 567-613.
- Tennant, D. A.; Durán, R. V.; Boulahbel, H.; Gottlieb, E.** (2009): Metabolic transformation in cancer. In: *Carcinogenesis* 30 (8), S. 1269–1280.
- Tesh, M. J. and Miller, R. D.** (1981): Amino Acid Requirements for *Legionella pneumophila* Growth. In: *Journal of Bacteriology* 13 (5), S. 865–869.
- Tesh, M. J.; Morse, S. A.; Miller, R. D.** (1983): Intermediary Metabolism in *Legionella pneumophila*: Utilization of Amino Acids and Other Compounds as Energy Sources. In: *Journal of Bacteriology* 154 (4), S. 1104–1109.
- Thomson, N. R.; Howard, S.; Wren, B. W.; Holden, M. T. G.; Crossman, L.; Challis, G. L.; Churcher, C.; Mungall, K.; Brooks, K.; Chillingworth, T.; Feltwell, T.; Abdellah, Z.; Hauser, H.; Jagels, K.; Maddison, M.; Moule, S.; Sanders, M.; Whitehead, S.; Quail, M.; Dougan, G.; Parkhill, J.; Prentice, M., B.** (2006): The Complete Genome Sequence and Comparative Genome Analysis of the High Pathogenicity *Yersinia enterocolitica* Strain 8081. In: *PLoS Genet* 2 (12), S. e206.
- Tiziani, S.; Lodi, A.; Kahim, F. L.; Viant, M. R.; Bunce, C. M.** (2009): Metabolomic Profiling of Drug Responses in Acute Myeloid Leukaemia Cell Lines. In: *PLoS ONE* 4 (1), S. e4251.
- Toft, C. and Andersson, S. G. E.** (2010): Evolutionary microbial genomics: Insights into bacterial host adaptation. In: *Nature Reviews Genetics* 11, S. 465–475.
- Tolman, J. S. and Valvano, M. A.** (2012): Global changes in gene expression by the opportunistic pathogen *Burkholderia cenocepacia* in response to internalization by murine macrophages. In: *BMC Genomics* 13 (63).
- Trebesius, K.; Harmsen, D.; Rakin, A.; Schmelz, J.; Heesemann, J.** (1998): Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia pestis* species. In: *Journal of Clinical Microbiology* 36 (9), S. 2557–2564.
- Troisfontaines, P.; Cornelis, G. R.** (2005): Type III Secretion: More System than you think. In: *Physiology (Bethesda)* 20, S. 326–339.
- Urbanczyk-Wochniak, E.; Luedemann, A.; Kopka, J.; Selbig, J.; Roessner-Tunali, U.; Willmitzer, L.; Fernie, A. R.** (2003): Parallel analysis of transcript and metabolic profiles: a new approach in systems biology. In: *EMBO Rep* 4 (10), S. 989–993.
- Urwyler, S.; Nyfeler, Y.; Ragaz, C.; Lee, H.; Mueller, L. N.; Aebersold, R.; Hilbi, H.** (2009): Proteome Analysis of *Legionella* Vacuoles Purified by Magnetic Immunoseparation Reveals Secretory and Endosomal GTPases. In: *Traffic* 10 (1), S. 76–87.
- VanSlyke, D. D.** (1942): The Physiology of Amino Acids. In: *Science* 95 (2463), S. 259–263.
- Vazquez-Boland, J. A.; Kuhn, M.; Berche, P.; Chakraborty, T.; Dominguez-Bernal, G.; Goebel, W.; Gonzales-Zorn, Wiehland, J.; Kreft, J.** (2001): *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. In: *Clinical Microbiology Reviews* 14 (3), S. 584–640.
- Verwaest, K. A.; Vu, T. N.; Laukens, K.; Clemens, L. E.; Nguyen, H. P.; VanGasse, B. et al.** (2011): ¹H NMR based metabolomics of CSF and blood serum: A metabolic profile for a transgenic rat model of Huntington disease. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1812 (11), S. 1371–1379.

- Voet, D. and Voet, J. G.; Pratt, C. W.** (2010): Lehrbuch der Biochemie. 2. Aufl. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Vousden, K. H. and Ryan, K. M.** (2009): p53 and metabolism. In: *Nature Reviews Cancer* 9, S. 691–700.
- Wächtershäuser, G.** (1990): Evolution of the first metabolic cycles. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, S. 200–204.
- Warburg, O.** (1956): On the Origin of Cancer Cells. In: *Science* 123, S. 309–314.
- Warren, W.J., & Miller, R.D.** (1979). Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J Clin Microbiol* (10) , 50-55.
- Weber, S. S.; Ragaz, C.; Hilbi, H.** (2009): Pathogen trafficking pathways and host phosphoinositide metabolism. In: *Molecular Microbiology* 71 (6), S. 1341–1352.
- Weiss, E.; Peacock, M. G.; Williams, J. C.** (1980): Glucose and Glutamate Metabolism of *Legionella pneumophila*. In: *Current Microbiology* 4, S. 1–6.
- White, D.** (1995): The Physiology and Biochemistry of Prokaryotes. chapter Solute transport pp. 306-324. New York: Oxford University Press.
- Wiley, D.; Rosqvist, R.; Schesser, K.** (2007): Induction of the *Yersinia* type 3 secretion system as an all-or-none phenomenon. In: *Journal of Molecular Biology* 373 (1), S. 27–37.
- Wilharm, G.; Lehmann, V.; Krauss, K.; Lehnert, B.; Richter, S.; Ruckdeschel, K.; Heesemann, J.; Trülzsch, K.** (2004): *Yersinia enterocolitica* Type III Secretion Depends on the Proton Motive Force but Not on the Flagellar Motor Components MotA and MotB. In: *Infection and Immunity* 72 (7), S. 4004–4009.
- Winiacka-Krusnell, J.; Wreiber, K.; VonEuler, A.; Engstrand, L.; Linder, E.** (2002): Free-living Amoeba Promote Growth and Survival of *Helicobacter pylori*. In: *Scand J Infect Dis* 34 (4), S. 253–256.
- Wise, D.R., DeBerardinis, R.J., Mancuso, A., Sayed, N., Zhang, X.Y., Pfeiffer, H.K., Nissim, I., Daikhin, E., Yudkoff, M., McMahon, S.B., Thompson, C.B.** (2008). Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 18782-7.
- Wise, D.R., Ward, P.S., Shay, J.E., Cross, J.R., Gruber, J.J., Sachdeva, U.M., Platt, J.M., DeMatteo, R.G., Simon, M.C., Thompson, C.B.** (2011). Hypoxia promotes isocitrate dehydrogenase-dependent carboxylation of α -ketoglutarate to citrate to support cell growth and viability. *Proc Natl Acad Sci USA* 108, 19611-6.
- Wölke, S.; Ackermann, N.; Heesemann, J.** (2011): The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins. In: *Cell Microbiol* 13 (9), S. 1339–1357.
- Wood, I. S. and Trayhurn, P.** (2003): Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. In: *BJN* 89 (01), S. 3.
- Zamboni, N. and Sauer, U.** (2009): Novel biological insights through metabolomics and ^{13}C -flux analysis. *Curr Opin Microbiol* 12, 553-8.

Zhao, F. and Keating, A. F. (2007): Functional Properties and Genomics of Glucose Transporters. In: *Current Genomics* 8, S. 113–128.

VII. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1.1	Vorstufen der Aminosäuren sind Intermediate aus dem zentralen Stoffwechsel.....	5
1.2	Rekonstruktion der ¹³ C-Markierungsmuster zentraler Stoffwechselintermediate (modifiziert nach Eisenreich <i>et al.</i> , 1993).....	6
1.3	Hauptwege des Kohlenhydratstoffwechsels in Bakterien (aus Muñoz-Elías and McKinney, 2006).....	11
1.4	Glykolyse und Gluconeogenese im Vergleich (aus Voet <i>et al.</i> , 2010, S. 599).....	12
1.5	Der Citratzyklus und damit verknüpfte anaplerotische Reaktionen (aus Muñoz-Elías and McKinney; 2006).....	13
1.6	Schematische Darstellung des PEP-pyruvat-OAA-Knotenpunkts (aus Sauer und Eikmanns, 2005).....	14
1.7	Abbau von AS zu einem von sieben allgemeinen Stoffwechselintermediaten (aus Voet <i>et al.</i> , 2010; p. 808).....	15
1.8	Umwandlung von Alanin, Cystein, Glycin, Threonin und Serin in Pyruvat (Voet <i>et al.</i> , 2010; S. 809).....	16
1.9	Glutaminolyse (aus McMurry and Begely, 2005, p.236).....	16
1.10	Metabolismus von typischen hetero- und prototrophen Bakterien (aus Eisenreich <i>et al.</i> , 2010).....	17
1.11	Synthese von Alanin, Aspartat und Glutamat (Voet <i>et al.</i> , 2010).....	18
1.12	Serinbiosynthese aus 3-PGA (aus: medicalbiochemistry.org (Zugriffsdatum: 30.3.12)).....	18
1.13	Glycinsynthese aus A : Serin und B : CO ₂ -Fixierung über Glycinsynthase (modifiziert nach: medicalbiochemistry.org (Zugriffsdatum: 30.3.12) und Voet <i>et al.</i> , 2010).....	19
1.14	Der Shikimat-Weg (modifiziert nach Voet <i>et al.</i> , 2010 und Bentley and Haslam, 1990).....	20
1.15	Schematische Darstellung der β-Oxidation (aus Muñoz-Elías and McKinney, 2006).....	21
1.16	Wege der CO ₂ -Fixierung (aus Huber <i>et al.</i> , 2008).....	22
1.17	Physiopathologisches Schema der <i>Yersinia</i> Infektion (aus Sansonetti, 2002).....	26
1.18	Der biphasische Lebenszyklus von <i>L. pneumophila</i> abgeleitet aus Transkriptomdaten (aus Brüggemann <i>et al.</i> ; 2006).....	33
1.19	Reziproke Expression des replikativen und transmissiven Phänotyps von <i>Legionella</i> (aus Molofsky and Swanson, 2004).....	34

1.20	Modell der <i>in vitro</i> Verstoffwechslung von Serin in <i>Lp</i> Paris (aus Eylert <i>et al.</i> , 2010).....	37
1.21	Modell der Glucose-Verstoffwechslung durch <i>Lp</i> Paris in AYE-Medium (aus Eylert <i>et al.</i> , 2010).....	38
1.22	Der Poly-3-Hydroxybutyrat-Stoffwechsel von <i>L. pneumophila</i> Paris (modifiziert aus KEGG-lpp0065 und Steinbüchel and Schlegel, 1991); Stand: April 2012).....	40
1.23	An der <i>Legionella</i> -Infektion beteiligte Wirtszellfaktoren (aus Steinert <i>et al.</i> , 2007).	42
1.24	Der intrazelluläre Lebensstil von cytosolischen Pathogenen (aus Ray <i>et al.</i> , 2009)..	45
1.25	Modell des intrazellulären Metabolismus von <i>L. monocytogenes</i> in Makrophagen (aus Fuchs <i>et al.</i> , 2012).....	48
1.26	Vergleich des Abbaus von Glucose in normalen Zellen und Tumorzellen (aus Moreno-Sánchez <i>et al.</i> , 2007).....	50
1.27	TCA-Zyklus in Tumorzellen; B : Malat/Asp-Shuttle (aus Tennant <i>et al.</i> , 2009).....	51
1.28	Die 7 Stufen zur Tumorgenese und deren Verknüpfung mit dem Metabolismus (Kroemer and Pouyssegur; 2008).....	52
1.29	Das biologische Netzwerk der 4 „-ome“ Domänen (aus Griffin and Shockcor, 2004).....	54
1.39	Zielsetzung – Identifizierung von Schnittstellen zwischen Metabolismus und Virulenz pathogener Bakterien	57
2.1	Zeitpunkte der Zugabe von ¹³ C-markierten Substanzen oder der Ernte der Zellen bei den OD-Versuchen.....	71
2.2	Westernblots.....	73
2.3	Verknüpfung von NMR- und Massendaten am Beispiel PHB.....	84
2.4	Screenshot einer exemplarischen Auswertung (<i>LpP ΔrpoN</i>) am ChenomX-Profiler (als Signalbeispiel ist hier Alanin gewählt).....	87
2.5	SCAN- und SIM-Chromatogramme einer markierten Probe.....	89
2.6	Derivatisierte Aminosäure mit charakteristischem Fragmentierungsmuster im MS (Eylert, 2009).....	90
2.7	Chromatogramm einer markierten <i>Legionella</i> -Probe im SIM-Lauf.....	92
2.8	Struktur von Alginat (aus Baldwin and Kiick, 2010).....	92
2.9	Fragment-Ionen für Mannitol-Hexaacetate (modifiziert nach Higgins <i>et al.</i> , 1994)..	93
3.1	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von <i>Y. enterocolitica</i> und sezernierter YOPS in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	102
3.2	Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Ser und Gly von zellulärem- und sezerniertem Effektor-Protein (YOPS) von	

	<i>Y. enterocolitica</i> unter CaCl ₂ - und EGTA-Bedingungen in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	103
3.3	Verstoffwechslung von Glucose in <i>Y. enterocolitica</i> WT, Δ <i>yscM1/2</i> und Δ <i>ppc</i> (Zahlenwerte sind exemplarisch aus zellulärem Protein).....	103
3.4	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von <i>Y. enterocolitica</i> und sezernierter YOPS in Anwesenheit von 14 mM NaH ¹³ CO ₃	105
3.5	M+1-Markierungsmuster in a) Glutamat, b) Threonin und c) Aspartat. Der schwarze Punkt repräsentiert ein ¹³ C-Atom im Molekülgerüst.....	107
3.6	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von <i>Y. enterocolitica</i> und sezernierter YOPS in Anwesenheit von 2 mM [U- ¹³ C ₅]Glutamin.....	108
3.7	Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Asp und Glu von zellulärem- und sezerniertem Effektor-Protein (YOPS) von <i>Y. enterocolitica</i> unter CaCl ₂ - und EGTA-Bedingungen in Anwesenheit von 2 mM [U- ¹³ C ₅]Glutamin...	110
3.8	Reaktionsnetzwerk des (A) zentralen Kohlenstoffmetabolismus und (B) der Synthese von YOPS in <i>Y. enterocolitica</i> WT und den Deletionsmutanten Δ <i>yscM1</i> , Δ <i>yscM2</i> und Δ <i>ppc</i>	112
3.9	Grad der CO ₂ -Fixierung in <i>Y. enterocolitica</i> WT und Mutanten Δ <i>ppc</i> , Δ <i>yscM1</i> und Δ <i>yscM2</i> in Anwesenheit von 14 mM NaH ¹³ CO ₃	114
3.10	Glycinsynthese über die Glycinsynthase.....	115
3.11	Grad der Glutaminolyse in <i>Y. enterocolitica</i> WT und Mutanten Δ <i>ppc</i> , Δ <i>yscM1</i> und Δ <i>yscM2</i> in Anwesenheit von 2 mM [U- ¹³ C ₅]Gln.....	117
3.12	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose	122
3.13	Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly und des Speicherstoffs PHB von <i>L. pneumophila</i> in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	124
3.14	¹³ C-NMR-Signale von Polyhydroxybutyrat im Dichlormethanextrakt von <i>L. pneumophila</i>	126
3.15	PHB-Menge in <i>Legionella pneumophila</i> Wildtypstamm und Δ <i>keto</i> . Gemessen anhand Infrarotspektroskopie (Heuner, unpublished data).....	127
3.16	(A) Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) und (B) Isotopomer-Zusammensetzung proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> in Anwesenheit von 10 mM [1,2- ¹³ C ₂]Glucose.....	129
3.17	¹³ C-NMR-Signale von Polyhydroxybutyrat im Dichlormethan-extrakt von <i>L. pneumophila</i>	131
3.18	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> in Anwesenheit von 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	133

3.19	Isotopolog-Zusammensetzung der proteinogenen Aminosäuren Ala, Asp, Glu, Gly und des Speicherstoffs PHB von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> in Anwesenheit von 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	136
3.20	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> in Anwesenheit von 0,1% [U- ¹³ C]-Stärke.....	138
3.21	Modell der Glucose-Verstoffwechslung in <i>L. pneumophila</i> WT, Δ keto und Δ zwf, kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [1,2- ¹³ C ₂]Glucose.....	141
3.22	Putatives Modell der Verknüpfung der β -Oxidation der Fettsäuren sowie der Biosynthese von Polyhydroxybutyrat (PHB) in <i>L. pneumophila</i> (Herrmann, 2012).	144
3.23	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> WT in Anwesenheit von (A) 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose und (B) 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin zu verschiedenen Wachstumsphasen.....	152
3.24	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> Δ keto in Anwesenheit von (A) 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose und (B) 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin zu verschiedenen Wachstumsphasen.....	153
3.25	Isotopologzusammensetzung und ¹³ C-Excess-Werte von proteinogenem Ala, Asp, Glu, Gly und Ser aus <i>L. pneumophila</i> WT kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose und 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	156
3.26	¹³ C-NMR Signale der proteinogenen AS Ala, Glu, Ser und Asp in den verschiedenen Wachstumsphasen von <i>L. pneumophila</i> WT kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose oder 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin...	157
3.27	Isotopologzusammensetzung und ¹³ C-ExcessWerte von proteinogenem Ala, Asp, Glu, Gly und Ser aus <i>L. pneumophila</i> Δ keto kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose und 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	158
3.28	¹³ C-Profile von PHB aus den verschiedenen Wachstumsphasen von <i>L. pneumophila</i> WT und Δ keto kultiviert in AYE-Medium, supplementiert mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose oder 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	160
3.29	Wachstumsphasenabhängige Nutzung verschiedenener Kohlenstoffquellen in <i>L. pneumophila</i>	164
3.30	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von <i>A. castellanii</i> in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose vor einer Infektion (prelabelling) mit <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) WT, Δ keto, Δ zwf, Δ fleQ und Δ rpoN, oder ohne Infektion.....	168
3.31	Isotopolog-Zusammensetzung proteinogener AS von <i>A. castellanii</i> mit und ohne Infektion durch <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) WT, Δ keto, Δ zwf, Δ fleQ und Δ rpoN in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose vor Infektion (prelabelling).....	169
3.32	Overall- ¹³ C-Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren und PHB von <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) WT, Δ keto, Δ zwf, Δ fleQ und Δ rpoN replizierend in <i>A. castellanii</i> in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose vor der Infektion (prelabelling).....	172

3.33	Isotopolog-Zusammensetzung proteinogener AS und PHB von <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) WT, $\Delta keto$, Δzwf , $\Delta fleQ$ und $\Delta rpoN$ replizierend in <i>A. castellanii</i> in Anwesenheit von 10 mM [U- $^{13}C_6$]Glucose vor der Infektion (prelabelling).....	173
3.34	Vergleich der ^{13}C -Excess Werte (mol %) von <i>A. castellanii</i> und <i>L. pneumophila</i> ...	174
3.35	Rekonstruierte Stoffflüsse im Infektionsmodell <i>Acanthamoeba castellanii</i> mit <i>Legionella pneumophila</i> mit Vormarkierung von <i>A. castellanii</i> durch Anwesenheit von 10 mM [U- $^{13}C_6$]Glucose im Medium.....	177
3.36	Metabolom-Fingerprint (Aminosäuren, Amide und Zuckerverbindungen) von <i>L. pneumophila</i> Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ sowie <i>L. oakridgensis</i> mittels 1H -NMR.....	180
3.37	Metabolom-Vergleich (Speicherstoffe und Intermediate) zwischen <i>L. pneumophila</i> Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ und <i>L. oakridgensis</i> mittels 1H -NMR.....	181
3.38	Metabolom-Vergleich (Aminosäuren, Amide und Zuckerverbindungen) zwischen <i>L. pneumophila</i> Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ und <i>L. oakridgensis</i> mittels GC/MS.....	184
3.39	Metabolom-Vergleich (Speicherstoffe und Fettsäuren) zwischen <i>L. pneumophila</i> Wildtypstamm und den Deletionsmutanten Δzwf , $\Delta keto$, $\Delta rpoN$, $\Delta fleQ$, $\Delta gamA$ und <i>L. oakridgensis</i> mittels GC/MS.....	185
3.40	Zuordnung der detektierten intrazellulären freien Metabolite im Stoffwechselnetzwerk von <i>Legionella pneumophila</i>	188
3.41	Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von (A) BMM- und (B) J774A.1-Zellen.....	191
3.42	Stoffflüsse rekonstruiert anhand ^{13}C -Profile proteinogener AS gewonnen aus BMM kultiviert mit 10 mM [U- $^{13}C_6$]Glucose.....	195
3.43	^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS aus den Experimenten mit uninfizierten, <i>Lm</i> -infizierten und UV-abgetöteten- <i>Lm</i> -infizierten BMM und J774A.1 kultiviert mit 10 mM [U- $^{13}C_6$]Glucose.....	196
3.44	Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von (A) BMM- und (B) J774A.1-Zellen.....	199
3.45	Stoffflüsse rekonstruiert anhand von ^{13}C -Profilen proteinogener AS gewonnen aus BMM und J774A.1 kultiviert mit 2 mM [U- $^{13}C_5$]Glutamin.....	201
3.46	^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS aus den Experimenten mit uninfizierten, <i>Lm</i> -infizierten und UV-abgetöteten- <i>Lm</i> -infizierten BMM und J774A.1 kultiviert mit 2 mM [U- $^{13}C_5$]Glutamin.....	202

- 3.47** Overall- ^{13}C -Excess (in mol%) proteinogener Aminosäuren von intrazellulär replizierenden *L. monocytogenes* in BMM und J774A.1-Zellen mit **(A)** 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose und **(B)** 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Glutamin..... 205
- 3.48** ^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS von intrazellulär replizierenden *L. monocytogenes* in BMM und J774A.1 kultiviert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose und 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Glutamin..... 206
- 3.49** ^{13}C -Excess-Werte (graue Balken; in mol% (rechte Skala)) und Isotopolog-Zusammensetzung (bunte Balken; in Prozent (linke Skala)) der proteinogenen AS von intrazellulär replizierenden *L. monocytogenes* in BMM und J774A.1 kultiviert mit 10 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose und 2 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_5]$ Glutamin..... 209

VIII. TABELLENVERZEICHNIS

1.1	Isotopologie für [U- ¹³ C ₆]Glucose (modifiziert nach Eisenreich <i>et al.</i> , 1993).....	7
1.2	Isotopologie für [1,2- ¹³ C ₂]Glucose (modifiziert nach Eisenreich <i>et al.</i> , 1993).....	8
1.3	Auftreten der β-Oxidation von Fettsäuren (nach Kunau <i>et al.</i> , 1995).....	21
1.4	Metabolomics-Strategien (nach Dettmer <i>et al.</i> , 2007).....	56
2.1	Zusammensetzung des F12-Powder zur Anzucht von <i>Yersinia enterocolitica</i>	62
2.2	Übersicht der Markierungsexperimente mit <i>Y. enterocolitica</i>	64
2.3	Zusammensetzung PYG-Amöben-Kulturmedium.....	65
2.4	Zusammensetzung des Infektionspuffers für <i>A. castellanii</i> mit <i>L. pneumophila</i> (Eylert <i>et al.</i> ; 2010).....	66
2.5	Verwendete <i>L. pneumophila</i> Stämme.....	67
2.6	Zusammensetzung von CDM- (chemisch definiertes Medium) und AYE (ACES-buffered Yeast Extract)-Flüssigmedien zur Anzucht von <i>Legionella pneumophila</i>	68
2.7	Zusammensetzung BYCE-Medium zur Plattenanzucht von <i>L. pneumophila</i>	69
2.8	RPMI-1640 Medium zur von Makrophagen-Anzucht.....	75
2.9	Zusammensetzung der Puffer PBS und RIPA.....	76
2.10	Zusammensetzung des KPO-Puffers.....	81
2.11	GC/MS Mess-Parameter für 3-HB.....	89
2.12	Fragmente der Aminosäuren im SIM-Lauf (modifiziert nach Eylert, 2009).....	91
2.13	GC/MS-Einstellungen zur Messung von Aminosäuren im SIM-Lauf.....	91
2.14	SCAN- und SIM-Mode für Alginat.....	94
2.15	SCAN-Mode-Einstellungen zu Messung polarer Metabolite.....	96
3.1	% ¹³ C ¹³ C und % ¹³ C-Überschuss von Ala, Asp und Glu aus <i>L. pneumophila</i> WT in CDM in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	125
3.2	% ¹³ C ¹³ C und % ¹³ C-Überschuss von PHB aus <i>L. pneumophila</i> WT in CDM, Δzwf und $\Delta keto$ in AYE-Medium in Anwesenheit von 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	126
3.3	% ¹³ C ¹³ C und % ¹³ C-Überschuss von PHB aus <i>L. pneumophila</i> WT, Δzwf und $\Delta keto$ in AYE-Medium in Anwesenheit von 10 mM [1,2- ¹³ C ₂]Glucose.....	131
3.4	Isotopomerzusammensetzung von <i>L. pneumophila</i> WT und $\Delta keto$ kultiviert in AYE-Medium supplementiert mit 0,1% [U- ¹³ C]-Fettsäuren.....	139
3.5	¹³ C-Excess-Werte nicht-essentieller, proteinogener Aminosäuren von BMM mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	190
3.6	¹³ C-Excess-Werte nicht-essentieller, proteinogener Aminosäuren von J774A.1 mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	192

3.7	¹³ C-Excess-Werte nicht-essentieller, proteinogener Aminosäuren von BMM und J774A.1 mit 2 mM [U- ¹³ C ₅]Glutamin.....	199
3.8	³ C-Excess-Werte proteinogener Aminosäuren von cytosolisch replizierenden <i>L. monocytogenes</i> in BMM und J774A.1 mit 10 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	204
A.1	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) aus CaCl ₂ -Experimenten mit [U- ¹³ C ₆]Glc.....	249
A.2	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) aus EGTA-Experimenten mit [U- ¹³ C ₆]Glc.....	249
A.3	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) der YOPS gewonnen aus EGTA-Experimenten mit [U- ¹³ C ₆]Glc.....	250
A.4	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) aus CaCl ₂ -Experimenten mit 14 mM NaH ¹³ CO ₃	250
A.5	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) aus EGTA-Experimenten mit 14 mM NaH ¹³ CO.....	251
A.6	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) der YOPS gewonnen aus EGTA-Experimenten mit 14 mM NaH ¹³ CO ₃	252
A.7	³ C-Excess-Werte (in mol%) aus CaCl ₂ -Experimenten mit 2 mM [U- ¹³ C ₅]Gln.....	252
A.8	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) aus EGTA-Experimenten mit 2 mM [U- ¹³ C ₅]Gln. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.....	253
A.9	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) der YOPS gewonnen aus EGTA-Experimenten mit 2mM [U- ¹³ C ₅]Gln.....	253
A.10.A	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glc.....	254
A.10.B	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glc.....	255
A.11.A	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [1,2- ¹³ C ₂]Glc.....	255
A.11.B	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. oakridgensis</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [1,2- ¹³ C ₂]Glc.....	256
A.12	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. oakridgensis</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [1,2- ¹³ C ₂]Glc.....	256
A.13.A	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	257
A.13.B	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> und <i>L. oakridgensis</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	258
A.14	³ C-NMR-Signale von <i>L. pneumophila</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	259
A.15	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 0,1% U- ¹³ C-Stärke.....	259
A.16	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 0,1% U- ¹³ C-Fettsäuren.....	260
A.17.A	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> WT gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit	

	11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	260
A.17.B	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> WT gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	261
A.18	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> Δ keto gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	261
A.19	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> WT gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	262
A.20	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> Δ keto gewonnen aus <i>in vitro</i> Experimenten mit 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	262
A.21	¹³ C-NMR-Signale gewonnen aus <i>L. pneumophila</i> WT zu verschiedenen Wachstumsphasen im AYE-Medium supplementiert mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose oder 3 mM [U- ¹³ C ₃]Serin.....	263
A.22	¹³ C-NMR-Signale von PHB aus <i>L. pneumophila</i> WT zu verschiedenen Wachstumsphasen im AYE-Medium, supplementiert mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	264
A.23	¹³ C-NMR-Signale von PHB aus <i>L. pneumophila</i> Δ keto zu verschiedenen Wachstumsphasen im AYE-Medium, supplementiert mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose.....	264
A.24.A	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>A. castellanii</i> gewonnen aus <i>in vivo</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose und mit und ohne Infektion durch <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) WT und Δ keto.....	265
A.24.B	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>A. castellanii</i> gewonnen aus <i>in vivo</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose und mit Infektion durch <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) Δ zwf, Δ fleQ und Δ rpoN.....	265
A.25.A	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) gewonnen aus <i>in vivo</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose replizierend in <i>A. castellanii</i>	266
A.25.B	¹³ C-Excess-Werte (in mol%) von <i>L. pneumophila</i> (<i>Lp</i>) gewonnen aus <i>in vivo</i> Experimenten mit 11 mM [U- ¹³ C ₆]Glucose replizierend in <i>A. castellanii</i>	266

IX. ANHANG

1. *Yersinia enterocolitica*1.1. [U-¹³C₆]Glucose-Experimente**Tabelle A.1:** ¹³C-Excess-Werte (in mol%) aus CaCl₂-Experimenten mit [U-¹³C₆]Glc. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

	WA-314 WT				Δppc				$\Delta yscM1$				$\Delta yscM2$			
	I		II		I		II		I		II		I		II	
Ala	25,9	0,1	24,2	0,1	23,2	0,1	23,3	0,1	24,6	0,0	28,2	0,0	24,0	0,0	25,0	0,0
Asp	22,0	0,1	21,3	0,1	5,6	0,0	6,6	0,1	19,5	0,0	19,1	0,1	18,9	0,1	16,8	0,0
Glu	28,8	0,0	20,4	0,1	12,4	0,0	10,4	0,1	25,1	0,0	29,9	0,0	23,5	0,1	16,4	0,1
Gly	16,2	0,1	14,7	0,1	7,8	0,0	6,9	0,3	7,5	0,0	6,5	0,0	6,6	0,0	4,2	0,0
His	2,7	0,2	0,9	0,1	0,9	0,0	1,3	0,1	0,6	0,1	0,6	0,0	0,5	0,0	0,6	0,0
Ile	14,1	0,0	13,9	0,0	4,7	0,0	6,4	0,1	7,2	0,1	5,8	0,0	6,7	0,0	3,9	0,0
Leu	1,9	0,0	2,3	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Lys	4,5	0,4	4,7	0,0	0,9	0,1	1,5	0,0	2,0	0,3	2,4	0,1	1,8	0,1	1,4	0,1
Phe	9,1	0,1	9,4	0,0	2,9	0,0	2,2	0,3	1,1	0,2	1,4	0,1	0,7	0,1	0,8	0,0
Pro	0,2	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,6	0,7	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0
Ser	38,8	0,1	37,2	0,4	25,4	0,2	28,7	0,3	31,0	0,1	25,0	0,1	30,3	0,1	23,4	0,0
Thr	13,7	0,5	14,7	0,1	1,4	0,1	3,0	0,1	5,2	0,2	4,3	0,3	4,4	0,1	1,8	0,4
Tyr	10,7	2,9	11,9	1,0	1,8	0,5	2,2	1,2	3,7	0,5	2,6	0,1	2,5	0,5	1,4	0,1
Val	11,3	0,0	6,7	0,0	6,6	0,0	3,6	0,1	5,4	0,0	11,7	0,0	3,9	0,0	1,7	0,0

Tabelle A.2: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) aus EGTA-Experimenten mit [U-¹³C₆]Glc. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

	WA-314 WT				Δppc				$\Delta yscM1$				$\Delta yscM2$			
	I		II		I		II		I		II		I		II	
Ala	24,9	0,1	23,8	0,0	20,2	0,0	21,8	0,1	26,5	0,0	26,9	0,1	27,9	0,1	27,5	0,0
Asp	20,9	0,1	19,1	0,0	4,8	0,0	5,3	0,0	16,4	0,0	16,2	0,2	16,8	0,1	15,3	0,2
Glu	27,5	0,0	19,3	0,1	10,3	0,0	10,1	0,0	28,6	0,1	18,3	0,1	29,6	0,0	17,7	0,1
Gly	14,5	0,0	9,6	0,1	9,3	0,0	4,8	0,2	4,9	0,0	3,3	0,1	5,4	0,0	2,7	0,1
His	1,0	0,0	1,4	0,0	0,8	0,0	2,1	0,1	0,4	0,0	1,3	0,8	0,5	0,0	0,6	0,0
Ile	12,5	0,0	10,5	0,0	4,0	0,0	4,5	0,0	4,4	0,0	3,1	0,0	4,4	0,0	3,7	1,3
Leu	0,8	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Lys	4,5	0,1	4,2	0,1	0,8	0,1	1,2	0,0	2,0	0,2	1,7	0,0	1,9	0,1	1,7	0,0
Phe	7,0	0,1	3,9	0,0	3,4	0,0	3,2	0,1	0,9	0,0	1,1	0,1	0,9	0,1	1,1	0,3
Pro	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0
Ser	35,4	0,3	33,9	0,0	20,5	0,1	19,9	0,3	21,9	0,0	18,0	0,1	24,2	0,3	16,9	0,0
Thr	11,8	0,4	9,2	0,4	1,8	0,1	1,7	0,2	3,0	0,4	1,2	0,1	2,3	0,3	0,9	0,1
Tyr	7,8	1,7	6,9	0,2	1,2	0,3	1,5	0,4	1,2	0,2	1,3	0,3	0,9	0,2	1,5	0,2
Val	6,6	0,0	3,9	0,0	6,3	0,0	5,5	0,0	2,7	0,0	1,5	0,0	2,6	0,0	1,1	0,0

Tabelle A.3: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) der YOPS gewonnen aus EGTA-Experimenten mit $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glc}$. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

	WA-314 WT				Δppc				$\Delta yscM1$				$\Delta yscM2$				
	I		II		I		II		I		II		I		II		
Ala	9,3	0,5			14,6	1,1	16,9	0,7	26,1	0,2	28,5	0,2	28,1	1,2	24,9	0,3	
Asp	11,0	0,4	12,9	6,0	2,8	0,5	9,2	0,5	16,7	1,8	21,2	1,0	17,7	1,9	14,6	3,3	
Glu	1,9	0,0	6,5	2,3	0,3	0,1	0,8	0,0	2,9	0,1	4,4	0,9	2,1	0,1	2,3	0,4	
Gly	5,9	0,1	5,1	1,0	6,4	0,6	6,8	0,0	4,8	0,0	3,1	0,6	5,9	0,3	3,1	0,5	
His			2,1	0,7	0,5	0,9										3,7	0,9
Ile	8,4	0,6	5,2	0,1	6,3	1,1	9,2	0,1	9,1	1,2	6,8	1,9	9,0	0,5	8,2	0,4	
Leu	0,5	0,0	0,3	0,3	0,9	0,7	1,8	0,5	0,9	0,1	2,3	0,5	0,4	0,2	1,1	0,8	
Lys	1,0	1,1	1,2	0,3	0,1	0,2	0,3	0,0	0,7	0,3	0,5	0,5	0,3	0,4	0,1	0,1	
Phe	8,0	0,8	1,8	0,6													
Pro	6,7	2,6	14,6	5,4			30,7	0,5	10,7	2,4	9,2	1,4	39,2	6,5	14,6	7,3	
Ser	8,6	0,1	20,0	0,5	20,3	0,7	24,1	0,2			34,1	0,4			24,9	1,4	
Thr	0,8	0,1	1,4	0,4													
Tyr	5,6	1,8															
Val	4,1	0,1	1,8	0,2	5,0	1,4	5,6	0,4	1,8	0,1	3,0	2,5	1,9	0,7	2,6	1,0	

1.2. $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ -Experimente

Tabelle A.4: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) aus CaCl_2 -Experimenten mit 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

	WT		ppc		yscM1		yscM2	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Ala	0,08 %	0,17 %	0,10 %	0,13 %	0,05 %	0,22 %	0,10 %	0,23 %
Asp	3,61 %	3,45 %	0,09 %	0,17 %	3,21 %	4,10 %	3,49 %	3,76 %
Glu	1,31 %	1,45 %	0,11 %	0,11 %	1,18 %	1,64 %	1,41 %	1,41 %
Gly	1,32 %	1,21 %	1,59 %	1,94 %	1,11 %	2,01 %	1,38 %	1,67 %
His	0,23 %	0,24 %	0,23 %	0,09 %	0,16 %	0,15 %	0,10 %	0,14 %
Ile	0,72 %	0,54 %	0,08 %	0,05 %	0,50 %	0,42 %	0,66 %	0,41 %
Leu	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,00 %	0,01 %	0,01 %	0,01 %	0,02 %
Lys	0,41 %	0,39 %	0,11 %	0,08 %	0,25 %	0,29 %	0,33 %	0,27 %
Phe	0,24 %	0,07 %	0,17 %	0,17 %	0,21 %	0,08 %	0,20 %	0,09 %
Pro	0,31 %	0,12 %	0,10 %	0,11 %	0,31 %	0,12 %	0,36 %	0,22 %
Ser	0,13 %	0,11 %	0,12 %	0,17 %	0,17 %	0,14 %	0,12 %	0,12 %
Thr	3,37 %	2,31 %	0,70 %	0,53 %	2,08 %	2,03 %	2,50 %	1,86 %
Tyr	0,31 %	0,08 %	0,35 %	0,05 %	0,58 %	0,11 %	0,38 %	0,10 %
Val	0,17 %	0,03 %	0,14 %	0,06 %	0,13 %	0,09 %	0,13 %	0,08 %

Tabelle A.5: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) aus EGTA-Experimenten mit 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

	WT		ppc		yScM1		yScM2	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Ala	0,13 %	0,18 %	0,06 %	0,05 %	0,12 %	0,26 %	0,15 %	0,25 %
Asp	3,48 %	3,64 %	0,00 %	0,15 %	2,99 %	3,61 %	3,36 %	3,69 %
Glu	1,26 %	1,50 %	0,06 %	0,08 %	1,10 %	1,52 %	1,36 %	1,65 %
Gly	1,11 %	1,27 %	1,10 %	1,57 %	0,99 %	1,84 %	1,27 %	1,86 %
His	0,21 %	0,16 %	0,23 %	0,11 %	0,07 %	0,11 %	0,06 %	0,29 %
Ile	0,81 %	0,74 %	0,07 %	0,06 %	0,37 %	0,23 %	0,45 %	0,39 %
Leu	0,03 %	0,02 %	0,02 %	0,02 %	0,01 %	0,00 %	0,00 %	0,02 %
Lys	0,62 %	0,47 %	0,15 %	0,12 %	0,29 %	0,21 %	0,25 %	0,36 %
Phe	0,17 %	0,07 %	0,13 %	0,07 %	0,11 %	0,08 %	0,05 %	0,06 %
Pro	0,22 %	0,12 %	0,24 %	0,19 %	0,20 %	0,16 %	0,79 %	0,39 %
Ser	0,15 %	0,13 %	0,16 %	0,11 %	0,22 %	0,11 %	0,14 %	0,15 %
Thr	3,07 %	2,92 %	0,87 %	0,74 %	2,03 %	1,36 %	2,06 %	1,64 %
Tyr	0,13 %	0,21 %	0,20 %	0,08 %	0,11 %	0,07 %	0,15 %	0,27 %
Val	0,10 %	0,10 %	0,12 %	0,07 %	0,11 %	0,05 %	0,09 %	0,10 %

Tabelle A.6: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) der YOPS gewonnen aus EGTA-Experimenten mit 14 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

	WT		ppc		yScM1		yScM2	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Ala	2,08 %	0,38 %	0,13 %	0,68%	0,76 %	1,01%	0,39 %	1,16 %
Asp	5,16 %	4,47 %	0,49 %	0,21%	5,79 %	6,91%	4,98 %	6,50 %
Glu	0,16 %	0,14 %	0,03 %	0,03%	0,24 %	0,34%	0,28 %	0,22 %
Gly	4,40 %	4,02 %	5,00 %	5,05%	4,27 %	5,85%	3,61 %	4,91 %
His								
Ile	3,12 %	1,45 %	2,04 %	0,19%	0,98 %	1,03%	0,99 %	0,83 %
Leu	0,25 %	0,36 %	0,17 %	0,27%	0,12 %	0,06%	0,08 %	0,07 %
Lys								
Phe	2,12 %	3,74 %	1,67 %	2,70%	2,69 %	3,00%	1,79 %	2,46 %
Pro								
Ser		0,03 %	0,14 %	0,04%	0,12 %	0,22%	0,04 %	0,72 %
Thr			0,00 %	3,27%		4,58%		5,16 %
Tyr	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %	0,00 %
Val	0,83 %	1,52 %	0,11 %	0,96%	0,52 %	0,59%	0,14 %	1,41 %

1.3. [U-¹³C₅]Glutamin-Experimente**Tabelle A.7:** ¹³C-Excess-Werte (in mol%) aus CaCl₂-Experimenten mit 2 mM [U-¹³C₅]Gln. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

	WA-314 WT				Δppc				$\Delta yscM1$				$\Delta yscM2$			
	I		II		I		II		I		II		I		II	
Ala	0,5	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,3	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0	0,4	0,0
Asp	2,8	0,0	2,9	0,1	6,0	0,1	6,9	0,0	2,5	0,0	2,5	0,0	2,5	0,1	2,7	0,0
Glu	25,2	0,1	13,7	0,1	19,9	0,1	18,2	0,0	10,4	0,1	12,1	0,0	11,9	0,1	12,2	0,1
Gly	0,4	0,0	0,1	0,0	0,4	0,0	0,1	0,0	0,3	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
His	0,2	0,1	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
Ile	0,7	0,0	0,7	0,0	0,8	0,0	1,0	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,1	0,0	0,2	0,0
Leu	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0
Lys	0,6	0,1	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	0,2	0,0	0,0	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0
Phe	0,2	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0
Pro	0,2	0,1	1,5	0,6	0,3	0,0	1,6	0,5	0,7	0,0	1,5	0,6	0,9	0,0	2,3	0,6
Ser	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,1	0,2	0,1
Thr	2,8	1,3	1,3	0,6	3,5	0,2	2,3	1,4	0,8	0,1	1,0	0,1	0,5	0,2	2,2	0,1
Tyr	0,4	0,1	0,7	0,5	0,1	0,0	0,5	0,3	0,1	0,0	0,3	0,0	0,2	0,1	0,3	0,0
Val	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0

Tabelle A.8: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) aus EGTA-Experimenten mit 2 mM [U-¹³C₅]Gln. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

	WA-314 WT				Δppc				$\Delta yscM1$				$\Delta yscM2$			
	I		II		I		II		I		II		I		II	
Ala	0,3	0,0	0,3	0,0	0,3	0,0	0,2	0,0	0,5	0,0	0,4	0,1	0,4	0,0	0,4	0,0
Asp	2,7	0,0	2,8	0,1	6,4	0,0	6,6	0,1	2,7	0,0	2,6	0,1	2,5	0,0	2,7	0,0
Glu	13,9	0,1	12,3	0,1	13,7	0,1	15,3	0,1	12,5	0,0	12,3	0,0	11,7	0,1	13,3	0,1
Gly	0,2	0,1	0,3	0,1	0,3	0,1	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0	0,2	0,0
His	0,2	0,2	0,1	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,5	0,1	0,1	0,0	0,5	0,1
Ile	0,6	0,0	0,6	0,0	0,3	0,0	0,7	0,0	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,3	0,0
Leu	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0
Lys	0,2	0,1	0,3	0,0	0,2	0,0	1,4	0,4	0,2	0,0	0,3	0,1	0,2	0,0	1,9	0,9
Phe	0,2	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	1,3	0,9	0,1	0,0	0,5	0,3
Pro	0,4	0,1	0,2	0,0	0,3	0,1	0,4	0,2	0,8	0,0	0,6	0,1	0,9	0,1	0,5	0,1
Ser	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	0,0	0,2	0,2	0,2	0,0	0,1	0,2
Thr	1,2	0,3	1,4	0,4	2,5	0,3	3,6	0,7	0,5	0,2	1,6	0,0	0,5	0,3	1,1	1,0
Tyr	0,8	0,7	0,2	0,1	0,1	0,1	0,6	0,3	0,1	0,1	1,1	0,3	0,1	0,0	0,7	0,7
Val	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1	0,0	0,0	0,1	0,1

Tabelle A.9: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) der YOPS gewonnen aus EGTA-Experimenten mit 2mM [U- $^{13}\text{C}_5$]Gln. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

	WA-314 WT				Δppc				$\Delta yscM1$				$\Delta yscM2$			
	I		II		I		II		I		II		I		II	
Ala	1,0	0,3	0,8	0,4	1,4	0,3	0,1	0,0	1,2	0,1	0,6	0,2	0,7	0,1	0,8	0,3
Asp	4,1	0,0	4,1	0,3	8,7	0,3	0,1	0,0	4,8	0,1	5,3	0,6	4,0	0,1	4,8	0,2
Glu	90,6	0,2	87,5	0,0	91,9	0,0	7,5	0,1	91,0	0,0	90,6	0,1	85,6	0,3	90,2	0,0
Gly	4,2	0,2	2,3	0,1	4,9	0,2	0,2	0,0	4,1	0,9	2,6	0,2	3,7	0,3	1,9	0,3
His	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ile	0,6	0,0	1,6	0,2	0,5	0,2	0,1	0,0	0,0	0,0	0,8	0,2	0,3	0,2	0,6	0,5
Leu	0,3	0,2	0,4	0,2	0,3	0,0	0,0	0,0	0,4	0,1	0,3	0,1	0,1	0,0	2,1	1,3
Lys	0,0	0,0	0,0	0,0	0,4	0,6	0,0	0,0	0,2	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	1,8
Phe	1,3	0,1	3,4	2,1	1,8	0,8	0,2	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,3	0,1	2,5	0,5
Pro	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,5	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ser	0,5	0,1	0,4	0,4	0,7	0,2	0,1	0,0	0,4	0,1	0,7	0,3	0,3	0,0	0,5	0,1
Thr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,8	0,2	0,0	0,0	0,0	0,0	4,7	0,5	0,0	0,0
Tyr	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	2,4	0,3	0,0	0,0	0,0	0,0
Val	1,0	0,2	1,3	0,6	1,4	0,4	0,0	0,0	1,0	0,2	1,6	0,7	0,4	0,1	0,5	0,6

2. *Legionella pneumophila* und *Legionella oakridgensis*

2.1. Experimente mit [U- $^{13}\text{C}_6$]Glucose

Tabelle A.10A: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM [U- $^{13}\text{C}_6$]Glc. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

	<i>L. pneumophila</i> Paris					
	WT - CDM 1	WT - CDM 2	Δzwf	$\Delta keto$ 1	$\Delta keto$ 2	$\Delta keto$ 3
Ala	6,70 ± 0,21	6,56 ± 0,25	0,42 ± 0,19	5,48 ± 0,04	9,74 ± 0,10	10,53 ± 0,04
Asp	0,57 ± 0,07	0,57 ± 0,12	0,14 ± 0,07	2,31 ± 0,10	2,98 ± 0,09	3,04 ± 0,11
Glu	1,28 ± 0,19	1,29 ± 0,20	0,20 ± 0,16	3,72 ± 0,14	5,20 ± 0,06	5,05 ± 0,04
Gly	0,15 ± 0,11	0,17 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,11 ± 0,07	0,10 ± 0,03	0,17 ± 0,05
His	0,09 ± 0,05	0,07 ± 0,05	0,69 ± 0,16	0,85 ± 1,51	0,30 ± 0,05	0,08 ± 0,05
Leu	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02	0,16 ± 0,10	0,22 ± 0,07	0,00 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Ile	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,13 ± 0,06	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,01	0,01 ± 0,01
Lys	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01	1,87 ± 1,21	0,09 ± 0,06	0,23 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Phe	0,16 ± 0,03	0,16 ± 0,05	0,79 ± 0,48	0,10 ± 0,02	0,07 ± 0,03	0,19 ± 0,04
Pro	0,47 ± 0,17	0,32 ± 0,09	0,72 ± 0,41	2,48 ± 1,81	0,45 ± 0,09	0,07 ± 0,01
Ser	0,17 ± 0,06	0,25 ± 0,09	1,57 ± 1,53	0,04 ± 0,03	0,25 ± 0,06	0,15 ± 0,03
Thr	0,51 ± 0,16	0,44 ± 0,14	0,00 ± 0,00	0,45 ± 0,16	0,50 ± 0,13	0,72 ± 0,15
Tyr	0,09 ± 0,05	0,07 ± 0,06	1,36 ± 0,54	0,18 ± 0,10	0,10 ± 0,07	0,24 ± 0,09
Val	0,03 ± 0,05	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,24	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01	0,10 ± 0,04
PHB	4,55 ± 0,12	2,46 ± 0,20	0,80 ±	1,07 ± 0,03	2,70 ± 0,00	1,04 ± 0,02

Tabelle A.10B: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glc}$. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

	<i>L. pneumophila</i> Paris				<i>L. oakridgensis</i>	
	$\Delta rpoN$ 1	$\Delta rpoN$ 2	$\Delta fleQ$ 1	$\Delta fleQ$ 2	1	2
Ala	10,83 \pm 0,11	11,56 \pm 0,11	10,11 \pm 0,04	8,30 \pm 0,11	0,10 \pm 0,03	0,07 \pm 0,01
Asp	2,60 \pm 0,25	2,95 \pm 0,03	2,28 \pm 0,01	2,36 \pm 0,12	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
Glu	5,16 \pm 0,03	6,03 \pm 0,04	4,14 \pm 0,02	3,87 \pm 0,10	0,09 \pm 0,03	0,06 \pm 0,02
Gly	0,20 \pm 0,06	0,36 \pm 0,01	0,17 \pm 0,03	0,22 \pm 0,01	0,00 \pm 0,01	0,10 \pm 0,06
His	\pm	\pm	0,29 \pm 0,24	\pm	\pm	0,12 \pm 0,11
Leu	0,02 \pm 0,01	0,10 \pm 0,04	0,10 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01
Ile	0,02 \pm 0,03	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,02 \pm 0,02	0,03 \pm 0,03
Lys	\pm	0,46 \pm 0,27	0,09 \pm 0,08	\pm	\pm	0,10 \pm 0,04
Phe	0,24 \pm 0,08	0,47 \pm 0,26	0,44 \pm 0,25	0,08 \pm 0,02	0,15 \pm 0,03	1,64 \pm 0,97
Pro	0,38 \pm 0,01	0,19 \pm 0,07	0,21 \pm 0,08	0,22 \pm 0,12	0,16 \pm 0,04	0,16 \pm 0,08
Ser	0,31 \pm 0,36	0,13 \pm 0,07	0,09 \pm 0,02	0,49 \pm 0,37	0,28 \pm 0,22	0,12 \pm 0,03
Thr	0,97 \pm 0,61	0,83 \pm 0,10	0,65 \pm 0,32	0,89 \pm 0,59	0,85 \pm 0,32	0,77 \pm 0,07
Tyr	0,41 \pm 0,23	1,04 \pm 0,59	0,95 \pm 0,22	0,84 \pm 0,13	0,29 \pm 0,12	1,71 \pm 0,83
Val	0,05 \pm 0,08	0,10 \pm 0,05	0,02 \pm 0,02	0,05 \pm 0,05	0,02 \pm 0,02	\pm
PHB	9,02 \pm 0,01	11,09 \pm 0,04	9,21 \pm 0,02	8,68 \pm 0,04	0,26 \pm 0,05	0,14 \pm 0,03

2.2. Experimente mit [1,2-¹³C₂]Glucose**Tabelle A.11.A:** ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM [1,2-¹³C₂]Glc. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>L. pneumophila</i> Paris							
	WT	$\Delta_{zwf\ 1}$	$\Delta_{zwf\ 2}$	$\Delta_{keto\ 1}$	$\Delta_{keto\ 2}$	$\Delta_{keto\ 3}$	$\Delta_{keto\ 4}$
Ala	3,80 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,22 ± 0,02	2,85 ± 0,04	2,11 ± 0,01	2,85 ± 0,03	2,46 ± 0,04
Asp	0,54 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,51 ± 0,01	0,50 ± 0,06	0,45 ± 0,06	0,41 ± 0,05
Glu	1,41 ± 0,04	0,25 ± 0,03	0,21 ± 0,05	1,05 ± 0,07	0,92 ± 0,08	1,13 ± 0,04	1,06 ± 0,08
Gly	0,14 ± 0,02	0,05 ± 0,04	0,01 ± 0,02	0,20 ± 0,04	0,04 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,14 ± 0,04
His	0,13 ± 0,04	0,17 ± 0,08	0,06 ± 0,01	±	±	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Leu	0,02 ± 0,02	0,04 ± 0,06	0,04 ± 0,06	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,15 ± 0,14	0,08 ± 0,01
Ile	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,01 ± 0,01
Lys	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01	±	±	0,10 ± 0,05	0,09 ± 0,01
Phe	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,03	0,15 ± 0,04	0,07 ± 0,05	0,05 ± 0,03
Pro	0,33 ± 0,09	0,02 ± 0,02	0,62 ± 0,13	0,18 ± 0,03	0,18 ± 0,10	0,77 ± 0,17	0,65 ± 0,11
Ser	0,06 ± 0,01	0,00 ± 0,00	0,19 ± 0,01	0,22 ± 0,06	0,06 ± 0,10	0,51 ± 0,19	0,40 ± 0,12
Thr	0,34 ± 0,07	1,88 ± 0,32	0,44 ± 0,05	0,43 ± 0,13	0,78 ± 0,25	0,47 ± 0,16	0,30 ± 0,07
Tyr	0,25 ± 0,17	0,13 ± 0,10	0,06 ± 0,03	0,21 ± 0,14	0,16 ± 0,04	0,08 ± 0,02	0,06 ± 0,02
Val	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,02	0,01 ± 0,01
PHB	2,46 ± 0,13	±	2,70 ± 0,00	0,41 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,03	0,38 ± 0,02

Tabelle A.11.B: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. oakridgensis* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM [1,2-¹³C₂]Glc. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>L. oakridgensis</i>					
	1		2		
Ala	0,07	± 0,04	0,06	± 0,03	
Asp	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Glu	0,05	± 0,04	0,04	± 0,02	
Gly	0,02	± 0,03	0,00	± 0,01	
His	3,06	± 0,76	0,77	± 0,19	
Leu	0,01	± 0,01	0,02	± 0,02	
Ile	0,02	± 0,01	0,01	± 0,01	
Lys	0,00	± 0,00	0,00	± 0,00	
Phe	0,14	± 0,02	0,07	± 0,03	
Pro	0,20	± 0,05	0,21	± 0,02	
Ser	0,45	± 0,19	0,07	± 0,12	
Thr	0,45	± 0,07	0,87	± 0,25	
Tyr	0,25	± 0,11	0,06	± 0,05	
Val	0,03	± 0,03	0,02	± 0,02	
PHB		±		±	

Tabelle A.12.: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. oakridgensis* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM $[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glc}$. K: Kopplungskonstante (in hz).

		$[1,2-^{13}\text{C}_2]\text{Glc}$							
		WT		Δzwf			$\Delta keto$		
Position	X-Gruppen	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
Ala	1 10X	23,3	0,8		100				
	11X	76,7	2,7		0		54	65,5	4,26
	2 010	19,2	0,63		100			29,38	0,72
	110	81,8	2,7		0		54	70,62	1,73
	011	-			0			0	
	111	-			0			0	
	3 X01	-			81,9	0,50		0	
	X11	-		55,1	18,1	0,11		0	
Asp	1 10XX	100	0,55		0			100	1,24
	11XX	-			0			0	
	2 010X	-			0			0	
	110X	-			0			0	
	011X	-			0			0	
	111X	-			0			0	
	3 X010	-			0			0	
	X110	-			0			0	
	X011	-			0			0	
	X111	-			0			0	
	4 XX01	100	0,55		0			100	1,32
	XX11	-			-			0	
	Glu	1 10XXX	-			-			100
11XXX		-			-			0	
2 010XX		-			-			100	
110XX		-			-			0	
011XX		-			-			0	
111XX		-			-			0	
3 X010X		-			-			100	
X011X		-			-			0	
X110X		-			-			0	
X111X		-			-			0	
4 XX010		-			-			85,93	0,45
XX011		-			-		54,2	14,07	0,08
XX110		-			-			0	
XX111		-			-			0	
5 XXX01		100	3,9		-			96,3	3,98
XXX11		-			-		54	3,7	0,23

2.3. Experimente mit [U-¹³C₃]Serin**Tabelle A.13.A:** ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 3 mM [U-¹³C₃]Serin. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>L. pneumophila</i> Paris							
	WT					Δ keto	
	AYE 1	AYE 2	CDM 1	CDM 2	CDM 3	1	2
Ala	7,20 ± 0,04	7,29 ± 0,02	11,80 ± 0,18	27,04 ± 0,19	27,26 ± 0,07	6,82 ± 0,03	7,06 ± 0,03
Asp	1,67 ± 0,03	1,64 ± 0,05	3,22 ± 0,06	6,29 ± 0,04	6,23 ± 0,08	1,36 ± 0,03	1,33 ± 0,02
Glu	3,50 ± 0,03	3,58 ± 0,04	2,43 ± 0,03	4,78 ± 0,04	4,69 ± 0,05	2,64 ± 0,01	2,66 ± 0,09
Gly	2,57 ± 0,04	2,58 ± 0,01	4,41 ± 0,10	8,98 ± 0,30	8,93 ± 0,26	1,75 ± 0,03	1,68 ± 0,02
His	0,04 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,16 ± 0,04	0,13 ± 0,11	0,16 ± 0,13	0,68 ± 0,19	0,83 ± 0,40
Leu	0,21 ± 0,07	0,14 ± 0,06	0,15 ± 0,02	0,15 ± 0,19	0,43 ± 0,23	0,45 ± 0,03	0,59 ± 0,47
Ile	0,04 ± 0,03	0,06 ± 0,05	0,20 ± 0,00	0,08 ± 0,07	0,22 ± 0,32	0,11 ± 0,19	0,15 ± 0,25
Lys	0,11 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,46 ± 0,02	0,22 ± 0,21
Phe	0,07 ± 0,03	0,09 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,18 ± 0,02	0,18 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,03
Pro	1,12 ± 0,27	0,90 ± 0,19	3,81 ± 0,69	0,40 ± 0,26	0,45 ± 0,30	0,40 ± 0,03	0,23 ± 0,20
Ser	18,92 ± 0,44	19,15 ± 0,32	14,95 ± 0,52	35,39 ± 0,47	35,60 ± 0,28	15,20 ± 0,25	15,41 ± 0,09
Thr	0,50 ± 0,07	0,52 ± 0,06	0,44 ± 0,09	0,78 ± 0,28	0,59 ± 0,15	0,35 ± 0,18	0,33 ± 0,28
Tyr	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,07	0,10 ± 0,04	0,12 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,10 ± 0,04
Val	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,03 ± 0,02	0,01 ± 0,01
PHB	2,06 ± 0,01	2,18 ± 0,04	2,63 ± 0,02	9,28 ± 0,04	9,70 ± 0,02	0,62 ± 0,02	0,58 ± 0,02

Tabelle A.13.B: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* und *L. oakridgensis* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 3 mM [U-¹³C₃]Serin. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

	<i>L. pneumophila</i> Paris				<i>L. oakridgensis</i>	
	Δ rpoN 1	Δ rpoN 2	Δ fleQ 1	Δ fleQ 2	1	2
Ala	7,67 ± 0,02	7,72 ± 0,05	6,70 ± 0,04	6,92 ± 0,02	6,63 ± 0,02	8,08 ± 0,06
Asp	1,60 ± 0,09	1,51 ± 0,04	1,27 ± 0,02	1,40 ± 0,03	2,16 ± 0,07	2,40 ± 0,05
Glu	3,20 ± 0,03	3,23 ± 0,03	2,71 ± 0,03	2,90 ± 0,02	3,42 ± 0,28	4,30 ± 0,07
Gly	2,30 ± 0,07	2,16 ± 0,04	1,97 ± 0,03	2,08 ± 0,05	3,06 ± 0,02	2,85 ± 0,04
His	±	±	±	±	0,25 ± 0,04	0,10 ± 0,06
Leu	0,23 ± 0,06	0,14 ± 0,06	0,14 ± 0,12	0,19 ± 0,08	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,01
Ile	0,03 ± 0,03	0,01 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,07 ± 0,01	0,22 ± 0,01
Lys	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,06	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,03	±	±
Phe	0,04 ± 0,04	0,03 ± 0,03	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,02	0,19 ± 0,06
Pro	0,37 ± 0,21	0,37 ± 0,23	0,46 ± 0,06	0,26 ± 0,23	0,75 ± 0,02	0,68 ± 0,07
Ser	18,73 ± 0,33	18,60 ± 0,26	16,53 ± 0,13	17,32 ± 0,06	35,15 ± 0,16	42,05 ± 0,50
Thr	0,40 ± 0,06	0,46 ± 0,03	0,43 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,55 ± 0,16	1,00 ± 0,27
Tyr	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,06 ± 0,00	0,07 ± 0,04	0,15 ± 0,05
Val	0,03 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,01
PHB	1,85 ± 0,04	1,56 ± 0,03	1,73 ± 0,01	2,17 ± 0,01	7,65 ± 0,12	12,40 ± 0,15

Tabelle A.14: ^{13}C -NMR-Signale von *L. pneumophila* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$. K: Kopplungskonstante (in hz).

		WT in MM			Δketo			
Position	X-Gruppen	K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	
Ala	1 10X		13,4	3,0		18	2,25	
	11X		86,57	23,9	58,88	82	10,25	
	2 010		10,67	2,9		14,8	0,89	
	110		10,19	(2,7)	56,7	9,7	0,58	
	011		10,19	(2,7)		0,86	0,06	
	111		79,13	21,4	95,97; 25,2	74,64	4,50	
	3 X01			18,75	5,1		21,85	1,14
	X11	55,6	81,25	21,9	35,27	78,15	4,08	
Asp	1 10XX		52,8	3,3		60,6	1,99	
	11XX		47,2	3,0		39,4	1,31	
	2 010X		47,7	3,0		54,9	0,57	
	110X		38,2	2,4	56,77	33,2	0,35	
	011X		0		37,28	7,2	0,08	
	111X		14	0,9		4,7	0,05	
	3 X010		45,5	2,8		54,9	0,65	
	X110		7,9	0,5	37,28	7,1	0,08	
	X011		38,5	2,4	55,70	33,07	0,39	
	X111		8,2	0,6		4,93	0,06	
	4 XX01			50,1	3,2		62,00	2,67
	XX11	54,7	48,9	3,1	55,7	38,00	1,64	
Glu	1 10XXX		-	-		-		
	11XXX		-	-		-		
	2 010XX		53,1	2,5		68,4	0,60	
	110XX	55	46,9	2,2	58,48	31,6	0,28	
	011XX		-	-		-		
	111XX		-	-		-		
	3 X010X		72	3,4		90,2	0,79	
	X011X		[27,9]	(2,9)	35,57	[9,8]	0,09	
	X110X		[27,9]	(2,9)		[9,8]	0,09	
	X111X		-	-		-		
	4 XX010		23,6	1,1		32,6	0,66	
	XX011	54	76,4	3,5	56,77	67,4	1,35	
	XX110		-	-		-		
	XX111		0	-		-		
5 XXX01		25	1,2		30	4,47		
XXX11	55	75	3,4	54,00	70	10,46		
Gly	1 10		24,70	2,2		42,3	1,73	
	11		75,30	6,7	58,88	57,7	2,36	
	2 01		21,30	1,9		41,3	0,66	
	11		78,70	7,0	60,16	58,7	0,94	

Ser	1	10X	6,5	2,2		7,7	2,35
		11X	93,5	32,7		92,3	28,25
	2	010	4,6	1,6		0,36	
		110	[5,4]	(1,9)	54,77	4,5	0,41
		011	[5,4]	(1,9)	37	7,1	0,69
		111	89,9	31,5	92; 22,2	88,06	8,08
	3	X01	10,8	3,5		11,6	1,05
		X11	89,2	31,5		88,4	8,07

2.4. Experimente mit [U-¹³C]-Stärke

Tabelle A.15: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 0,1% U-¹³C-Stärke. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>L. pneumophila</i> Paris									
	WT 1		WT 2		Δgam 1		Δgam 2		
Ala	1,63%	± 0,18%	1,32%	± 0,22%	0,29%	± 0,11%	0,26%	± 0,03%	
Asp	0,13%	± 0,02%	0,31%	± 0,10%	0,05%	± 0,06%	0,09%	± 0,08%	
Glu	0,24%	± 0,11%	0,49%	± 0,04%	0,28%	± 0,06%	0,32%	± 0,17%	
Gly	0,06%	± 0,10%	0,52%	± 0,37%	0,26%	± 0,23%	0,29%	± 0,27%	
His	0,11%	± 0,02%	0,32%	± 0,30%	0,14%	± 0,06%	0,61%	± 0,45%	
Leu	0,02%	± 0,01%	0,20%	± 0,13%	0,05%	± 0,01%	0,04%	± 0,00%	
Ile	0,17%	± 0,01%	0,37%	± 0,10%	0,17%	± 0,03%	0,13%	± 0,00%	
Lys	0,11%	± 0,07%	0,11%	± 0,20%	0,13%	± 0,05%	0,01%	± 0,00%	
Phe	0,13%	± 0,07%	0,61%	± 0,30%	0,29%	± 0,13%	0,16%	± 0,08%	
Pro	0,56%	± 0,08%	0,59%	± 0,14%	0,38%	± 0,06%	0,70%	± 0,12%	
Ser	0,72%	± 0,21%	0,90%	± 0,38%	0,72%	± 0,66%	0,86%	± 0,08%	
Thr	0,48%	± 0,15%	0,18%	± 0,30%	0,74%	± 0,61%	0,42%	± 0,17%	
Tyr	0,41%	± 0,09%	1,22%	± 0,66%	0,21%	± 0,01%	0,17%	± 0,00%	
Val	0,16%	± 0,01%	0,44%	± 0,26%	0,29%	± 0,19%	0,19%	± 0,09%	
PHB	0,77%	± 0,10%	0,68%	± 0,23%	0,41%	± 0,11%	0,44%	± 0,09%	

2.5. Experimente mit [U-¹³C]-Fettsäuren

Tabelle A.16: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 0,1% [U-¹³C]-Fettsäuren. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>L. pneumophila</i> Paris		
	WT	Δ keto
Ala	0,08% ± 0,01%	0,10% ± 0,01%
Asp	0,00% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
Glu	0,05% ± 0,02%	0,11% ± 0,03%
Gly	0,07% ± 0,07%	0,15% ± 0,03%
His	0,09% ± 0,03%	0,05% ± 0,02%
Leu	0,24% ± 0,12%	0,26% ± 0,20%
Ile	0,02% ± 0,02%	0,04% ± 0,05%
Lys	0,12% ± 0,04%	0,10% ± 0,04%
Phe	0,10% ± 0,03%	0,08% ± 0,02%
Pro	0,35% ± 0,03%	0,71% ± 0,10%
Ser	0,87% ± 0,38%	0,84% ± 0,32%
Thr	0,57% ± 0,19%	0,47% ± 0,08%
Tyr	1,17% ± 1,72%	0,09% ± 0,02%
Val	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%
PHB	0,82% ± 0,05%	0,81% ± 0,35%

2.6. Wachstumsabhängige Studien

Tabelle A.17.A: ¹³C-Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* WT gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM [U-¹³C₆]Glucose. Zugabe von ¹³C-markiertem Substrat und Ernte findet zu bestimmten Zeitpunkten statt. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>Legionella pneumophila</i> WT								
	OD 1			OD 1 - 1,6		OD 1,6 - 1,9		
	1	2	3	1	2	1	2	
Ala	1,41% ± 0,05%	1,77% ± 0,04%	0,66% ± 0,03%	1,69% ± 0,13%	2,67% ± 0,03%	4,71% ± 0,23%	5,53% ± 0,54%	
Asp	0,14% ± 0,07%	0,28% ± 0,03%	0,05% ± 0,00%	0,34% ± 0,10%	0,33% ± 0,10%	1,26% ± 0,22%	1,02% ± 0,35%	
Glu	0,20% ± 0,16%	0,98% ± 0,05%	0,40% ± 0,07%	0,79% ± 0,23%	1,00% ± 0,11%	2,71% ± 0,28%	2,57% ± 0,14%	
Gly	0,00% ± 0,00%	0,26% ± 0,05%	0,42% ± 0,18%	0,01% ± 0,02%	0,11% ± 0,12%	0,09% ± 0,08%	0,13% ± 0,13%	
His	0,69% ± 0,16%	0,07% ± 0,05%	0,27% ± 0,37%	0,28% ± 0,23%	0,79% ± 0,06%	0,78% ± 0,18%	0,49% ± 0,25%	
Leu	0,06% ± 0,02%	0,04% ± 0,04%	0,12% ± 0,02%	0,36% ± 0,11%	0,39% ± 0,06%	0,36% ± 0,04%	0,32% ± 0,06%	
Ile	0,04% ± 0,01%	0,00% ± 0,00%	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,03% ± 0,04%	
Lys	1,87% ± 1,21%	0,00% ± 0,00%	0,07% ± 0,01%	0,66% ± 0,70%	1,71% ± 1,69%	3,56% ± 2,47%	1,04% ± 0,68%	
Phe	0,23% ± 0,11%	0,15% ± 0,03%	0,15% ± 0,04%	0,09% ± 0,04%	0,14% ± 0,05%	0,18% ± 0,08%	0,13% ± 0,13%	
Pro	0,47% ± 0,31%	0,80% ± 0,33%	0,30% ± 0,03%	0,47% ± 0,08%	0,36% ± 0,07%	0,34% ± 0,13%	0,36% ± 0,08%	
Ser	1,57% ± 1,53%	0,28% ± 0,06%	0,29% ± 0,07%	0,54% ± 0,30%	0,35% ± 0,29%	0,87% ± 0,47%	0,44% ± 0,21%	
Thr	1,04% ± 0,35%	0,63% ± 0,18%	0,07% ± 0,06%	0,37% ± 0,11%	0,68% ± 0,48%	0,43% ± 0,39%	0,66% ± 0,08%	
Tyr	0,62% ± 0,28%	0,03% ± 0,02%	0,07% ± 0,03%	2,55% ± 1,54%	0,46% ± 0,47%	1,79% ± 1,75%	1,30% ± 0,85%	
Val	0,08% ± 0,08%	0,01% ± 0,00%	0,03% ± 0,02%	0,07% ± 0,04%	0,03% ± 0,02%	0,09% ± 0,02%	0,06% ± 0,01%	
PHB	- ± -	- ± -	- ± -	2,40% ± 0,06%	2,71% ± 0,02%	6,56% ± 0,01%	5,74% ± 0,10%	

Tabelle A.17.B: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* WT gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]Glucose. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat und Ernte findet zu bestimmten Zeitpunkten statt. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

<i>Legionella pneumophila</i> WT			
OD 1,9			
	1	2	3
Ala	3,40% ± 0,05%	7,61% ± 0,03%	4,34% ± 0,04%
Asp	0,68% ± 0,08%	1,85% ± 0,06%	0,78% ± 0,08%
Glu	1,74% ± 0,02%	3,22% ± 0,05%	1,83% ± 0,03%
Gly	0,62% ± 0,11%	1,38% ± 0,07%	0,67% ± 0,09%
His	0,25% ± 0,02%	0,97% ± 0,05%	0,50% ± 0,00%
Leu	0,00% ± 0,00%	0,19% ± 0,11%	0,09% ± 0,01%
Ile	0,07% ± 0,12%	0,20% ± 0,05%	0,10% ± 0,01%
Lys	0,66% ± 0,04%	0,53% ± 0,02%	0,46% ± 0,03%
Phe	1,25% ± 0,05%	0,10% ± 0,04%	0,11% ± 0,04%
Pro	1,12% ± 0,16%	1,40% ± 0,14%	0,53% ± 0,04%
Ser	0,20% ± 0,03%	1,24% ± 0,09%	0,50% ± 0,05%
Thr	0,60% ± 0,07%	0,93% ± 0,05%	0,42% ± 0,36%
Tyr	0,73% ± 0,02%	0,22% ± 0,19%	0,87% ± 0,04%
Val	0,04% ± 0,01%	1,10% ± 0,07%	0,33% ± 0,02%
PHB	- ± -	3,97% ± 0,06%	5,12% ± 0,05%

Tabelle A.18: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* Δketo gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 11 mM [$\text{U-}^{13}\text{C}_6$]Glucose. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat und Ernte findet zu bestimmten Zeitpunkten statt. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>Legionella pneumophila</i> Δketo								
	OD 1		OD 1 - 1,5		OD 1,5 - 1,9		OD 1,9	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Ala	1,38% ± 0,04%	1,65% ± 0,04%	2,91% ± 0,02%	1,75% ± 0,02%	3,92% ± 0,01%	3,66% ± 0,06%	4,86% ± 0,06%	4,02% ± 0,07%
Asp	0,11% ± 0,02%	0,11% ± 0,02%	0,60% ± 0,06%	0,13% ± 0,07%	1,15% ± 0,05%	1,04% ± 0,05%	1,13% ± 0,01%	0,91% ± 0,07%
Glu	0,59% ± 0,03%	0,54% ± 0,02%	1,41% ± 0,01%	0,69% ± 0,00%	2,28% ± 0,04%	2,13% ± 0,01%	2,88% ± 0,03%	2,00% ± 0,07%
Gly	0,12% ± 0,04%	0,13% ± 0,02%	0,11% ± 0,03%	0,11% ± 0,03%	0,11% ± 0,07%	0,08% ± 0,02%	0,14% ± 0,02%	0,28% ± 0,03%
His	0,14% ± 0,18%	0,07% ± 0,04%	0,06% ± 0,01%	0,06% ± 0,01%	0,06% ± 0,02%	0,04% ± 0,01%	0,20% ± 0,02%	0,13% ± 0,01%
Leu	0,21% ± 0,16%	0,14% ± 0,03%	0,21% ± 0,05%	0,10% ± 0,07%	0,14% ± 0,08%	0,05% ± 0,08%	0,38% ± 0,30%	0,29% ± 0,20%
Ile	0,09% ± 0,09%	0,01% ± 0,02%	0,04% ± 0,04%	0,02% ± 0,03%	0,07% ± 0,07%	0,04% ± 0,06%	0,01% ± 0,02%	0,06% ± 0,08%
Lys	0,14% ± 0,07%	0,10% ± 0,02%	0,09% ± 0,01%	0,09% ± 0,03%	0,08% ± 0,02%	0,10% ± 0,01%	0,39% ± 0,08%	0,29% ± 0,04%
Phe	0,07% ± 0,01%	0,07% ± 0,01%	0,06% ± 0,02%	0,06% ± 0,01%	0,06% ± 0,02%	0,04% ± 0,05%	0,09% ± 0,01%	0,40% ± 0,04%
Pro	0,49% ± 0,14%	0,69% ± 0,18%	0,65% ± 0,12%	0,63% ± 0,08%	0,69% ± 0,07%	0,71% ± 0,13%	0,54% ± 0,14%	0,15% ± 0,08%
Ser	0,37% ± 0,10%	0,31% ± 0,12%	0,35% ± 0,16%	0,30% ± 0,15%	0,40% ± 0,14%	0,37% ± 0,11%	0,23% ± 0,02%	0,25% ± 0,05%
Thr	0,27% ± 0,07%	0,40% ± 0,18%	0,42% ± 0,09%	0,28% ± 0,20%	0,44% ± 0,13%	0,32% ± 0,09%	0,45% ± 0,07%	0,82% ± 0,25%
Tyr	0,06% ± 0,02%	0,07% ± 0,03%	0,08% ± 0,00%	0,06% ± 0,02%	0,04% ± 0,02%	0,08% ± 0,02%	0,08% ± 0,02%	0,19% ± 0,03%
Val	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,02% ± 0,01%	0,03% ± 0,01%	0,01% ± 0,01%	0,15% ± 0,08%
PHB	0,42% ± 0,03%	0,41% ± 0,02%	0,47% ± 0,00%	0,37% ± 0,01%	0,59% ± 0,02%	0,56% ± 0,03%	0,60% ± 0,01%	0,60% ± 0,03%

Tabelle A.19: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* WT gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat und Ernte findet zu bestimmten Zeitpunkten statt. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>Legionella pneumophila</i> WT								
	OD 1		OD 1-1,5		OD 1,5 - 1,9		OD 1,9	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Ala	17,95% ± 0,07%	17,83% ± 0,05%	14,58% ± 0,03%	12,87% ± 0,03%	4,51% ± 0,05%	4,73% ± 0,01%	6,49% ± 0,01%	4,78% ± 0,03%
Asp	3,70% ± 0,06%	4,09% ± 0,05%	2,40% ± 0,05%	2,14% ± 0,05%	0,93% ± 0,01%	0,98% ± 0,05%	1,72% ± 0,09%	1,14% ± 0,01%
Glu	7,61% ± 0,09%	8,15% ± 0,06%	5,81% ± 0,07%	5,03% ± 0,03%	1,83% ± 0,05%	1,85% ± 0,01%	3,07% ± 0,04%	2,40% ± 0,01%
Gly	5,36% ± 0,08%	5,29% ± 0,08%	1,44% ± 0,01%	1,12% ± 0,01%	0,61% ± 0,04%	0,70% ± 0,02%	1,30% ± 0,04%	1,24% ± 0,00%
His	0,12% ± 0,03%	0,10% ± 0,01%	0,07% ± 0,01%	0,07% ± 0,02%	0,07% ± 0,02%	0,10% ± 0,02%	0,08% ± 0,00%	0,13% ± 0,01%
Leu	0,35% ± 0,24%	0,24% ± 0,04%	0,12% ± 0,05%	0,13% ± 0,01%	0,15% ± 0,08%	0,08% ± 0,01%	0,15% ± 0,10%	0,28% ± 0,05%
Ile	0,06% ± 0,01%	0,03% ± 0,03%	0,06% ± 0,03%	0,05% ± 0,02%	0,06% ± 0,02%	0,00% ± 0,00%	0,04% ± 0,02%	0,09% ± 0,11%
Lys	0,22% ± 0,29%	0,13% ± 0,04%	0,12% ± 0,02%	0,11% ± 0,01%	0,12% ± 0,02%	0,11% ± 0,01%	0,28% ± 0,01%	0,24% ± 0,04%
Phe	0,10% ± 0,03%	0,11% ± 0,02%	0,09% ± 0,05%	0,09% ± 0,02%	0,12% ± 0,03%	0,05% ± 0,01%	0,08% ± 0,07%	0,08% ± 0,00%
Pro	0,16% ± 0,19%	0,31% ± 0,14%	0,23% ± 0,16%	0,38% ± 0,08%	0,32% ± 0,25%	0,35% ± 0,22%	0,57% ± 0,20%	0,86% ± 0,18%
Ser	54,10% ± 0,13%	53,51% ± 0,30%	30,89% ± 0,18%	25,53% ± 0,27%	6,11% ± 0,13%	6,74% ± 0,05%	7,78% ± 0,29%	6,37% ± 0,15%
Thr	0,76% ± 0,06%	0,73% ± 0,05%	0,76% ± 0,05%	0,70% ± 0,09%	0,61% ± 0,02%	0,59% ± 0,07%	0,41% ± 0,07%	0,48% ± 0,15%
Tyr	0,09% ± 0,04%	0,06% ± 0,02%	0,07% ± 0,02%	0,12% ± 0,03%	0,10% ± 0,01%	0,08% ± 0,01%	0,10% ± 0,03%	0,09% ± 0,04%
Val	0,09% ± 0,03%	0,07% ± 0,02%	0,10% ± 0,02%	0,06% ± 0,03%	0,11% ± 0,02%	0,03% ± 0,01%	0,01% ± 0,00%	0,01% ± 0,01%
PHB	-	-	11,45% ± 0,06%	12,24% ± 0,03%	1,88% ± 0,02%	1,89% ± 0,05%	7,78% ± 0,04%	6,61% ± 0,32%

Tabelle A.20: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* Δketo gewonnen aus *in vitro* Experimenten mit 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]\text{Serin}$. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat und Ernte findet zu bestimmten Zeitpunkten statt. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>Legionella pneumophila</i> Δketo								
	OD 1		OD 1-1,5		OD 1,5 - 1,9		OD 1,9	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Ala	15,11% ± 0,07%	14,48% ± 0,10%	12,75% ± 0,05%	12,07% ± 0,06%	8,95% ± 0,09%	8,25% ± 0,04%	8,83% ± 0,03%	9,31% ± 0,04%
Asp	3,07% ± 0,05%	2,88% ± 0,01%	2,02% ± 0,04%	2,13% ± 0,05%	2,26% ± 0,04%	2,11% ± 0,06%	2,06% ± 0,02%	2,04% ± 0,04%
Glu	5,75% ± 0,10%	5,64% ± 0,07%	4,42% ± 0,06%	4,14% ± 0,08%	3,80% ± 0,03%	3,33% ± 0,01%	3,95% ± 0,03%	4,15% ± 0,04%
Gly	3,31% ± 0,03%	3,08% ± 0,06%	1,03% ± 0,03%	1,03% ± 0,03%	0,77% ± 0,03%	0,79% ± 0,03%	0,77% ± 0,02%	1,08% ± 0,06%
His	0,07% ± 0,02%	0,05% ± 0,01%	0,07% ± 0,02%	0,14% ± 0,10%	0,05% ± 0,02%	0,10% ± 0,09%	0,09% ± 0,01%	0,06% ± 0,05%
Leu	0,23% ± 0,16%	0,18% ± 0,07%	0,18% ± 0,06%	0,28% ± 0,16%	0,17% ± 0,08%	0,51% ± 0,46%	0,28% ± 0,10%	0,28% ± 0,25%
Ile	0,05% ± 0,05%	0,04% ± 0,02%	0,02% ± 0,02%	0,08% ± 0,12%	0,13% ± 0,02%	0,11% ± 0,09%	0,02% ± 0,03%	0,20% ± 0,08%
Lys	0,10% ± 0,05%	0,09% ± 0,02%	0,11% ± 0,02%	0,04% ± 0,04%	0,11% ± 0,02%	0,05% ± 0,06%	0,21% ± 0,01%	0,05% ± 0,05%
Phe	0,07% ± 0,00%	0,05% ± 0,00%	0,07% ± 0,01%	0,16% ± 0,02%	0,07% ± 0,02%	0,16% ± 0,05%	0,06% ± 0,00%	0,18% ± 0,02%
Pro	0,89% ± 0,06%	0,86% ± 0,11%	0,92% ± 0,02%	0,26% ± 0,01%	0,70% ± 0,04%	0,22% ± 0,04%	0,73% ± 0,13%	0,10% ± 0,01%
Ser	47,13% ± 0,51%	44,69% ± 0,25%	28,85% ± 0,36%	24,03% ± 0,17%	12,82% ± 0,21%	10,07% ± 0,08%	7,24% ± 0,09%	6,19% ± 0,02%
Thr	0,33% ± 0,18%	0,45% ± 0,09%	0,53% ± 0,07%	0,71% ± 0,09%	0,44% ± 0,09%	0,72% ± 0,04%	0,34% ± 0,15%	0,73% ± 0,10%
Tyr	0,09% ± 0,05%	0,08% ± 0,03%	0,10% ± 0,02%	0,12% ± 0,07%	0,07% ± 0,02%	0,07% ± 0,05%	0,08% ± 0,02%	0,08% ± 0,07%
Val	0,02% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,02% ± 0,01%	0,11% ± 0,02%	0,01% ± 0,01%	0,16% ± 0,09%	0,02% ± 0,00%	0,00% ± 0,00%
PHB	1,84% ± 0,05%	1,85% ± 0,06%	1,16% ± 0,02%	1,27% ± 0,01%	0,76% ± 0,02%	0,37% ± 0,00%	0,76% ± 0,04%	1,45% ± 0,02%

Tabelle A.21: ^{13}C -NMR-Signale gewonnen aus *L. pneumophila* WT zu verschiedenen Wachstumsphasen im AYE-Medium supplementiert mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose oder 3 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ Serin. K: Kopplungskonstante (in Hz).

<i>Legionella pneumophila</i> WT											
aminoacid	Position	X-gruppen	OD 1 (2)		OD1.9 (SS)			$[\text{U-}^{13}\text{C}_3]$ Ser OD 1.5- 1.9 (II)			
			K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$	K	$\%^{13}\text{C}^{13}\text{C}$	$\%^{13}\text{C}_{\text{abs}}$
Ala	1 10X			39	1,3		29	2,35		23	2,08
	11X			61	2,09	58,00	71	5,75	59,09	77	6,98
	2 010			54,00	1,8		24,6	0,67		19,9	0,91
	110			20,50	0,7		8,9	0,24	58,74	5,9	0,24
	011			25,50	0,7	54,00	8,9	0,24	(-)	-	-
	111					38,00	57,6	1,56	92,04; 22,3	74,2	3,40
	3 X01			55,20	1,9		34,2	0,92		24,6	0,95
	X11			44,80	1,54	35,00	65,8	1,77	35,19	75,4	2,93
	Asp	1 10XX		-				70,7	1,31		60
11XX			-			54,00	29,3	0,54	54,89	40	1,02
2 010X				73,7	2,8		62,5	0,90		62	0,88
110X			57	20,5	0,8	55,00	21,6	0,31	58,24	24	0,34
011X			34	6,9	0,28	35,00	5,7	0,08	36,69	9,5	0,14
111X				1,1	0,05		10,2	0,15	97,60	4,5	0,07
3 X010				72,3	2,78		67	1,18		60,4	1,03
X110				3,95	0,15		19,3	0,34	36,60	8	0,12
X011			57,3	3,95	0,15		6,6	0,12	55,80	22,8	0,40
X111				19,8	0,65		7,1	0,12	93,55	8,8	0,15
4 XX01			-				73,00	1,52		68,30	1,80
XX11			-			54,00	27,00	0,56	54,89	31,70	0,87
Glu		1 10XXX		-				70	2,25		64,3
	11XXX		-			54,00	29,5	0,95	57,2	35,7	1,17
	2 010XX		-				51,2	1,01		47,6	0,78
	110XX		-			56,00	27,2	0,54	59,60	24,6	0,40
	011XX		-			37,00	6,6	0,13	33,94	0,7	0,02
	111XX		-				15	0,30	90,80	27,1	0,44
	3 X010X		-				81	1,33		32,6	0,60
	X011X		-			35,00	19	0,31		[49,57]	0,90
	X110X		-			35,00	19	0,31	55,00	[49,57]	0,90
	X111X		-				-		90,80	17,4	0,33
	4 XX010			49	1,1		39,2	0,87		69,9	0,96
	XX011			46,7	1		50,6	1,12		25,4	0,35
	XX110			4,7	0,19		3,3	0,07		4,6	0,06
	XX111		-				6,9	0,15		-	
	5 XXX01						44	2,27		39	2,7
XXX11					54,00	56	2,89	56,01	61	4,14	
Gly	1 10									69	1,80
	11							58,16		31	0,82
	2 01									23,6	0,23
	11							56,85		76,4	0,74
Ser	1 10X									16,1	1,53
	11X							58,21		83,9	7,97
	2 010									18	1,20
	110							59,6		4	0,30
	011									0,9	0,04
	111							96,3; 22,3		77,1	5,30
	3 X01									18,8	1,30
	X11							36,2		81,2	5,88

Tabelle A.22: ^{13}C -NMR-Signale von PHB aus *L. pneumophila* WT zu verschiedenen Wachstumsphasen im AYE-Medium, supplementiert mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose.

<i>Legionella pneumophila</i> WT											
PHB		OD ₆₀₀ = 1		OD ₆₀₀ = 1 - 1,5		OD ₆₀₀ = 1,5 - 1,9		OD ₆₀₀ = 1,9 (II)		OD ₆₀₀ = 1,9 (III)	
Position	X-Gruppen K	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}
1	10XX	-	-	-	-	41,60	3,32	38,00	1,90	37,00	2,59
	11XX 58Hz	-	-	-	-	58,40	4,68	62,00	3,10	63,00	4,41
2	010X	-	-	-	-	20,00	1,60	27,40	1,37	25,80	1,80
	011X 39Hz	-	-	-	-	3,60	0,28	4,50	0,23	4,90	0,37
	110X 58Hz	-	-	-	-	64,20	5,14	58,60	2,93	57,10	3,99
	111X	-	-	-	-	12,20	0,98	9,50	0,47	12,20	0,85
3	X010	-	-	-	-	29,00	2,32	32,70	1,64	31,60	2,20
	X011 38Hz	-	-	-	-	60,00	4,80	54,00	2,70	54,80	3,84
	X110 50Hz	-	-	-	-	2,00	0,16	3,20	0,15	3,80	0,35
	X111	-	-	-	-	9,00	0,72	10,10	0,51	9,80	0,61
4	XX01	-	-	-	-	27,00	2,16	33,60	1,68	32,90	2,30
	XX11 38Hz	-	-	-	-	73,00	5,84	66,40	3,32	67,10	4,70

Tabelle A.23: ^{13}C -NMR-Signale von PHB aus *L. pneumophila* Δ keto zu verschiedenen Wachstumsphasen im AYE-Medium, supplementiert mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose.

<i>Legionella pneumophila</i> Δ keto								
PHB			OD ₆₀₀ = 1		OD ₆₀₀ = 1 - 1,5		OD ₆₀₀ = 1,5 - 1,9	
Position	X-Gruppen	K	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}	% ¹³ C ¹³ C	% ¹³ C _{abs}
1	10XX		100,00	-	80,65	1,45	100,00	-
	11XX	58Hz	-	-	19,35	0,35	-	-
2	010X		100,00	-	85,90	1,55	100,00	-
	011X	39Hz	-	-	-	-	-	-
	110X	58Hz	-	-	14,10	0,25	-	-
	111X		-	-	-	-	-	-
3	X010		100,00	-	100,00	-	100,00	-
	X011	38Hz	-	-	-	-	-	-
	X110	50Hz	-	-	-	-	-	-
	X111		-	-	-	-	-	-
4	XX01		100,00	-	100,00	-	100,00	-
	XX11	38Hz	-	-	-	-	-	-

2.7. *In Vivo* Studien - *Legionella pneumophila* replizierend in *Acanthamoeba castellanii*

Tabelle A.24.A: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *A. castellanii* gewonnen aus *in vivo* Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose und mit und ohne Infektion durch *L. pneumophila* (*Lp*) WT und $\Delta\textit{keto}$. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat findet zu Beginn der Zellkultur statt, anschließend weitere Inkubation ohne ^{13}C -markierte Glucose für 22 h. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen. Zur Bestimmung der Amöbenproteinfraktion wurde die cytosolische Fraktion verwendet.

<i>Acanthamoeba castellanii</i>						
<i>(cytosolische Fraktion)</i>						
	uninfiziert		infiziert mit <i>L. pneumophila</i> WT		infiziert mit <i>L. pneumophila</i> $\Delta\textit{keto}$	
	1	2	1	2	1	2
Ala	9,96% 0,03%	9,72% 0,02%	10,10% 0,06%	10,99% 0,03%	8,37% 0,04%	9,45% 0,08%
Asp	4,60% 0,08%	4,66% 0,04%	4,37% 0,10%	5,03% 0,03%	3,68% 0,04%	4,16% 0,02%
Glu	6,77% 0,02%	7,17% 0,09%	6,63% 0,07%	7,37% 0,05%	5,53% 0,07%	6,23% 0,07%
Gly	2,15% 0,05%	1,63% 0,07%	2,47% 0,06%	1,87% 0,03%	1,54% 0,04%	2,03% 0,02%
His	0,17% 0,04%	0,27% 0,01%	0,20% 0,07%	0,15% 0,01%	0,16% 0,02%	0,15% 0,06%
Ile	0,08% 0,08%	0,27% 0,16%	0,36% 0,25%	0,15% 0,09%	0,26% 0,24%	0,11% 0,19%
Leu	0,02% 0,04%	0,05% 0,05%	0,06% 0,07%	0,03% 0,04%	0,14% 0,24%	0,03% 0,06%
Lys	0,13% 0,02%	0,12% 0,02%	0,15% 0,10%	0,13% 0,02%	0,14% 0,04%	0,13% 0,03%
Phe	4,50% 0,03%	4,79% 0,14%	3,04% 0,09%	4,46% 0,05%	2,18% 0,01%	2,56% 0,05%
Pro	3,54% 0,11%	5,15% 0,22%	2,28% 0,09%	3,42% 0,23%	2,35% 0,53%	2,79% 0,03%
Ser	3,34% 0,16%	2,74% 0,26%	3,84% 0,11%	3,17% 0,13%	2,28% 0,11%	2,88% 0,13%
Thr	0,33% 0,07%	0,30% 0,05%	0,44% 0,14%	0,36% 0,22%	0,74% 0,09%	0,80% 0,16%
Tyr	2,70% 0,22%	3,06% 0,18%	1,92% 0,06%	2,78% 0,06%	1,40% 0,05%	1,56% 0,03%
Val	0,01% 0,01%	0,02% 0,02%	0,03% 0,03%	0,01% 0,01%	0,02% 0,01%	0,01% 0,01%
PHB	- -	- -	- -	- -	- -	- -

Tabelle A.24.B: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *A. castellanii* gewonnen aus *in vivo* Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]$ Glucose und mit Infektion durch *L. pneumophila* (*Lp*) $\Delta\textit{zwf}$, $\Delta\textit{fleQ}$ und $\Delta\textit{rpoN}$.

<i>Acanthamoeba castellanii</i>						
<i>(cytosolische Fraktion)</i>						
	infiziert mit <i>Lp</i> $\Delta\textit{zwf}$		infiziert mit <i>Lp</i> $\Delta\textit{fleQ}$		infiziert mit <i>Lp</i> $\Delta\textit{rpoN}$	
	1	2	1	2	1	2
Ala	7,34% 0,07%	11,95% 0,11%	11,29% 0,10%	11,14% 0,07%	9,34% 0,05%	10,58% 0,10%
Asp	3,09% 0,06%	5,06% 0,04%	5,38% 0,08%	5,31% 0,04%	4,03% 0,08%	4,54% 0,05%
Glu	4,85% 0,01%	8,22% 0,08%	8,11% 0,05%	8,14% 0,08%	6,36% 0,08%	6,75% 0,03%
Gly	1,33% 0,07%	2,11% 0,06%	1,51% 0,05%	1,74% 0,10%	1,50% 0,06%	1,73% 0,05%
His	0,59% 0,38%	0,24% 0,07%	0,36% 0,01%	0,37% 0,09%	0,32% 0,03%	0,72% 0,19%
Ile	0,25% 0,22%	0,13% 0,05%	0,34% 0,06%	0,19% 0,06%	0,40% 0,41%	0,92% 0,92%
Leu	0,16% 0,12%	0,33% 0,27%	0,04% 0,03%	0,14% 0,09%	0,24% 0,41%	0,37% 0,20%
Lys	0,52% 0,87%	0,19% 0,16%	0,14% 0,04%	0,10% 0,06%	0,15% 0,14%	0,13% 0,20%
Phe	3,21% 0,07%	4,92% 0,10%	5,31% 0,08%	5,21% 0,09%	3,80% 0,19%	4,64% 0,02%
Pro	2,49% 0,09%	3,77% 0,14%	5,24% 0,17%	5,39% 0,14%	3,05% 0,43%	2,32% 0,10%
Ser	2,78% 0,27%	4,66% 0,14%	3,49% 0,83%	3,05% 0,26%	2,75% 0,47%	3,19% 0,44%
Thr	0,52% 0,06%	0,71% 0,26%	0,55% 0,14%	0,32% 0,09%	0,52% 0,09%	0,84% 0,63%
Tyr	2,33% 0,12%	3,20% 0,02%	3,26% 0,05%	2,96% 0,13%	2,56% 0,39%	2,71% 0,12%
Val	0,02% 0,01%	0,03% 0,01%	0,01% 0,01%	0,03% 0,02%	0,03% 0,01%	0,05% 0,04%
PHB	- -	- -	- -	- -	- -	- -

TabelleA.25.A: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* (*Lp*) gewonnen aus *in vivo* Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ replizierend in *A. castellanii*. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat findet zu Beginn der Zellkultur statt, anschließend weitere Inkubation ohne ^{13}C -markierte Glucose für 22 h. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen.

<i>Legionella pneumophila</i> replizierend in <i>A. castellanii</i>												
	WT				Δketo				Δzwf			
	1		2		1		2		1		2	
Ala	9,99%	0,02%	9,39%	0,03%	6,57%	0,01%	7,66%	0,03%	9,62%	0,05%	9,19%	0,06%
Asp	4,18%	0,08%	2,63%	0,02%	1,71%	0,04%	2,07%	0,03%	2,43%	0,07%	2,24%	0,10%
Glu	6,47%	0,02%	4,01%	0,07%	2,93%	0,06%	3,34%	0,03%	3,97%	0,01%	3,88%	0,07%
Gly	2,59%	0,07%	1,60%	0,05%	1,30%	0,10%	1,65%	0,05%	1,89%	0,02%	1,98%	0,05%
His	0,14%	0,03%	0,20%	0,05%	0,22%	0,08%	0,20%	0,09%	0,19%	0,07%	0,38%	0,13%
Ile	0,06%	0,06%	0,38%	0,30%	0,18%	0,08%	0,42%	0,11%	0,67%	0,46%	0,35%	0,20%
Leu	0,01%	0,02%	0,05%	0,04%	0,02%	0,04%	0,20%	0,20%	0,17%	0,26%	0,11%	0,06%
Lys	0,10%	0,01%	0,14%	0,03%	0,12%	0,05%	0,14%	0,04%	0,35%	0,34%	0,30%	0,22%
Phe	2,93%	0,03%	4,62%	0,01%	2,03%	0,06%	2,45%	0,01%	5,44%	0,05%	4,89%	0,10%
Pro	2,37%	0,02%	3,33%	0,31%	2,02%	0,35%	2,61%	0,05%	3,74%	0,18%	3,54%	0,20%
Ser	3,80%	0,04%	2,92%	0,01%	2,05%	0,16%	2,70%	0,07%	3,64%	0,36%	3,84%	0,41%
Thr	0,72%	0,18%	0,57%	0,19%	0,67%	0,15%	0,43%	0,19%	0,57%	0,38%	0,30%	0,18%
Tyr	1,89%	0,04%	3,65%	0,49%	1,56%	0,13%	1,83%	0,05%	4,25%	0,18%	3,81%	0,08%
Val	0,01%	0,01%	0,03%	0,02%	0,02%	0,01%	0,01%	0,01%	0,02%	0,01%	0,04%	0,02%
PHB	-	-	1,17%	0,01%	0,66%	0,01%	0,80%	0,04%	1,09%	0,07%	1,02%	0,01%

TabelleA.25.B: ^{13}C -Excess-Werte (in mol%) von *L. pneumophila* (*Lp*) gewonnen aus *in vivo* Experimenten mit 11 mM $[\text{U-}^{13}\text{C}_6]\text{Glucose}$ replizierend in *A. castellanii*. Zugabe von ^{13}C -markiertem Substrat findet zu Beginn der Zellkultur statt, anschließend weitere Inkubation ohne ^{13}C -markierte Glucose für 22 h. Werte sind Mittelwerte aus 3 Messungen

<i>Legionella pneumophila</i> replizierend in <i>A. castellanii</i>								
	ΔfleQ				ΔrpoN			
	1		2		1		2	
Ala	8,97%	0,08%	8,66%	0,04%	8,46%	0,05%	9,25%	0,05%
Asp	2,71%	0,08%	2,58%	0,04%	2,21%	0,02%	2,47%	0,03%
Glu	4,37%	0,00%	4,29%	0,06%	3,53%	0,03%	3,93%	0,04%
Gly	1,54%	0,02%	1,42%	0,13%	1,58%	0,03%	1,64%	0,01%
His	0,42%	0,00%	0,35%	0,04%	0,23%	0,04%	0,24%	0,01%
Ile	0,25%	0,11%	0,18%	0,19%	0,36%	0,33%	0,16%	0,06%
Leu	0,00%	0,00%	0,05%	0,04%	0,04%	0,06%	0,00%	0,00%
Lys	0,18%	0,06%	0,12%	0,02%	0,09%	0,02%	0,14%	0,01%
Phe	5,38%	0,02%	4,93%	0,03%	4,14%	0,02%	4,91%	0,02%
Pro	5,60%	0,05%	5,31%	0,07%	3,46%	0,12%	3,96%	0,12%
Ser	2,77%	0,11%	2,53%	0,27%	2,81%	0,20%	3,10%	0,16%
Thr	0,37%	0,03%	0,32%	0,19%	0,41%	0,35%	0,36%	0,01%
Tyr	4,11%	0,02%	3,85%	0,23%	3,08%	0,01%	3,65%	0,26%
Val	0,02%	0,01%	0,02%	0,01%	0,02%	0,02%	0,02%	0,01%
PHB	1,63%	0,00%	1,59%	0,04%	1,19%	0,01%	1,26%	0,03%

X. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Wolfgang Eisenreich danke ich sehr herzlich für die interessante Themenstellung, die vielen inspirierenden Gespräche, besonders aber für die fachliche Betreuung, die große Unterstützung und die Einweisung in die NMR-Spektroskopie.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Groll für die freundliche Atmosphäre und die Unterstützung.

Herrn PD Dr. Klaus Heuner, Frau Dr. Vroni Herrmann, Frau Dr. Eva Schunder und Frau Kerstin Rydzewski danke ich für die sehr gelungene Kooperation (*Legionella pneumophila* und *Legionella oakridgensis*) und dafür, dass sie meinen Forschungsaufenthalt in Berlin ermöglicht haben.

Herrn Prof. Dr. Werner Goebel und Herrn Dr. Andreas Götz danke ich sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit (Projekt primäre Mausmakrophagen), die vielen inspirierenden Gespräche und die Unterstützung.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Eva Eylert für die stete Unterstützung und Einführung in das umfassende Arbeitsgebiet sowie die vielen Gespräche und anregenden Ideen.

Bei Frau Dr. Claudia Huber bedanke ich mich für die stete Hilfe bei Fragestellungen rund um die Massenspektrometrie und bei Metabolomix-Problemen sowie für die vielen anregenden Gespräche. Ihr und Frau Erika Kutzner möchte ich zudem besonderen Dank aussprechen für die Durchsicht vorliegender Arbeit.

Bei Frau Birgit Keil und Frau Christine Schwarz möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die hervorragende Zusammenarbeit (NMR- und GC/MS-Messungen) und die stete Unterstützung, sowie die vielen anregenden Gespräche.

Frau Dr. Julia Hoffmann und Herrn Prof. Dr. Gottfried Wilharm (*Yersinia enterocolitica*) danke ich für die sehr gelungene Kooperation.

Herrn Fritz Wendling danke ich für die Lösung aller Computerprobleme die im Laufe vorliegender Arbeit aufgetreten sind.

Bei Herrn Dr. Werner Römisch-Margl bedanke ich mich für die Bereitstellung der hilfreichen

Excel-Macros.

Ganz herzlich danke ich dem ganzen Lehrstuhl für die freundliche und angenehme Atmosphäre. Insbesondere danke ich meinen Mitdoktoranden und –innen Stephanie Grubmüller, Nerea Gallastegui, Andrea Kunfermann, Anja List, Veronika Flügel, Felix Qwitterer, Erika Kutzner und Ingrid Span für den enormen Swag.

Der größte Dank gebührt meiner ganzen Familie und meinen Freunden, besonders aber meinen Eltern für ihre Liebe, das Verständnis und die stete fürsorgliche Unterstützung in allen Lebensphasen.