

Karotten in die Wurst! Karottenextrakte als natürlich vorkommende antimikrobielle Lebensmittelzusätze gegen *Listeria monocytogenes*

Schlussbericht an den Q-S Wissenschaftsfonds, 28.9.2024

Inhalt

<i>Hintergrund</i>	2
<i>Executive Summary</i>	2
<i>Methodik</i>	3
<i>Resultate und Diskussion</i>	4
<i>Schlussfolgerungen, Zusammenfassung und Ausblick:</i>	11
<i>Präsentationen auf Konferenzen</i>	12
<i>REFERENZEN</i>	13
<i>Finanzieller Schlussbericht</i>	14
<i>Anhang I: Kontoauszüge 2022</i>	15
<i>Anhang II: Kontoauszüge 2023</i>	316

Autorin: Prof. Dr. C. Guldemann, PhD, Dipl. ECVPH, Fachtierärztin für Lebensmittel, Fachtierärztin für Fleischhygiene

Hintergrund

Innovative Methoden zur Verminderung des Risikos einer Kontamination von Lebensmitteln mit *L. monocytogenes* sind dringend nötig. Historische Daten und unsere Vorversuche hatten gezeigt, dass Karotten natürliche antimikrobielle Eigenschaften haben, die gegen *L. monocytogenes* wirksam sind, jedoch ist die dazu existierende Literatur größtenteils alt und der Wirkmechanismus unklar. Ziel dieses Projekts ist, diese Substanzen in Karotten näher zu analysieren. Im Rahmen dieser Förderung wurden in zwei Schritten folgende Fragen bearbeitet:

1. Welche Karottensorten haben den stärksten Effekt?
2. Welcher Wirkmechanismus liegt dem Effekt von Karottensaft auf *L. monocytogenes* zugrunde?

Langfristig, und über dieses Projekt hinausgehend, werden wir dann die antimikrobiell aktiven Substanzen charakterisieren und deren praktische Anwendung in Risikoprodukten für *L. monocytogenes* testen.

Executive Summary

Die Forschungsarbeiten zum letalen Effekt von Karottensaft auf *L. monocytogenes* konnten mit den Mitteln des Q-S Wissenschaftsfonds entscheidend vorangetrieben werden. Es hat sich gezeigt, dass der antimikrobielle Effekt von Karotten auf *L. monocytogenes* sehr stark von der Karottensorte abhängt. Aus 52 getesteten Sorten **wurden drei Karottensorten mit einem über mehrere Anbauperioden konstanten antimikrobiellen Effekt identifiziert**. Diese wurden für dieses Projekt verwendet und sind auch für zukünftige Forschungsarbeiten hervorragend geeignet.

Um den Wirkmechanismus von Karottensaft auf *L. monocytogenes* besser zu verstehen, wurden Transkriptomanalysen nach Stresstests mit Karottensaft durchgeführt. **Die Resultate legen nahe, dass die aktive Substanz in Karottensaft eine negative Wirkung auf die Zellwand der Karotten ausübt. Ebenfalls zeigen die Resultate, dass Gene mit einer Funktion in der Stressantwort und der Regulierung des Energiehaushalts nach Stresstests mit Karottensaft hochreguliert waren**, was entweder eine nachgeschaltete Reaktion auf Schäden an der Zellmembran oder die Anpassung an einen zusätzlichen Stress darstellen kann. Unsere aktuell laufenden elektronenmikroskopischen Analysen können in dem Bereich zukünftig weitere Daten beitragen.

Basierend auf diesen Daten sollen nun in einem nächsten Schritt das **Wirkspektrum** dieses „Karotteneffekts“ auf verschiedene Gram (+) und Gram (-) Bakterienspezies eruiert werden, da der Wirkmechanismus auf die Zellwand die Hypothese nahe legt, dass es hier einen Unterschied geben könnte. **Ebenfalls soll in Zukunft die praktische Anwendung von Karottensaft in verschiedenen Hochrisikoprodukten für *L. monocytogenes* getestet** und eine mögliche hemmende Wirkung quantifiziert werden. Vergleichende massenspektrometrische Untersuchungen zwischen Karotten mit und ohne einem antilisterialen Effekt könnten weitere Informationen über die genaue Natur der wirksamen Substanz geben.

Methodik

Arbeitspaket 1: Screening von 52 Karottensorten auf ihren antilisterialen Effekt.

Methodisch wurde für das Arbeitspaket eine gängige quantitative Mikrobiologie angewandt. Ein Inokulum von *L. monocytogenes* wurde hergestellt und auf 10^6 für die Versuche im Jahr 2021 bzw. 10^8 für 2022/23 eingestellt. Von den Karotten wurde mittels Kaltpressverfahren Saft hergestellt, der mit *L. monocytogenes* inokuliert wurde. Danach wurden über eine Zeitserie quantitative Proben genommen, um den Effekt der Karotten auf die Listerien zu messen. Dies wurde mittels Verdünnungsreihen auf Selektivplatten (ALOA) erreicht und die Veränderung in der Anzahl koloniebildender Einheiten (KbE) zwischen Inokulum und dem jeweiligen Zeitpunkt quantifiziert.

Arbeitspaket 2: Analyse des Wirkmechanismus von Karottensaft auf *L. monocytogenes*.

Für Arbeitspaket zwei wurden wiederum *L. monocytogenes* in Karottensaft inokuliert. Das Protokoll zur Isolierung von qualitativ hochwertiger RNA aus *L. monocytogenes* in Karottensaft wurde erfolgreich etabliert und die ideale Konzentration Karottensaft eruiert, die zu einem subletalen Stress bei *L. monocytogenes* führt. Dies ist wichtig, weil es nicht zielführend ist, alle Bakterien abzutöten – es stünde keine RNA mehr zur Verfügung – jedoch soll der Stress auch stark genug sein, um eine starke Reaktion auf Bakterienseite auszulösen. Hier wurde eine 1:25 Verdünnung des Karottensafts als ideale Konzentration ermittelt, um einen subletalen Effekt auf *L. monocytogenes* zu erzielen. Es wurden drei Stämme *L. monocytogenes*, nämlich 10403S, EGDe, und LL195 parallel für 15 Minuten dem so verdünnten Karottensaft ausgesetzt. Dabei wurden nach 3 und 10 Minuten RNA isoliert und die überlebenden *L. monocytogenes* nach 15 Minuten quantifiziert. Verschiedene RNA-Extraktionsmethoden wurden getestet, wovon sich eine Kombination aus bead-beating für die Zelllyse mit einem säulenbasierten RNA Isolationskit (RNeasy Power Fecal Pro Kit, Qiagen, Nr. 78404) bewährt hat. Das Kit beinhaltet eine säulenbasierte DNase Behandlung, die sich als nicht effizient genug herausgestellt hat, weswegen die resultierende RNA im Anschluss noch einmal mit DNase behandelt wurde (Turbo DNA-free Kit, Invitrogen, Nr. AM1907). Danach wurde die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA (Invitrogen Superscript IV First strand cDNA synthesis system, nr. 18031200) umgeschrieben. Qualitätskontrollen beinhalten eine photospektrometrische Quantifizierung mittels Nanodrop® sowie die Überprüfung der DNase Behandlung mittels qPCR und die Ermittlung der RNA-Integrität mittels Agilent Bioanalyzer 2100®. Die resultierende cDNA wurde dann zur Sequenzierung mittels Illumina-Technologie™ an eine externe Firma geschickt (Novogene).

Die resultierenden Reads wurden mit FastQC (Babraham Bioinformatics - FastQC A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data, n.d.) getrimmt, gefiltert, und mit Bowtie2 (Langmead & Salzberg, 2012) mit Standardeinstellungen auf das entsprechende Genom gemappt. Die Statistische Analyse wurde mit DESeq (Love et al., 2014) erstellt. Es wurde das Transkriptom von *L. monocytogenes* Stämmen nach Exposition zu Karotten mit einem letalen Effekt verglichen mit dem Transkriptom nach Exposition zu Karotten ohne einen letalen Effekt und der Negativkontrolle im Kulturmedium TSB. Transkripte mit einer mindestens 2-fachen Hoch- oder Herunterregulierung nach Exposition zu Karotten mit letalem Effekt und einer false-discovery rate (FDR) von <0.05 wurden als signifikant beurteilt. Weitere Analysen der signifikant regulierten Gene wurde mit KEGG (Kanehisa & Goto, 2000) durchgeführt.

Resultate und Diskussion

Arbeitspaket 1: Screening von 52 Karottensorten auf ihren antilisterialen Effekt.

Das Julius-Kühn-Bundesforschungsinstitut für Kulturpflanzen (JKI) hat für uns eine Auswahl von Karottensorten aus ihrer umfangreichen Sammlung von Kultivaren angepflanzt. Die Auswahl richtete sich nach Gesichtspunkten der Diversität und mit Blick auf zum Teil am JKI verfügbaren chemischen Analysen der verschiedenen Sorten. In der Auswahl befanden sich auch stark wurzelähnliche Wildsorten, die sich von modernen Speisekarotten deutlich abheben. Von den zur Verfügung stehenden 52 Karottensorten konnten 46 erfolgreich auf ihren antilisterialen Effekt getestet werden. Die verbleibenden sechs Sorten bildeten sehr kleine, trockene und teils fast hölzernen Wurzeln, die nicht für eine Saftproduktion geeignet waren. Tabelle 1 fasst die Resultate zusammen. Neunzehn Sorten führten im ersten Jahr (2021) zu einer vollständigen Eliminierung von 10^6 KbE *L. monocytogenes* innerhalb von 3 Minuten (!) nach Zugabe der Bakterienkultur zu frischem Karottensaft.

Eine wichtige Frage war, ob dieser Effekt eine stabile Eigenschaft der Sorten ist und über mehrere Erntejahre konstant bleibt. Entsprechend wurden 2022 und 2023 eine Auswahl der „Extremsorten“ neu angebaut und der Effekt getestet. Für diese Wiederholungen wurden sogar 10^8 KbE *L. monocytogenes* eingesetzt, um in der Saison 2022 die Sorten mit dem stärksten Effekt zu identifizieren. 2023 wurden dann nur noch die drei Sorten mit dem stärksten Effekt angebaut, zusammen mit drei Karotten ohne Effekt die als Negativkontrollen in Experimenten dienen.

Damit haben wir jetzt eine solide Basis, um für zukünftige Anwendungen Karottensorten auszuwählen, die den antilisterialen Effekt stabil reproduzieren.

Tabelle 1. Zusammenfassung aller Screening-Ergebnisse

Nummer	Name	Ernte 2021				Ernte 2022			Ernte 2023		
		Bakterienwachstum ¹ nach				Bakterienwachstum ¹ nach			Bakterienwachstum ¹ nach		
		3min	15min	30min	120min	3min	15min	30min	3min	15min	30min
UM 21-01	Afghan Purple ⁴	-	-	-	-						
UM 21-02	Anthoinina	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-03	Berlicumer Bercoro ²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UM 21-04	Berlikum Perfecta	+	-	-	-						
UM 21-05	Betall	+++	++	+	-						
UM 21-06	Bitolski	+++	++	+	-						
UM 21-07	Blanche 1/2 longue des vosges	++	-	-	-						
UM 21-08	Brasilia	-	-	-	-	+++	+/+++	+			
UM 21-09	D. c. maximus	+++	+	-	-						
UM 21-10	D. c. carota ⁴										
UM 21-11	D. c. gummiifer ssp. gummiifer ⁴										
UM 21-12	D. c. gummiifer ssp. commutatus ⁴										
UM 21-13	D. c. carota ³	-	-	-	-	+++	-	-	++	-	-
UM 21-14	D. c. carota	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-15	D. c. gummiifer	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-16	D. c. carota ⁴										
UM 21-17	D. c. azoricus	++	++	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-18	Deep Purple	++	++	+	-						
UM 21-19	Gajar	+++	++	+	-						
UM 21-20	Hakata Kintoki ⁴					+++	+++	+++			
UM 21-21	Himuro Fuyugosi Gosun No.2	++	-	-	-						
UM 21-22	Kampino	+	-	-	-						
UM 21-23	Kuettiger	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-24	Long Red ⁴	-	-	-	-						
UM 21-25	Nantes Apollo	+++	+++	+++	+						
UM 21-26	Nantes Liva	+	-	-	-						
UM 21-27	Nantes Palisade	+++	+	-	-						
UM 21-28	Nutired	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-29	JKI-BL 12/87	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-30	Pariser Markt ²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UM 21-31	Presto ²	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
UM 21-32	Rotin	++	-	-	-						
UM 21-33	Santa Cruz	+++	++	+	-						
UM 21-34	Sapporo Futo	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-35	Senta	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-36	Short n'Sweet	+	-	-	-						
UM 21-37	Stratova	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-38	Viking	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-39	Vita Longa	+++	++	+	-						
UM 21-40	Western Red	+	-	-	-						
UM 21-41	White Satin	+++	+++	+++	++						
UM 21-42	Winterperfection	+++	++	-	-						
UM 21-43	Yellowstone	-	-	-	-	+++	+++	+++			
UM 21-44	GAT 52121 ³	-	-	-	-	+/+++	-	-	-	-	-
UM 21-45	D. c. carota HRIGRU 007301 ⁴					+++	+++	+++			
UM 21-46	D. c. carota GRCGB 11076	++	+	-	-						
UM 21-47	AZ 226/10 ³	-	-	-	-	+++	+/++	-	-	-	-
UM 21-48	AZ 227/10	-	-	-	-	+	-	-			
UM 21-49	AZ 75/07	++	++	-	-						
UM 21-50	AZ-Tam-13	++	+	+	-						
UM 21-51	Vitaminaja	+++	+++	+++	++						
UM 21-52	Yamanouchi Ishyaku Senko	-	-	-	-	+++	+++	+++			

¹ Bakterienwachstum nach Exposition von *L. monocytogenes* zu Karottensaft für 3, 15, 30 und 120 Minuten.
(-): kein Wachstum von Bakterien, (+): wenig Wachstum (ca. 1'000x Reduktion), (++) : mittleres Wachstum (ca. 100x Reduktion), (+++): volles Wachstum (keine Reduktion).

² Rot hinterlegte Zellen: mit einem konstant starken antilisterialen Effekt.

³ Grün hinterlegte Zellen: ausgewählte Karottensorten, die keinen antilisterialen Effekt aufweisen.

⁴ Dunkelgrau hinterlegte Zellen: Karottensorten waren zu trocken, um Saft herzustellen. Keine Testung möglich.

Hellgrau interlegte Zellen: auf eine Wiederholung wurde verzichtet.

Verschiedene frühere Studien, wie beispielsweise Bolten et al. 2023 (Bolten et al., 2023) haben eine hohe Variabilität des Effekts von Karotten beobachtet. Unsere eigenen Resultate liefern hierfür eine Erklärung. Beispielsweise wurden von Bolten et al. fünf verschiedene Karottensorten aus dem Supermarkt verwendet, und unsere Daten zeigen, dass die Karottensorte einen entscheidenden Einfluss auf den Effekt hat.

Arbeitspaket 2, Analyse des Wirkmechanismus von Karottensaft auf *L. monocytogenes*.

Für den weiteren Verlauf des Projekts wurden drei Karottensorten mit starkem antilisterialen Effekt sowie drei Sorten ohne Effekt ausgewählt, um den Wirkmechanismus näher zu charakterisieren. Dazu wurden drei Stämme *L. monocytogenes* ausgewählt und Karottensaft in subletalen Konzentrationen für 15 Minuten ausgesetzt, um sowohl Unterschiede zwischen den Karottensorten sowie auch eventuelle Differenzen in der Stressantwort verschiedener Stämme *L. monocytogenes* darzustellen.

Abbildung 1a zeigt die mit kulturellen Methoden quantifizierte Reduktion der verschiedenen Stämme *L. monocytogenes* nach 15 Minuten Exposition zu subletalen Verdünnungen (1:25) von rohem Karottensaft. Es fällt auf, dass *L. monocytogenes* LL195 deutlich resistenter gegenüber Karottensaft war als die beiden Stämme EGDe und 10403S, was unsere Hypothese, dass der Effekt stammspezifische Unterschiede zeigen würde, bestätigte. Während der Stamm LL195 ein humaner Ausbruchsstamm ist, sind EGDe und 10403S Laborstämme. Die stärkere Resilienz von LL195 könnte sich unter anderem daraus erklären, dass Laborstämme durch die langen Passagen in Labormedien einen Teil ihrer natürlichen Stressresilienz eingebüßt haben. Beispielsweise hat EGDe auch in Experimenten zu Säure (Bowman et al., 2010) - und Salzstress (Olesen et al., 2009) Unterschiede zu anderen Stämmen gezeigt und war weniger invasiv in eukaryotischen Wirtszellen (Kühbacher et al., 2014). 10403S war vergleichsweise wenig hitzetolerant im Vergleich zu anderen Stämmen (Shen et al., 2014). Mit Bezug auf die einzelnen Karotten bestätigten sich unsere Annahmen, dass die Karotten 13, 44 und 47 einen starken antilisterialen Effekt hatten, während die Karotten 3, 30 und 31 wenig oder keinen antilisterialen Effekt zeigten (Abb. 1b).

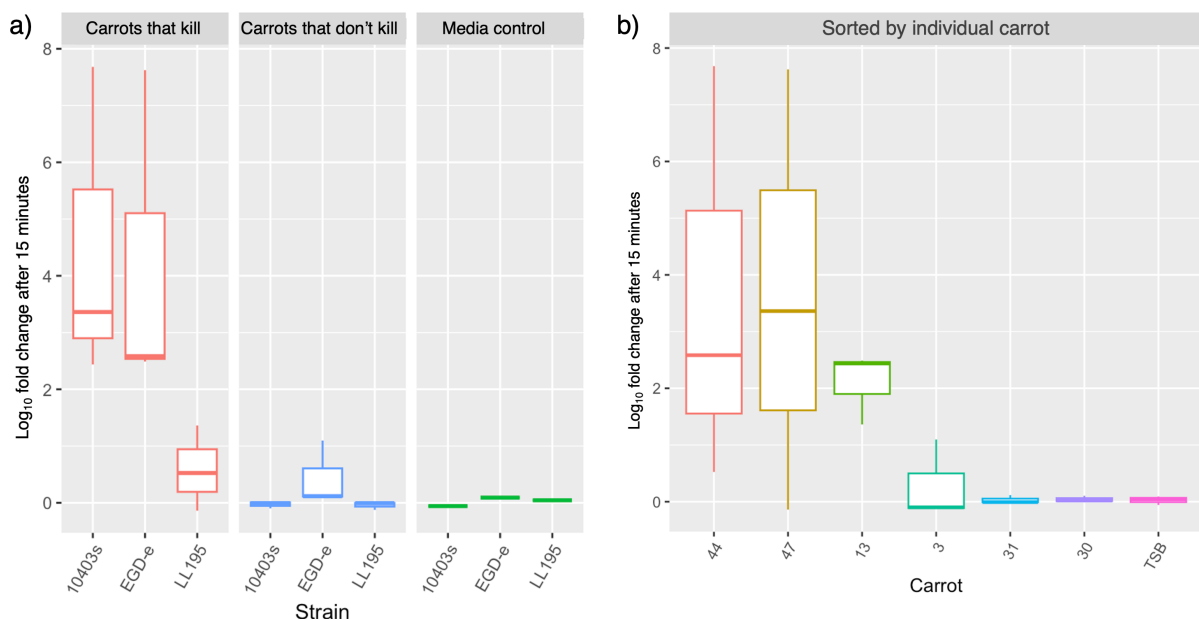


Abbildung 1: Kulturelle Quantifizierung des Effekts der in den RNAseq verwendeten Karotten. Dafür wurden drei Stämme *L. monocytogenes* für 15 Minuten subletalen Konzentrationen von Karottensaft ausgesetzt. Die gleichen Daten werden unterschiedlich aufgeschlüsselt dargestellt: a) der Effekt der drei ausgewählten Karotten mit einem starken Effekt („Carrots that kill“, Karotten no 13, 44, 47 aus Tabelle 1), der Karotten ohne Effekt („Carrots that don't kill“, Karotten no 3, 30, 31 aus Tabelle 1) und einer Negativkontrolle, wo die drei Stämme *L. monocytogenes* in Nährmedium inokuliert wurden („Media control“). b) der Effekt der individuellen Karottensorten auf alle Stämme *L. monocytogenes* kumulativ.

Bei diesen Experimenten wurde von allen *L. monocytogenes* Stämmen nach 3 und 10 Minuten RNA isoliert, um mittels RNASeq Veränderungen im Transkriptom von *L. monocytogenes* zu analysieren. Dabei wurden das Transkriptom nach Exposition zu den drei Karottensorten mit der stärksten Wirkung verglichen mit dem Transkriptom nach Exposition zu den Kontrollkarotten ohne Effekt bzw zu Kulturmedium (TSB). Aus diesen Daten können nun Rückschlüsse auf die molekularen Mechanismen des „Karotteneffekts“ auf *L. monocytogenes* gezogen werden.

Eine principle component analysis zeigt ein klares Clustering des Transkriptoms nach Exposition zu Karotten mit einem Effekt (no 13, 44, 47) gegenüber den Kontrollen ohne Effekt (no 3, 30, 31) und der Negativkontrolle (TSB) (Abb 2), was auch auf Transkriptomebene den durch Karotten verursachten Effekt bestätigt. Bei näherer Betrachtung zeigen sich Karotten- und *L. monocytogenes* stammspezifische Unterschiede. So scheinen beispielsweise Karotten no 13 und 44 einen ausgeprägten Effekt auf *L. monocytogenes* LL195 zu haben, während Karotte no 47 in *L. monocytogenes* EGDe besonders starke Veränderungen im Transkriptom auslöst (Abb 2b).

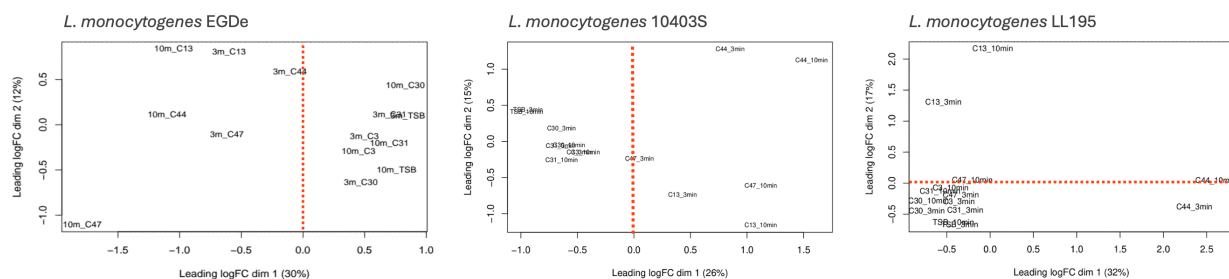


Abbildung 2:

Principle component analysis der RNAseq Resultate. *L. monocytogenes* wurden für 3 und 10 Minuten subletalen Konzentrationen von Karottensaft ausgesetzt. Dargestellt wird der Effekt der drei ausgewählten Karotten mit (no 13, 44, 47) und ohne Effekt (no 3, 30, 31) und der Negativkontrolle (TSB) auf das kumulative Transkriptom der drei verwendeten Stämme *L. monocytogenes*.

Unter den zehn am stärksten hochregulierten Genen sind für die einzelnen Stämme verschiedene Auffälligkeiten interessant:

In *L. monocytogenes* 10403S sind interessanterweise die fünf am stärksten hochregulierten Gene in Antwort auf Karottenstress hypothetische Proteine, die bis dato nicht näher charakterisiert sind. Dies mag damit zusammenhängen, dass bisher wenige Untersuchungen zu den Details der Interaktion von Karotten mit *L. monocytogenes* existieren und diese Proteine eine spezifische Funktion unter diesen Bedingungen erfüllen. Drei der wenig charakterisierten Proteine weisen eine phage shock protein Domäne auf (*pspC* oder *pspA*), für die in *Bacillus subtilis* eine Funktion in der Resilienz gegenüber Zellwandstress gezeigt wurde (Dell’Era et al., 2009).

In EGDe waren ebenfalls Proteine mit nicht näher charakterisierter Funktion unter den am stärksten hochregulierten Genen, darunter auch eines mit einer *pspC* Domäne. Ebenfalls stark hochreguliert waren zwei transkriptionelle Regulatoren (*Imo2003*, *Imo2004*), deren Funktion es ist, andere Gene hoch- oder herunterzuregulieren. Existierende Microarray Daten zeigen, dass die Expression von *Imo2003* und *Imo2004* eine starke positive Korrelation mit *Imo2001* aufweist (co-expression score: 0.61 / 0.77, Analyse mit String Version 12.0, string-db.org). *Imo2001* codiert für eine Untereinheit einer Mannose Phosphotransferase (PTS). Auch in unseren Daten sind verschiedene phosphotranferase-

Systeme, die für den Transport von Zuckern in die Zelle verantwortlich sind, hochreguliert, darunter auch *Imo2001*. Es liegt die Vermutung nahe, dass die beiden transkriptionellen Regulatoren *Imo2003* und *Imo2004* den Transport von Mannose über die Zellwand hochregulieren.

Auch in LL195 finden sich unter den am stärksten hochregulierten Genen zwei nicht näher charakterisierte Proteine mit *pspC* und *pspA* Domänen. Daneben sind Proteine mit Funktionen im Aufbau der Zellwand und membranständige Adhäsine stark hochreguliert.

Um übergreifende Trends in den regulierten Genen besser darzustellen, wurde eine KEGG Analyse durchgeführt (Kanehisa & Goto, 2000). Diese statistische Methode stellt dar, ob einzelne metabolische Synthesewege oder Funktionsbereiche unter den hoch- oder herunterregulierten Genen überdurchschnittlich vertreten waren. Dies war für mehrere Funktionsbereiche der Fall. Es zeigte sich, dass nach Exposition zu Karotten mit einem letalen Effekt Gene in den folgenden Kategorien und Funktionsbereichen im Vergleich zu den Kontrollen übervertreten waren.

1. **Aufbau und Integrität der Zellwand:**

Die KEGG Analyse zeigte eine überproportionale Häufung von Genen die metabolischen Synthesewegen in diesem Bereich zugeordnet sind: beta-Lactam resistance, Peptidoglycan biosynthesis, Teichoic acid biosynthesis.

Hier sind in allen drei Stämmen *L. monocytogenes* ein oder mehrere Penicillin-binding Proteine hochreguliert. Dabei handelt es sich um Bestandteile der Zellwand. Weitere Gene, deren Produkte im Aufbau der Zellwand involviert sind waren *gtcA*, *tagB*, *LMRG_01727*, *ydbT*, *dltA*, *dltD*, eine N-acetylglucosamine-6-phosphate deacetylase, und weitere Membranproteine. Viele davon waren in zwei oder allen drei Stämmen *L. monocytogenes* hochreguliert. Dies könnte auf einen Schaden in der Integrität der Zellwand nach Exposition zu Karottensaft hinweisen, der über eine gesteigerte Produktion von Peptidoglycan und Membranproteinen ausgeglichen wird. Bereits Kurosaki et al. 1983 haben spekuliert, dass von Karotten produzierte Phytoalexine, insbesondere 6-methoxymellein, einen antimikrobiellen Effekt haben könnten (Kurosaki & Nishi, 1983). Dies würde sich sehr gut mit den hier präsentierten Daten decken.

2. **Membrantransporter und Kohlenhydratstoffwechsel**

Die KEGG Analyse zeigte eine überproportionale Häufung von Genen, deren Produkte eine Funktion im Transport von Molekülen über die Zellwand haben oder sich durch Informationsvermittlung über die Zellwand auszeichnen. Hier waren insbesondere die folgenden Kategorien überproportional vertreten: Two-component systems (TCS), Phosphotransferase systems (PTS) und ATP binding cassette (ABC)-transporters.

Abbildung 3 fasst die Two-component Systeme zusammen, die in mindestens einem der drei Stämme *L. monocytogenes* in Antwort auf Karottenstress hochreguliert waren.

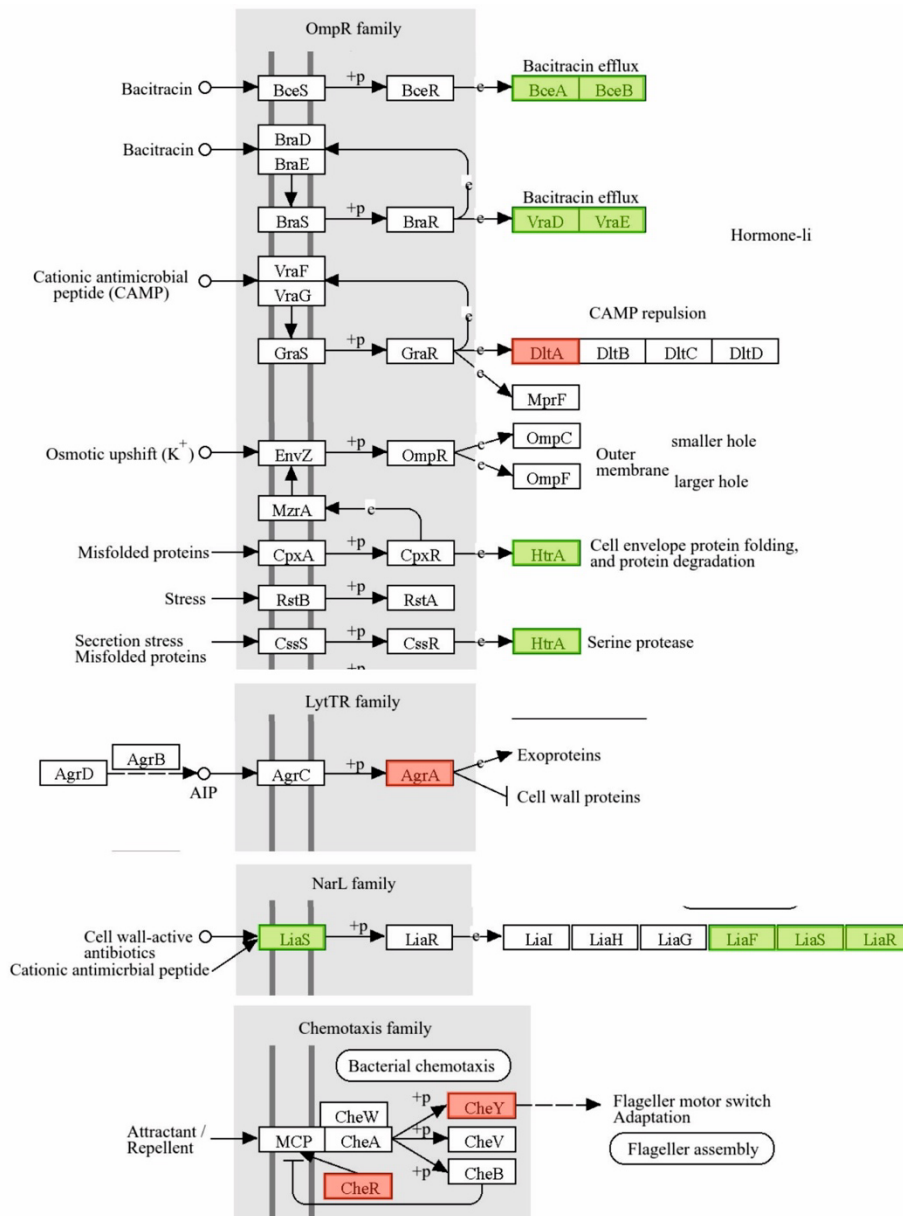


Abbildung 3:

Two-component Systems (TCS), die in mindestens einem Stamm *L. monocytogenes* nach Exposition zu subletalen Konzentrationen der Karotten mit einem starken antilisterialen Effekt unterschiedlich exprimiert wurden. Grün bedeutet eine Hoch-, rot eine Herunterregulation im Vergleich zu den Kontrollen mit Karotten ohne Effekt bzw. TSB Kulturmedium. Quelle: KEGG (REF:(Kanehisa & Goto, 2000))

Unter den TCS befinden sich einerseits Gene, deren Produkte in die zuvor bereits diskutierten Funktionsbereiche des Zellwandaufbaus involviert sind wie *htrA*, *dltA* und *agrA*. Andererseits fallen hier Gene auf, für deren Produkte eine Funktion in der Stressantwort auf verschiedene antimikrobielle Substanzen wie Bacitracin (*bceA*, *bceB*, *vraD*, *vraE*) und antimikrobielle kationische Peptide (*liaS*, *liaF*, *liaR*) beschrieben sind. Bacitracin ist ein Polypeptidantibiotikum, das an der Zytoplasmamembran die Transportproteine für den Export essentieller Bausteine der Peptidoglykansynthese hemmt. Kationische antimikrobielle Proteine (CAMP) sind natürlich vorkommende Breitspektrumantibiotika, die von praktisch allen Lebensformen zur Regulierung von Infektionen produziert werden und die auf

die innere Membran von Bakterien wirken (Zasloff, 2002). Es ist durchaus vorstellbar, dass die gleichen Proteine, die in Antwort auf Schäden an der Zellwand durch Bacitracin und CAMPs exprimiert werden, auch in Antwort auf andere Wirkstoffe mit Zielstrukturen an der Zellwand eine Funktion erfüllen und deshalb in Antwort auf Karottenstress hochreguliert werden. Für die Histidine Kinase LiaS und deren Regulator LiaR wurden zudem in der Vergangenheit Funktionen in der Stressantwort von *L. monocytogenes* EGDe nach Hitze-, Salz- und pH-Stress gezeigt (Pöntinen et al., 2017). Zudem haben Nguyen et al. (Nguyen-the & Lund, 1992) bereits 1992 festgestellt, dass die Zugabe von Histidin und bovine serum albumine (BSA) zu *L. monocytogenes* auf Karotten den letalen Effekt reduziert und dies auf die Funktion von Histidin und BSA als Radikalfänger zurückgeführt. Welchen Aspekt der möglichen stressreduzierenden Funktionen von Histidin *L. monocytogenes* unter Karottenstress nutzt ist aufgrund unserer Daten nicht eruierbar.

In Antwort auf Karottenstress sind Gene mit Funktionen in PTS und ABC-transportern überproportional vertreten. Beide sind involviert im Energiehaushalt der bakteriellen Zellen, und sowohl PTS als auch ABC-transporter nehmen überlappende Funktionen im Transport, der Regulierung und dem Metabolismus von Kohlestoffquellen für die Energiegewinnung wahr. Deshalb werden diese beiden Kategorien hier gemeinsam diskutiert. Es waren nach Karottenstress diverse PTS Systeme hochreguliert, die in den Import und die Regulierung von β -Glucosiden (*bglF*), Mannitol (*mtlA*), Cellobiose (*celABC*), Mannose (*manX*) und L-Ascorbat (*ulaABC*) involviert sind. Unter den ABC Transportern sind insbesondere Transporter, die Mono- und Polysaccharide wie Galactose (*ganOPQ*, *msmX*), Raffinose (*msmK*), Sorbitol und Mannitol (*smoK*), α -Glycoside (*aglK*), Maltose, Glucose, Mannose und Maltodextrin (*malk*), Cellobiose und Chitobiose (*msiK*) und Arabinooligosaccharide (*msmX*) importieren in mindestens zwei Stämmen *L. monocytogenes* hochreguliert. Diese Hochregulierung im Import von Kohlestoffquellen kann ein genereller Hinweis auf Energiestress bedeuten. Allerdings ist davon auszugehen, dass in Karottensaft genug Kohlestoffquellen und insbesondere auch die bevorzugte Glucose als Energiequelle vorhanden ist. Alternativ kann die Hochregulierung des Mannose PTS auch eine Reaktion auf Stress durch Sauerstoffradikale sein. In *E. coli* und Milchsäurebakterien wurde gezeigt, dass das Mannose PTS im Gegensatz zum Glucose PTS Peroxidresistent ist. Falls das in *L. monocytogenes* auch so ist, könnte im Falle eines oxidativen Stresses der Import von Glucose ausfallen und entsprechend das peroxidresistente PTS Mannose den Import von Kohlenstoffen für die Energieversorgung sicherstellen. Diese Regulierung im Import von Kohlestoffquellen erklärt auch, warum die KEGG Analyse auch die Kategorien Carbon Metabolism, Fructose and Mannose Metabolism, Glycolysis / Gluconeogenesis als überproportional unter den regulierten Genen nach Karottenstress auslöst.

3. Weitere Gene, deren Produkte eine Funktion in der Resilienz gegen Stress einnehmen.

Die KEGG-Analyse zeigte den Purinstoffwechsel und den bereits diskutierten Cationic antimicrobial Peptide (CAMP) resistance Stoffwechselpfad als signifikant unter den regulierten Genen an.

Im Purinstoffwechsel war in allen drei *L. monocytogenes* Stämmen eine (p)ppGpp Synthetase nach Karottenstress hochreguliert (*Imo0802* in EGDe, *LMRG02795* in 10403S und *ywaA* in LL195). (p)ppGpp ist Teil der stringent response in Bakterien, die bei Aminosäurenmangel den Metabolismus adaptiv steuert, indem weniger Ribosomen synthetisiert werden zugunsten gesteigerter Aminosäure-Neusynthese. Ob Karottenstress zu Aminosäurenmangel führt ist zu diesem Zeitpunkt nicht zu beantworten. Und es ist zu bemerken, dass in keinem der drei *L. monocytogenes* Stämme *relA*, der zentrale Regulator der stringent response, hoch- oder herunterreguliert war. Es ist möglich, dass die hier in allen drei Stämmen hochregulierte GTP pyrophosphokinase weitere, bisher nicht verstandene Funktionen erfüllt, die in Antwort auf Karottenstress der Fitness zuträglich sind.

Schlussfolgerungen, Zusammenfassung und Ausblick:

Die hier erhobenen Daten bilden eine solide Grundlage, um den antilisterialen Effekt von Karotten näher zu charakterisieren und für zukünftige Anwendungen nutzbar zu machen. Es zeigte sich, dass die Karottensorte eine ganz wesentliche Rolle spielt und längst nicht alle Karotten einen starken antilisterialen Effekt ausüben. Zudem zeigen die Stamm- und Karottenspezifischen Effekte, dass einzelne Stämme *L. monocytogenes* und von bestimmten Karottensorten besonders stark abgetötet wurden. Mit Blick auf eine eventuelle Verwendung von Karottensaft in Lebensmittelprodukten erscheint aufgrund dieser Daten eine Kombination von verschiedenen Karottensorten mit starkem Effekt ein guter Ansatz. In einem nächsten Schritt soll nun erhoben werden, wie stabil dieser Effekt unter verschiedenen für die Lebensmittelverarbeitung relevanten Bedingungen ist. Insbesondere ist langfristig vorgesehen, die Hypothese zu prüfen, dass der Zusatz von Karottensaft oder Konzentraten und Extrakten daraus in der Lebensmittelmatrix das Wachstumspotential von *L. monocytogenes* reduzieren kann. Dazu sollen verschiedene Hochrisikoprodukte mit Karottensaft als Zugabe verarbeitet werden und der antilisteriale Effekt eruiert werden. Hier bieten sich insbesondere nicht erhitzte Produkte im ready-to-eat Bereich an, da ältere Daten bereits gezeigt haben, dass der Effekt von Karotten nicht hitzestabil ist (Beuchat & Brackett, 1990).

Die RNAseq Daten deuten auf zwei mögliche, eventuell kombinierte Wirkmechanismen von Karottensaft auf die hier getesteten Stämme von *L. monocytogenes* hin: einerseits die Zellwand als Angriffsort, was durch die Hochregulierung von Komponenten der Zellwandsynthese und Genen, deren Produkte in der Abwehr von Zellwandstress involviert sind, belegt wird. Andererseits deuten die Verschiebungen im Kohlenstoff-Stoffwechsel sowie die Hochregulierung einer (p)ppGpp Synthetase auf einen generell erhöhten Energiebedarf hin oder können als Reaktion auf oxidativen Stress gelesen werden.

Insbesondere die Evidenz für einen Wirkmechanismus über die Zellwand als Angriffsort legt die Hypothese nahe, dass es einen Unterschied im Effekt von Karottensaft auf Gram+ Bakterienspezies wie *L. monocytogenes* und Gram- Bakterienspezies geben könnte, da deren Zellwand grundsätzliche Unterschiede im Aufbau aufweist. Dies soll nun in einem nächsten Schritt evaluiert werden, gegen welche anderen Spezies Karottensaft wirksam ist. Hier existieren auch bereits Daten aus unseren Vorversuchen und älteren Studien, die diese Hypothese stützen (Bolten et al., 2023). Daneben laufen aktuell elektronenmikroskopische Analysen, um die morphologischen Veränderungen in den *L. monocytogenes* Zellen nach Karottenstress zu charakterisieren.

Um die aktive Substanz in Karotten näher zu charakterisieren sind in Zukunft auch vergleichende Massenspektrometrische Untersuchungen zwischen Karotten mit und ohne antilisterialen Effekt vorgesehen, die einen Hinweis auf Moleküle geben können, die ausschließlich in Karotten mit Effekt vorkommen.

Präsentationen auf Konferenzen

Das Projekt wurde bisher an folgenden Anlässen vorgestellt:

Keynote Lecture an der 62. Arbeitstagung des Arbeitsgebietes Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz 2022, Garmisch Partenkirchen, 25.-28.10.2022. (Prof. C. Guldemann)

<http://www.dvg-lebensmittelsicherheit.de>

Vortrag am 11. Leipziger Tierärztekongress, 7. bis 9. Juli 2022. (Prof. C. Guldemann)

<https://www.tieraerztekongress.de/de/>

10th congress of the European Microbiologists (FEMS 2023), Hamburg, 9 - 13 July 2023.

(med. vet. Jana Walter, Doktorandin).

<https://www.fems2023.org>

Food Micro 2024 Konferenz, Burgos, Spanien, 8.-11.07.2024

(med. vet. Jana Walter, Doktorandin).

<https://foodmicro2024.com/home.php>

Science Speed Slam, LMU Muenchen, Munich, Germany, 05.07.2024, 1. Platz

(med. vet. Jana Walter, Doktorandin).

3-min PhD Pitch, University of Porto, Porto, Portugal, 19.09.2024, 2. Platz

(med. vet. Jana Walter, Doktorandin).

REFERENZEN

- Beuchat, L. R., & Brackett, R. E. (1990). Inhibitory Effects of Raw Carrots on *Listeria monocytogenes*. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 56, Issue 6).
<https://journals.asm.org/journal/aem>
- Bolten, S., Mowery, J., Gu, G., Redding, M., Kroft, B., Luo, Y., & Nou, X. (2023). *Listeria monocytogenes* loss of cultivability on carrot is associated with the formation of mesosome-like structures. *International Journal of Food Microbiology*, 390.
<https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2023.110121>
- Bowman, J. P., Chang, K. J. L., Pinfold, T., & Ross, T. (2010). Transcriptomic and Phenotypic Responses of *Listeria monocytogenes* Strains Possessing Different Growth Efficiencies under Acidic Conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(14), 4836–4850.
https://doi.org/10.1128/AEM.00315-10/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY_DATA_DIACETATE_PAPER_REVIS.DOC
- Dell'Era, S., Buchrieser, C., Couvé, E., Schnell, B., Briens, Y., Schuppler, M., & Loessner, M. J. (2009). *Listeria monocytogenes* forms respond to cell wall deficiency by modifying gene expression and the mode of division. *Molecular Microbiology*, 73(2), 306–322. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2009.06774.X>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 27–30. <https://doi.org/10.1093/NAR/28.1.27>
- Kühbacher, A., Cossart, P., & Pizarro-Cerdá, J. (2014). Internalization Assays for *Listeria monocytogenes*. *Methods in Molecular Biology*, 1157, 167–178. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0703-8_14
- Kurosaki, F., & Nishi, A. (1983). Isolation and antimicrobial activity of the phytoalexin 6-methoxymellein from cultured carrot cells. *Phytochemistry*, 22(3), 669–672. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86959-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86959-9)
- Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* 2012 9:4, 9(4), 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/S13059-014-0550-8/FIGURES/9>
- Nguyen-the, C., & Lund, B. M. (1992). An investigation of the antibacterial effect of carrot on *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 73(1), 23–30.
<https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.1992.TB04964.X>
- Olesen, I., Vogensen, F. K., & Jespersen, L. (2009). Gene transcription and virulence potential of *Listeria monocytogenes* strains after exposure to acidic and NaCl stress. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(6), 669–680. <https://doi.org/10.1089/FPD.2008.0243>
- Pöntinen, A., Lindström, M., Skurnik, M., & Korkeala, H. (2017). Screening of the two-component-system histidine kinases of *Listeria monocytogenes* EGD-e. LiaS is needed for growth under heat, acid, alkali, osmotic, ethanol and oxidative stresses. *Food Microbiology*, 65, 36–43.
<https://doi.org/10.1016/J.FM.2017.01.018>
- Shen, Q., Jangam, P. M., Soni, K. A., Nannapaneni, R., Schilling, W., & Silva, J. L. (2014). Low, medium, and high heat tolerant strains of *Listeria monocytogenes* and increased heat stress resistance after exposure to sublethal heat. *Journal of Food Protection*, 77(8), 1298–1307.
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-423>
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002 415:6870, 415(6870), 389–395. <https://doi.org/10.1038/415389a>