

**Erweiterung der genetischen Werkzeuge für das
Darmbakterium *Phocaeicola vulgatus* zur Untersuchung des
Katabolismus und des Phenolsäure-Stoffwechsels**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. Nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

André Neff

aus

Troisdorf

Bonn, 2023

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

2. Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl

Datum der Promotion: 01.02.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Neff, A., Lück, R., Hövels, M., & Deppenmeier, U. (2023). Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. *Anaerobe*, 81, 102742. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2023.102742

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1. Einleitung	1
1.1 Die humane Intestinal-Mikrobiota	1
1.2 Der Organismus <i>Phocaeicola vulgatus</i>	2
1.3 Bioaktive phenolische Verbindungen.....	3
1.3.1 Polyphenole	4
1.3.2 Phenolsäuren im Darm	6
1.3.3 Zimt- und Cumarsäure.....	6
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit	7
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Chemikalien und weitere Materialien.....	9
2.1.1 Chemikalien	9
2.1.2 Gase	9
2.1.3 Enzyme	9
2.1.4 Antibiotika	10
2.1.5 Kits	10
2.1.6 DNA- und Protein-Marker	10
2.1.7 Datenbanken und Software	11
2.1.8 Dienstleistungen.....	11
2.2. Organismen, Primer und Plasmide.....	12
2.2.1 Organismen	12
2.2.2 Oligonukleotidprimer	12
2.2.3 Plasmide	14
2.3 Mikrobiologische Methoden	15
2.3.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	15
2.3.2 Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen	16
2.3.3 Stammerhaltung der verwendeten Mikroorganismen	19
2.3.4 Messung der optischen Dichte.....	19
2.3.5 Bestimmung von Wachstumsparametern.....	20
2.3.6 Anreicherung und Isolierung von anaeroben Mikroorganismen	20
2.4 Molekularbiologische Methoden	21
2.4.1 Isolierung von genomischer DNA	21
2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA	21
2.4.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	21
2.4.4 Isolierung von RNA	21

2.4.5 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen	21
2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	22
2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	24
2.4.8 Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (RT-qPCR)	24
2.4.9 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten	25
2.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten	26
2.4.11 Klonierung mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly	27
2.4.12 Transformation von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i> -Stämme	27
2.4.13 Transformation von Plasmid-DNA in <i>P. vulgatus</i>	28
2.4.14 Gendeletion in <i>P. vulgatus</i>	29
2.5 Biochemische Methoden	30
2.5.1 Überproduktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	30
2.5.2 Zellaufschluss mittels Ultraschalls	31
2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie	31
2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentration	32
2.5.5 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	32
2.5.6 Silber-Färbung	34
2.5.7 Western-Blot	35
2.5.8 Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen	36
2.6 Analytische Methoden	37
2.6.1 Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)	37
2.6.2 Fluoreszenz-Mikroskopie mit Laser-Mikroskop	38
2.6.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Pyrophosphat	39
2.6.4 Quantifizierung von ATP	40
2.7 Bestimmung von Enzym-Aktivitäten	40
2.7.1 Bestimmung der Indolpyruvat-Oxidoreduktase (IOR)-Aktivität	40
2.7.2 Bestimmung der Phenylelessigsäure-Coenzym A Ligase-Aktivität	42
2.7.3 Gekoppelter Enzymtest zum Nachweis der Bildung von Phenylelessigsäure	43
2.7.4 Charakterisierung der aromatischen Aminosäuren Ammoniak-Lyase (TAL) aus <i>P. vulgatus</i> (BVU_1010)	43
2.7.5 Charakterisierung der Exo- β -Fructosidase BVU1663	44
3. Ergebnisse	46
3.1 Etablierung eines Systems für die markerlose Gendeletion in <i>P. vulgatus</i>	46
3.1.1 Bioinformatische Analyse für die Anwendung von <i>sacB</i> in Bacteroidota	47
3.1.2 Heterologe Überexpression von <i>sacB</i> in <i>P. vulgatus</i> mithilfe des Shuttle-Vektors pG106 ..	49
3.1.3 Integration von <i>sacB</i> in das Genom von <i>P. vulgatus</i> über das pMM656 Vektor-System	51
3.1.4 Klonierung eines Knockout-Vektors zur gezielten Deletion von <i>bvu_1663</i>	53
3.1.5 Durchführung der ersten homologen Rekombination	55
3.1.6 Durchführung der zweiten homologen Rekombination	56

3.1.7 Phänotyp-Analyse und Komplementierung von <i>P. vulgatus</i> $\Delta 1663$	57
3.1.8 Deletion von <i>bvu_1663</i> mit dem <i>upp</i> -Gegenselektionssystem.....	60
3.1.9 Charakterisierung von BVU 1663	63
3.1.9.1 Heterologe Überproduktion und Aufreinigung von BVU 1663.....	63
3.1.9.2 Abbau von Levan- und Inulin-FOS durch BVU_1663	64
3.1.9.3 Mögliche Substrate von BVU_1663	68
3.1.9.4 Lokalisierung von BVU_1663 in <i>P. vulgatus</i>	69
3.2 Modifizierung des Kohlenstoff-Flusses in <i>P. vulgatus</i>	72
3.2.1 Klonierung des Shuttle-Vektors pg106 BVU 2880	72
3.2.2 Vergleich der Transkript-Abundanz von <i>bvu_2880</i> im <i>P. vulgatus</i> Wildtyp mit <i>P. vulgatus</i> pg106 2880.....	73
3.2.3 Einfluss der <i>pfl</i> -Transkriptmenge auf das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte in <i>P. vulgatus</i>	75
3.3 Isolierung von Bakterien des Phylums Bacteroidota aus humanen Stuhlproben	77
3.3.1 Identifizierung geeigneter Isolierungsparameter.....	77
3.3.2 Screening nach Organismen des Phylums Bacteroidota	78
3.4 Produktion von Phenolsäuren durch <i>P. vulgatus</i>	79
3.4.1 Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahrens zur Analyse von Phenolsäuren	80
3.4.1.1 Chromatographische Analytik durch Polymerbasierte Aminex-Trennsäulen.....	80
3.4.1.2 Chromatographische Analytik durch Silica-Partikel mit Pentafluorophenylgruppen	81
3.4.2 Aufklärung des Phenolsäure-Stoffwechsels von <i>Phocaeicola vulgatus</i>	83
3.4.2.1 Bildung von Phenylelessigsäure	83
3.4.2.2 Heterologe Produktion und Aufreinigung der Indolpyruvat Oxidoreduktase (IOR) BVU_2273/74 aus <i>P. vulgatus</i>	84
3.4.2.3 Charakterisierung der Indolpyruvat Oxidoreduktase (IOR) BVU_2273/74 aus <i>P. vulgatus</i> BVU 2273/74	86
3.4.2.4 Heterologe Produktion und Aufreinigung der Phenylelessigsäure Coenzym A Ligase BVU_2276 aus <i>P. vulgatus</i>	88
3.4.2.5 Charakterisierung der Phenylacetyl-Coenzym A Ligase aus <i>P. vulgatus</i> (BVU_2276)....	89
3.4.2.6 Nachweis der Phenylelessigsäure-Bildung durch die Indolpyruvat-Oxidoreduktase in Kombination mit der Phenylelessigsäure-CoA-Ligase aus <i>P. vulgatus</i>	91
3.4.2.7 In Vivo Nachweis der Phenylelessigsäure-Bildung in <i>P. vulgatus</i>	92
3.4.3 Bildung von Zimtsäure und Cumarsäure	94
3.4.3.1 Bioinformatische Analysen zu Ammoniak Lyasen in <i>P. vulgatus</i>	94
3.4.3.2 Heterologe Produktion und Aufreinigung von BVU_1010.....	96
3.4.3.3 Untersuchung der möglichen Substrate und Produkte von BVU_1010	97
3.4.3.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von BVU_1010	98
3.4.3.5 Klonierung des Shuttle-Vektors pG106_/ <i>dhnp_bvu1010</i>	101
3.4.3.6 Transkriptabundanz <i>bvu_1010</i>	102

3.4.3.7 Homologe Überproduktion von BVU_1010 in <i>P. vulgatus</i>	103
3.5 Evaluierung von Fluoreszenz-Tags für die anaerobe Visualisierung von Proteinen in <i>P. vulgatus</i>	104
3.5.1 Konstruktion der Vektoren für die N-terminale Fusion von Fluoreszenz-Tags mit der Lactat-Dehydrogenase (<i>bvu_2499</i>) von <i>P. vulgatus</i>	105
3.5.2 Detektion der Fusionsproteine in <i>P. vulgatus</i> mittels Fluoreszenz-Mikroskopie.....	106
4. Diskussion	110
4.1 Genetische Tools für Arten der Gattungen <i>Bacteroides</i> und <i>Phocaeicola</i>	111
4.1.1 Die genetische Zugänglichkeit von Arten der Gattungen <i>Bacteroides</i> und <i>Phocaeicola</i> ...	111
4.1.1.1 Shuttle-Vektoren.....	112
4.1.1.2 Genom-integrative Vektoren	114
4.1.2 Markerlose Deletion von Genen in Spezies der Gattungen <i>Bacteroides</i> und <i>Phocaeicola</i> mittels homologer Rekombination und SacB-Gegenselektion	116
4.1.3 Weitere Gegenselektionsmarker für die markerlose Gen-Deletion in <i>Bacteroides</i> und <i>Phocaeicola</i> -Spezies	121
4.2 Der Fruktan-Metabolismus von <i>P. vulgatus</i>	124
4.2.1 Bedeutung von <i>Bacteroides</i> und <i>Phocaeicola</i> -Spezies für die Verwertung von Fruktan-Polymeren	124
4.2.2 Modellierung der Fruktan-Verwertung in <i>P. vulgatus</i>	126
4.3 Homologe Überproduktion der Pyruvat:Formiat-Lyase (BVU2880) in <i>P. vulgatus</i>	129
4.4 Anreicherung von Bakterien des Phylums Bacteroidota.....	140
4.5 Der Zusammenhang zwischen bioaktiven Phenolsäuren und der Darmmikrobiota.....	142
4.5.1 <i>Bacteroides</i> und <i>Phocaeicola</i> -Spezies als Quelle von Phenylelessigsäure im Darm	143
4.5.2 Kanalisierung des C-Stoffwechsels in Richtung aromatischer Aminosäuren	146
4.5.3 Produktion von Phenylelessigsäure durch <i>P. vulgatus</i>	147
4.5.3.1 Alternative Wege für die Produktion von Phenylelessigsäure in <i>P. vulgatus</i>	149
4.5.4 Biotechnologische Produktion von Zimtsäure und Cumarsäure.....	152
4.6 Fluoreszenz-Markierung von obligat anaeroben Mikroorganismen.....	157
4.6.1 Übersicht von Fluoreszenz-Markern für die Anwendung unter anaeroben Bedingungen	157
4.6.1.1 Sauerstoff-unabhängige Fluoreszenz-Tags	160
4.6.1.2 Biokonjugation.....	162
4.6.1.3 Struktur-spezifische Fluoreszenz-Markierung	164
5. Zusammenfassung	166
6. Literaturverzeichnis	168
7. Danksagung.....	188

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
1,3-bPG	1,3-Bisphosphoglycerat
2-PG	2-Phosphoglycerat
3-PG	3-Phosphoglycerat
4CL	4-Cumarsäure:CoA-Ligase
5-FC	5-Fluorocytosin
5F-dUMP	5-Fluorodesoxyuridinmonophosphat
5-FU	5-Fluorouracil
6PGDH	6-Phosphogluconat-Dehydrogenase
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetrazyklin
AMP	Adenosinmonophosphat
AmpR	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BF	Hellfeld
BHI	Brain heart infusion; Komplexmedium
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
Bp	Basenpaare
C4H	Cinnamat-4-Hydroxylase
cDNA	In DNA transkribierte RNA
cm	Zentimeter
CoA	Coenzym A
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
DFHBI	3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzylidin Imidazolinon
DH	Dehydrogenase
DHAP	Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat
DHAPS	Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat Synthase
DMM	Defined Minimal Media; Minimalmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate
Down	Down-Stream
dsDNA	Double-stranded DNA
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dTMP	Desoxy-Thymidinphosphat
E4P	Erythrose-4-Phosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP-Weg	Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg
ErmR	Erythromycin-Resistenz
Ery	Erythromycin
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i> (und andere)
F6P	Fruktose-6-Phosphat
Fd _{ox}	Oxidiertes Ferredoxin

Fd _{red}	Reduziertes Ferredoxin
FOS	Fructooligosaccharide
Frc	Fruktose
FUdr	5-Fluoro-2'Desoxyuridin
fw	Forward Primer
g	Gramm
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	„green-fluorescent“ Protein
Glc	Glucose
Glu	Glutamat
Gm	Gentamycin
GSM	Gegenselektionsmarker
h	Stunde
H ₂ O _{dest.} , H ₂ O _{reinst}	Destilliertes Wasser, Reinstwasser
HAL	Histidin Ammoniak Lyase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HR	Homologe Rekombination
IOR	Indolpyruvat Oxidoreductase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
LDH	Lactat-Dehydrogenase
M	Molar (mol pro l)
MI	Maximal Induction Medium
min	Minute
MIO	3,5-Dihydro-5-Methyldiene-4H-Imidazol-4-on
ml	Milliliter
mM	Milimolar
MV	Methylviologen
NAD(H)	Nicotinamadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamadenindinukleotidphosphat
NDHI	H ⁺ -translozierende NADH:Chinol-Dehydrogenase I
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nqr	Na ⁺ -translozierende NADH:Chinol-Reduktase
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
<i>oriT</i>	Replikationsursprung zur Konjugation
OxPP	Oxidativer Pentosephosphatweg
p. a.	Per Analysis
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
PAL	Phenylalanin Ammoniak Lyase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBST	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat

PFL	Pyruvat:Formiat Lyase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKU	Phenylketonurie
PPi	Pyrophosphat
PPW	Pentosephosphatweg
PY	Peptone Yeast; Komplexmedium
R5P	Ribose-5-Phosphat
rev	Reverse Primer
RI	Brechungsindex
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf	Ferredoxin:NAD ⁺ -Oxidoreduktase
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
Ru5P	Ribulose-5-Rhosphat
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
Sac	Saccharose
SCFAs	Short-chain fatty acids; Kurzkettige Fettsäuren
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SM	Selektionsmarker
Spp.	<i>species pluralis</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAL	Tyrosin-Ammoniak-Lyase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TG	Zelltrockenmasse
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Up	Up-Stream
upp	Phosphoribosyl-Transferase
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenkonzentration, Volumen pro Volumen
V _{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	Massekonzentration, Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
WT	Wildtyp
X5P	Xylose-5-Phosphat
αKG	α-Ketoglutarat
Δ _{μH⁺}	Elektrochemischer Protonengradient
Δ _{μNa⁺}	Elektrochemischer Natriumionengradient
ε	Extinktionskoeffizient
μ	Wachstumsrate
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1 Die humane Intestinal-Mikrobiota

Die humane Mikrobiota umfasst alle Mikroorganismen, die als Kommensale auf äußeren Oberflächen wie der Haut und inneren Körperoberflächen, insbesondere im Gastro-Intestinaltrakt, als Kommensale leben. Während auf der Haut aufgrund hoher UV-Belastung, niedrigem pH-Wert und Flüssigkeitsmangel eher lebensfeindliche Bedingungen herrschen (Byrd *et al.*, 2018), bietet der Darm im Gegensatz dazu ein feuchtes Habitat, eine kontinuierliche Versorgung an Nährstoffen und konstante 37 °C (Ley *et al.*, 2006). Die Diversität der Intestinalflora wird auf 1000 verschiedene Arten geschätzt und macht bis zu 200 g der Körpermasse aus (Zhu *et al.*, 2010, Sender *et al.*, 2016). Die humane Darmmikrobiota kann im übertragenen Sinne auch als „Organ“ bezeichnet werden, welches sich zusammen mit dem menschlichen Körper entwickelt. Im Säuglingsstadium wird der Intestinaltrakt von Bakterien der Gattungen *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* und *Staphylococcus* dominiert, da sich die Nährstoffzufuhr auf Muttermilch beschränkt. Mit der Einnahme fester Nahrung verändert sich die Mikrobiota durch die Anwesenheit von Organismen der Phyla Bacteroidota und Bacillota (Ihekweazu *et al.*, 2018). Die korrekte Entwicklung des Immunsystems wird ebenfalls mit der Darmflora assoziiert. Die Antigene der Darmflora stimulieren Abwehrfunktionen durch provozierte Immunantworten und vermitteln auf diesem Wege die ersten Toleranzen gegen potenzielle pathogene Organismen im Darm (Round & Mazmanian, 2009). Darüber hinaus ergänzen Bakterien im Darmtrakt den Stoffwechsel des Menschen, beispielsweise durch die Synthese von Vitamin K (Hill *et al.*, 1997) oder dem Abbau von Ballaststoffen zu kurzkettigen Fettsäuren wie Acetat, Butyrat und Propionat, welche von Colonocyten wieder resorbiert werden (Guarner *et al.*, 2013).

In einer groben Darstellung setzt sich der menschliche Intestinaltrakt aus dem Dün- und Dickdarm zusammen. Während aufgrund des pH-Werts, Gallensalzen und Sekreten des Pankreas nur geringe Mengen an Mikroorganismen an der Schnittstelle zwischen dem Magen und dem proximalen Teil des Dünndarms angesiedelt sind ($10^3 - 10^4$ Zellen ml^{-1}), nimmt die Zellzahl von Prokaryoten im distalen Dünndarm und Dickdarm massiv zu (O'Hara and Shanahan, 2006; Leser & Mølbak, 2009; Sender *et al.*, 2016). Mit 10^{11} Zellen ml^{-1} stellt das Colon eine der mit Fremdzellen am dichtesten besiedelten Oberflächen im Körper von Säugetieren dar und fungiert somit als spezialisiertes Fermentationsorgan für die Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen (O'Hara and Shanahan, 2006; Sender *et al.*, 2016). Als Nahrungsquelle dienen für den Menschen ansonsten unverdaulichen Ballaststoffe, die durch ein Netzwerk Spezies-übergreifender hydrolytischer Enzyme verfügbar gemacht werden (Flint *et al.*, 2008; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2014).

1. Einleitung

Die Diversität der humanen Darmmikrobiota ist extrem variabel und hängt von unterschiedlichen Faktoren wie der Ernährung (David *et al.*, 2014), der geografischen Lage (Rehman *et al.*, 2016) und der genetischen Veranlagung des Menschen ab (Ley *et al.*, 2008). In der nahen Vergangenheit wurde versucht diese Komplexität in sogenannten Enterotypen abzubilden, um eine systematische Einordnung dieser Diversität zu ermöglichen (Arumugam *et al.*, 2011). Dieses Konzept geriet jedoch in Kritik, da die Zahl an Ausnahmefällen eine solche Einordnung schlicht nicht zulässt (Cheng & Ning, 2019). Trotz dieser hohen Variabilität der Mikrobiota zwischen verschiedenen Individuen spielt die Stabilität der Art-Zusammensetzung eine übergeordnete Rolle für die Gesundheit des Menschen. Plötzliche Änderungen der Darmmikrobiota konnten beispielsweise mit Störungen des Darmepithels oder chronischen Entzündungserkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Cani *et al.*, 2008; Le Chatelier *et al.*, 2013). Der Einfluss der Darmflora bezieht sich jedoch nicht nur auf die humane Physiologie. In einigen Studien wurden sogar psychologische Krankheitsbilder wie Depressionen, Angststörungen und Schizophrenie mit der Darmmikrobiota assoziiert (Collins *et al.*, 2012; Braniste *et al.*, 2014; Dinan *et al.*, 2015).

Im vergangenen Jahrzehnt haben einige wenige Vertreter der Darmmikrobiota, aufgrund ihrer metabolischen Charakteristika und der damit verbunden Rolle in der Aufrechterhaltung der Darm-Homöostase, erhebliche Aufmerksamkeit erlangt. Unter dem Begriff der Probiotika werden beispielsweise Organismen *Akkermansia* (A.) *muciniphila* und *Faecalibacterium prausnitzii* wertvolle immunmodulatorische Effekte zugesprochen, welche bei der Bekämpfung von Krankheiten, wie z.B. dem Reizdarm-Syndrom, unterstützend wirken (Dao *et al.*, 2016). Vertreter der Familie *Bacteroidaceae* stehen ebenfalls im Fokus der Forschung. Die beiden Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* machen in den meisten Personen zahlenmäßig den größten Anteil an Bakterienzellen (~40%) im Dickdarm aus, daher ist das Verständnis für diese beiden Gattungen im Zusammenspiel mit der menschlichen Gesundheit von erheblichem Interesse (King *et al.*, 2019).

1.2 Der Organismus *Phocaeicola vulgatus*

Ehemals bekannt als *Bacteroides vulgatus* wird *Phocaeicola* (P.) *vulgatus* aufgrund seiner hohen Abundanz (Bis zu 15% aller Bakterienzellen im Dickdarm) als eines der wichtigsten Darmkommensale im menschlichen Dickdarm betrachtet (Salysers *et al.*, 1984, King *et al.*, 2019). *P. vulgatus* gehört dem Phylum der Bacteroidota an und wurde erstmals im Jahre 1933 aus humanen Faeces isoliert (Eggerth und Gagnon, 1933). Die genomische Gesamtdivergenz zur Gattung *Bacteroides* spp. führte im Jahr 2019 zu einer phylogenetischen Neueinordnung des Organismus in die Gattung *Phocaeicola* (García-López *et al.*, 2019). Bei *P. vulgatus* handelt es sich um ein Gram-negatives, pleomorphes und Stäbchenförmiges Bakterium mit einem obligat anaeroben Stoffwechsel (Wexler, 2007). Die Implikationen von *P. vulgatus* für die menschliche Gesundheit werden durch Studien mit

1. Einleitung

widersprüchlichen Ergebnissen geprägt. Für *P. vulgatus* konnte, im Zuge von Multi-Omics-Analysen des Darmmikrobioms von Patienten mit Colitis ulcerosa, ein Zusammenhang zwischen Proteasen und der Schwere der Erkrankung festgestellt werden (Mills *et al.*, 2022). Gleichzeitig korreliert die Abundanz von *P. vulgatus* mit der Fähigkeit zur Produktion von entzündungshemmenden Zytokinen (di Lorenzo *et al.*, 2020) sowie mit einem Schutz von einer durch *Escherichia coli* induzierten Colitis (Waidmann *et al.*, 2003). Darüber hinaus hat *P. vulgatus* einen inhibitorischen Effekt auf die mikrobielle Lipopolysaccharidproduktion im Darm, wodurch das Risiko auf eine Atherosklerose reduziert wird (Yoshida *et al.*, 2018)

P. vulgatus besitzt alle Enzyme für die Metabolisierung von Glucose über den Emden-Meyerhoff-Parnas-Weg (EMP-Weg) sowie die Schlüsselenzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (BVU_2796) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (BVU_2795) des oxidativen Zweigs des Pentosephosphat-Wegs. Somit ist *P. vulgatus* in der Lage eine Vielzahl von Mono- und Disacchariden zu den Endprodukten Lactat, Formiat, Acetat, Succinat und Propionat zu fermentieren (McCarthy *et al.*, 1988, Lück & Deppenmeier, 2022). Die Atmungskette von *P. vulgatus* besteht aus fünf Membrankomplexen: Dem Rnf-Komplex, einer „kopflosen“ NDH-Variante, der Nqr, einer Fumarat-Reduktase und der Cytochrom-bd-Chinoloxidase (Ito *et al.*, 2020). Die entsprechenden Elektronenübertragungsschritte gehen mit der Erzeugung eines elektrochemischen Na⁺ oder H⁺ Gradienten einher, der eine Energiekonservierung über eine F₁F₀-ATP-Synthase ermöglicht (Koumandou & Kossida, 2014). Zusätzlich können durch die Cytochrom-bd-Chinoloxidase unter mikroaerophilen Bedingungen Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, wobei der dadurch entstehende Protonengradienten der ATP-Generierung dient (Baughn & Malamy, 2004). Im Gegensatz zu anderen relevanten Darmkommensalen, wie z.B. *Segatella (S.) copri*, ist *P. vulgatus* auch zur Produktion von Propionat befähigt. Viele Vertreter der Bacteroidota kodieren Enzyme für den Methyl-malonyl-CoA-Weg, bei dem über Succinyl-CoA, Methylmalonyl-CoA und Propionyl-CoA schließlich Propionat freigesetzt wird (Macy und Probst, 1979).

1.3 Bioaktive phenolische Verbindungen

Für die Zusammensetzung der Mikrobiota eines Individuums ist der Ernährungsstil von entscheidender Bedeutung (Alexander & Turnbaugh, 2020). Der Anteil an Ballaststoffen, Kohlenhydraten sowie Fett und Proteinen in Nahrungsmitteln sorgt für kurzfristige, jedoch signifikante Änderungen der dominierenden Bakterien-Arten im menschlichen Darm (Cheng & Ning, 2019). Besonders das Konzept der Präbiotika, welches sich mit der gezielten Anreicherung an gesundheitsfördernden Bakterien im Verdauungstrakt durch spezielle Nahrungsbestandteile beschäftigt, macht sich dieses Kenntnis zu Nutze (Gibson *et al.*, 2017). Die meisten Nahrungsmittel enthalten, neben Kohlenhydraten, Fetten und Proteinen auch Nährstoffe, die nicht der Energiegewinnung dienen. Deren Wirkung auf den

1. Einleitung

Konsumenten und der Funktionen im Körper ist nicht immer konkret bekannt (Domínguez-Avila *et al.*, 2021). Zu diesen Substanzen gehören bioaktive phenolische Verbindungen, welche aus dem Verzehr von pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Obst und Gemüse stammen, aber auch durch den bakteriellen Stoffwechsel im Dickdarm freigesetzt werden (Clifford *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2013). Der aktuelle Kenntnisstand bezüglich des Vorteils dieser bioaktiven phenolischen Verbindungen lässt sich auf zwei Funktionen reduzieren: Die Modulation der Darmmikrobiota durch Stimulation und Inhibition bestimmter Bakterien-Arten sowie der bakteriellen Produktion von bioaktiven Phenol-Derivaten mit gesundheitsfördernden Effekten (Domínguez-Avila *et al.*, 2021).

1.3.1 Polyphenole

Pflanzen produzieren natürlicherweise ein umfangreiches Spektrum an verschiedenen aromatischen Verbindungen, welche unter dem Schirmbegriff der Polyphenole zusammengefasst werden (Quideau *et al.*, 2011). Dabei handelt es sich um sekundäre Phytochemikalien mit einer hohen strukturellen Diversität. Zu diesen Metaboliten gehören beispielsweise Flavonoide, Lignine und Stilbene, die eine Vielzahl von Funktionen in der Pflanzenbiologie übernehmen (Vogt, 2010). Polyphenole vermitteln Stress-induzierte Antworten gegen UV-Belastung sowie pathogene Mikroorganismen (La Camera *et al.*, 2004), dienen aber auch der Erschließung neuer Habitate (Bais *et al.*, 2003) und spielen eine tragende Rolle in der Reproduktion (Dudareva *et al.*, 2004). Der Synthese-Prozess von Polyphenolen wird auch als Phenylpropanoid-Weg bezeichnet und ist geprägt von weitreichenden enzymatischen Modifikationen einiger weniger Ausgangsmoleküle zur Synthese eines äußerst heterogenen Molekülspektrums (Abb. 1) (Vogt, 2010). Initial beginnt dieser Prozess mit der Aminosäure Phenylalanin, die durch das Enzym Phenylalanin-Ammoniak-Lyase (PAL, EC 4.3.1.24) über eine Desaminierung in Zimtsäure umgewandelt wird. Die anschließende Hydroxylierung von Zimtsäure in Anwesenheit von Sauerstoff, NADPH und dem Enzym Cinnamat-4-Hydroxylase (C4H) führt zur Bildung von Cumarsäure. Alternativ kann Cumarsäure auch direkt über die Desaminierung von Tyrosin durch eine Tyrosin-Ammoniak-Lyase (TAL, EC 4.3.1.23) gebildet werden. Abschließend aktiviert die 4-Cumarsäure:CoA-Ligase (4CL) Cumarsäure weiter zu Cumaroyl-CoA, welches als zentrales Intermediat des Phenylpropanoid-Wegs fungiert (Camm & Towers, 1973). Ausgehend von Cumaroyl-CoA wird durch die Kombination verschiedener enzymatischer Modifikationen wie Glykosylierungen, Methylierungen, Acylierungen, Prenylierungen, Oxidationen sowie Reduktionen ein breites Spektrum an phenolischen Verbindungen erzeugt (Vogt, 2010).

1. Einleitung

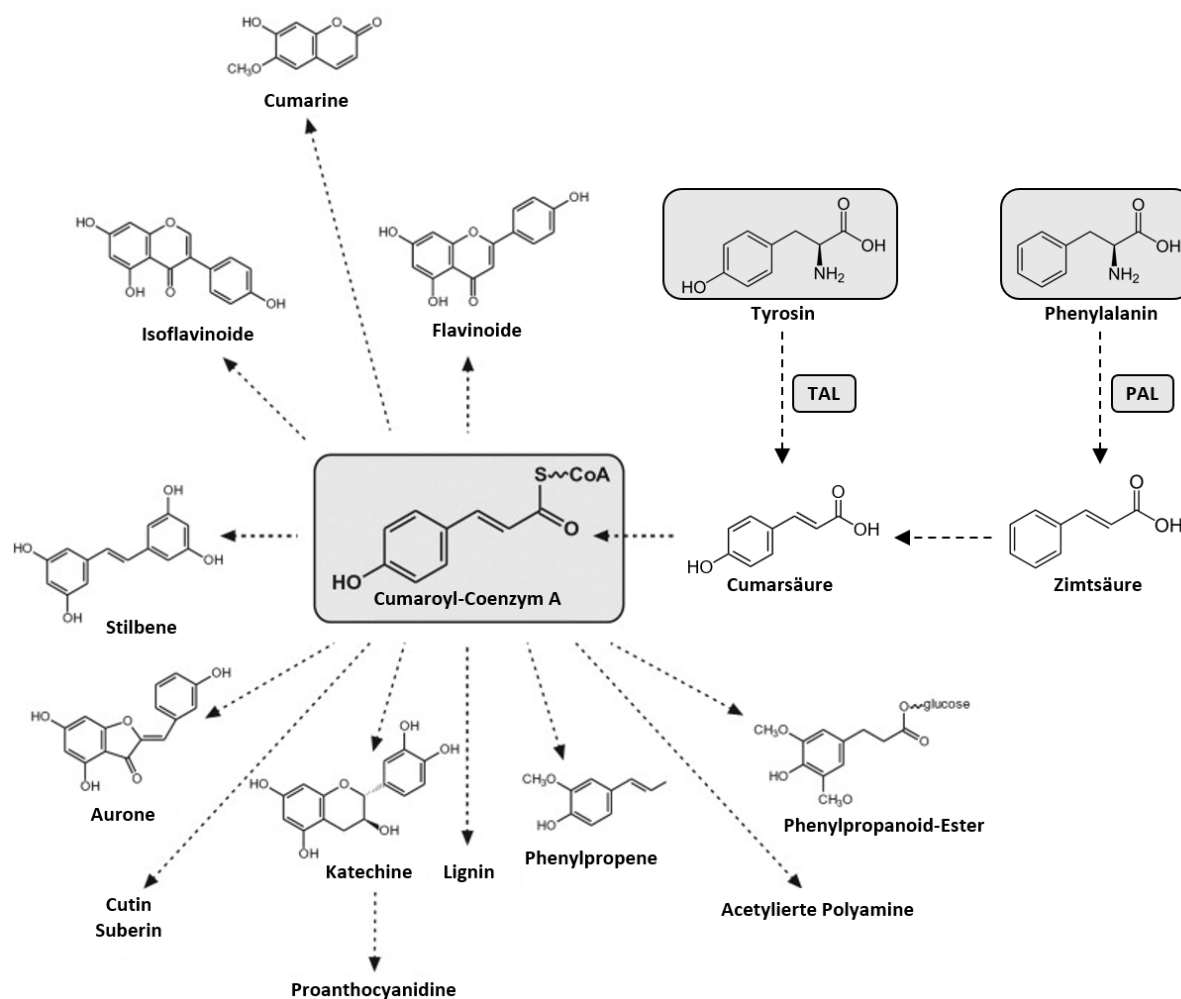


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Molekül-Gruppen für die Synthese von Polyphenolen. TAL: Tyrosin Ammoniak Lyase; PAL: Phenylalanin Ammoniak Lyase (Abbildung modifiziert nach Vogt, 2010).

Zu den häufigsten Polyphenolen, die über die Nahrung aufgenommen werden, zählen Quercetin aus Äpfeln, Resveratrol aus Weintrauben und Tannine aus Tee und Rotwein (Smith *et al.*, 2004; Etxeberria *et al.*, 2015). Aufgrund ihres komplexen Aufbaus werden diese Polyphenole im Dünndarm kaum resorbiert und gelangen daher nahezu unverändert in den Dickdarm, wo diese Verbindungen von der lokalen Mikrobiota in verschiedene bioaktive Phenol-Derivate abgebaut werden können (Scalbert *et al.*, 2002; Parkar *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2014). Der genaue gesundheitsfördernde Mechanismus vieler Polyphenole ist nicht eindeutig aufgeklärt und ist aufgrund der unterschiedlichen Molekül-Strukturen für jede Substanz individuell und komplex. Ein Beispiel dafür ist der vermeintliche präbiotische Effekt, den Polyphenole häufig auf *A. muciniphila* ausüben, obwohl der Organismus selbst keine Fähigkeiten zur Verwertung von Polyphenolen besitzt (Roopchand *et al.*, 2015; Anhe *et al.*, 2015). Trotzdem belegen Studien seit Jahren den positiven Effekt von pflanzlichen Polyphenolen auf die Darmgesundheit des Menschen (Turnbaugh *et al.*, 2006; Tabasco *et al.*, 2011; Roopchand *et al.*, 2015; Moreno-Indias *et al.*, 2016).

1.3.2 Phenolsäuren im Darm

Die Mikrobiota der menschlichen Intestinalflora besitzt die metabolischen Fähigkeiten um die komplexen sekundären Pflanzen-Intermediate wie Flavonoide, Tannine und Anthocyane zu einfachen Phenolsäuren umzusetzen. Beispielsweise wurde bestätigt, dass Organismen der Gattungen *Bacteroides*, *Streptococcus* und *Clostridium* häufige Polyphenole wie Quercetin, Kaempferol und Katechin zu Phenolsäuren abbauen können (Winter *et al.*, 1989; Atkinson *et al.*, 2005; Selma *et al.*, 2009). Zu den am häufigsten im menschlichen Darm nachgewiesenen Phenolsäuren gehören Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure (Sánchez-Patán *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011; Muñoz-González *et al.*, 2013; Gutiérrez-Díaz *et al.*, 2018). Der Literatur zufolge übt Phenyllessigsäure einen protektiven Effekt auf Pankreaszellen aus, wenn diese Cholesterolverstärkten oxidativen Stress ausgesetzt sind (Carrasco-Pozo *et al.*, 2015). Als bestätigte Quelle von Phenyllessigsäure im Darm gilt der Abbau von Quercetin, einem ubiquitären Polyphenol aus Obst und Gemüse, durch Organismen der Gattungen *Agathobacter*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium* und *Lactobacillus* (Zhang *et al.*, 2014; Peng *et al.*, 2014; Carrasco-Pozo *et al.*, 2015). Phenylpropionsäure stammt aus dem Abbau von Ferulasäure aus Reis oder Dill, wirkt entzündungshemmend, antithrombotisch und stabilisiert das Darmepithel (Rechner and Kroner, 2005; Monagas *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2023). Eine weitere diskutierte Quelle von bioaktiven Phenolsäuren ist die Fermentation der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin. Es wurde gezeigt, dass fünf Mitglieder der Gattung *Bacteroides* und noch weitere Vertreter des Phylums Bacteroidota die Fähigkeit besitzen, aromatische Aminosäuren zu Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure zu fermentieren (Russell *et al.*, 2013; Bourgeau & Mayrand, 1983; Kaczmarek & Coykendall 1980).

Allerdings bilden diese Beispiele nur einen winzigen Bruchteil der Komplexität ab, der zwischen dem Konsum von Polyphenolen, der Verfügbarkeit von Proteinen und der Freisetzung von bioaktiven Phenolsäuren im Darm besteht. Dementsprechend groß ist der Aufklärungsbedarf zu den genauen gesundheitsfördernden Mechanismen, die Polyphenole und Phenolsäuren im menschlichen Darm auslösen.

1.3.3 Zimt- und Cumarsäure

Wie bereits erwähnt spielen die beiden zentralen Metabolite Zimt- und Cumarsäure als Ausgangsmoleküle für die Synthese von Phenol-haltigen Molekülen in Pflanzen eine wichtige Rolle, sind aber auch als industrielle Plattformchemikalien von großer Bedeutung (Pei *et al.*, 2016; Fonseca *et al.*, 2019). Diese Verbindungen besitzen antimikrobielle Eigenschaften, werden als Aromastoffe und Vorläufer für die Synthese von Bioplastik eingesetzt und sind für ein breites Anwendungsspektrum in der Gesundheits-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie interessant (Kaneko *et al.*, 2006; Sariaslani, 2007). Mit einem Marktvolumen von 252 Millionen USD/Jahr für Zimtsäure und 134 Millionen USD für

Cumarsäure wird das Interesse an diesen beiden Phenylpropanoiden auch in der Wirtschaft reflektiert (<https://www.digitaljournal.com/pr/news/xherald/trans-cinnamic-acid-market-latest-research-reveals-key-trends-for-business-growth-terra-universal-agilent-technologies-asahi-glass-co-ltd-entegris-inc-hitachi-chemical-co-ltd-> ; <https://www.researchnester.com/reports/p-hydroxycinnamic-acid-market/4355>). Die traditionelle chemische Synthese von Zimt- und Cumarsäure erfolgt durch die Kondensation von Benzaldehyd und Acetaldehyd, und ist durch extreme Reaktionsbedingungen von bis zu 170°C für mehrere Stunden geprägt (Johnson, 1942). Die aktuelle Klimadebatte und das steigende Interesse an nachhaltigen Produktionsprozessen fördern den Umstieg der petrochemisch-basierten Herstellung von Zimt- und Cumarsäure hin zu umweltfreundlichen, biobasierten Produktionswegen. Zimt- und Cumarsäure können zwar aus erneuerbaren Ressourcen wie Pflanzenresten extrahiert werden, jedoch ergeben sich, aufgrund ihrer Bedeutung als Vorläufer-Moleküle für Polyphenole im pflanzlichen Stoffwechsel, nur geringe Konzentration im Pflanzenmaterial. Zusätzlich sind die respektiven Extraktionsmethoden zu aufwändig und komplex und gelten daher im industriellen Kontext als nicht praktikabel (Benkrief *et al.*, 1998). Für eine biotechnologische Produktion von Zimt- und Cumarsäure sind die respektiven Enzyme PAL und TAL von besonderem Interesse. Bisherige mikrobielle Produktionsstämme basieren auf der heterologen Expression von pflanzlichen T/PAL in biotechnologisch relevanten Mikroorganismen wie *E. coli*, *Vibrio (V.) natriegens* oder *Saccharomyces (S.) cerevisiae* und sind vornehmlich durch die Aktivität der respektiv verwendeten T/PAL (Vargas-Tah *et al.*, 2015) limitiert. Die Enzymklassen der T/PAL existieren nicht nur exklusiv in Pflanzen, sondern sind auch in einigen Bakteriengattungen wie *Rhodobacter*, *Flavobacterium* und *Bacteroides* vertreten (Jendresen *et al.*, 2015). Daher richten sich Bemühungen auf die Identifizierung und Optimierung neuer T/PAL Enzyme und der biotechnologischen Erschließung weiterer Mikroorganismen, welche bereits natürlicherweise Zimt- und Cumarsäure produzieren können (Cui *et al.*, 2014).

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Berücksichtigung von Aspekten bezüglich der Nachhaltigkeit und Klimaneutralität lassen sich für die Etablierung industrieller Produktionsprozesse aufgrund des Klimawandels kaum vermeiden und werden besonders in der Zukunft noch mehr an Bedeutung gewinnen. Demnach ist die Möglichkeit, komplexe chemische Synthesen in möglichst wenigen Schritten und unter milden Bedingungen in biotechnologisch entwickelten Mikroorganismen abzubilden und umzusetzen ein attraktiver Ansatz für künftige Innovationen. Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* eignen sich aufgrund ihrer metabolischen Fähigkeiten äußerst gut als potenzielle „Bio-Fabriken“ für die Synthese von Plattformchemikalien, da diese zur Verwertung von nachhaltigen Substraten wie z.B. pflanzlichen Heteropolysacchariden befähigt sind. Für die Optimierung der Synthese gewünschter Chemikalien

1. Einleitung

durch Bakterien sind Werkzeuge für die genetische Modifikation notwendig, um beispielsweise konkurrierende Stoffwechselwege auszuschalten oder den Kohlenstoff-Fluss im zentralen Stoffwechsel gezielt zu kanalisieren. Anhand des Modell-Organismus *P. vulgaris* sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit mithilfe von genetischen Werkzeugen ein System für die markerlose Deletion von Genen in Organismen der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* etabliert werden. Zusätzlich sollten die bestehenden genetischen Systeme genutzt werden, um den Zentralstoffwechsel von *P. vulgaris* zu analysieren und das Potenzial des Organismus als biotechnologischen Produktionsstamm zu evaluieren. Besonders im Hinblick auf die Produktion von Zimtsäure, Cumarsäure und bioaktiven Phenolsäuren sollte in dieser Arbeit der Phenol-Stoffwechsel von *P. vulgaris* aufgeklärt und für die Produktion von Phenylelessigsäure sowie Zimt- und Cumarsäure modifiziert werden. Darüber hinaus sollten die entwickelten genetischen Systeme genutzt werden, um Fluoreszenzmarker für die Anwendung in *P. vulgaris* zu etablieren, welche zuverlässig unter anaeroben Bedingungen funktionieren und für *in vivo* Proteintracking geeignet sind.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und weitere Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland), Fluka (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), VWR (Darmstadt, Deutschland) und Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen und entsprachen mindestens der Qualitätsstufe per Analysis (p. a.).

2.1.2 Gase

Gase wurden im technischen Reinheitsgrad von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Verwendet wurden N₂ (99,9 %) und CO₂ (99,9 %), die zum Teil auch über eine Gasmischanlage in einem Mischungsverhältnis von 80:20 verwendet wurden.

2.1.3 Enzyme

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind in der folgenden Tabelle aufgeführt (Tab. 1)

Tabelle 1: Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
OneTaq-Polymerase	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Q5- High-Fidelity DNA-Polymerase	Kolonie-PCR	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Dnase I	Verdau von DNA	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	Verknüpfung von DNA-Fragmenten	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
<i>Bsa</i> I	Restriktionsverdau	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Glühwürmchen-Extrakt (Luciferase)	ATP-Nachweis	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

2. Material und Methoden

2.1.4 Antibiotika

Zur Gewährleistung der Reinheit von Kulturen und als Selektionsmarker bei Klonierungen wurden die nachfolgend aufgelisteten Antibiotika, sowie deren Konzentrationen und entsprechenden Lösungsmittel verwendet (Tab. 2).

Tabelle 2: Liste der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration (µg/ml)
Carbancillin	50 % Ethanol	100
Erythromycin	100 % Ethanol	100
Gentamycin	rH ₂ O	200
Vancomycin	rH ₂ O	100
Amikacin	rH ₂ O	75

2.1.5 Kits

Kits, welche im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Monarch® PCR & DNA <i>Cleanup</i> Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Plasmid <i>Miniprep</i> Kit	Aufreinigung von Plasmiden	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
NEBuilder® HiFi DNA <i>Assembly</i> Master Mixes	Gezielte Klonierung von Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Total RNA <i>Miniprep</i> Kit	Aufreinigung von RNA	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Luna® Universal qPCR Master Mix	Quantitative Echtzeit-Bestimmung von PCR-Produkten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit	Umschreibung von RNA in cDNA und quantitative Echtzeit-Bestimmung von PCR-Produkten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

2.1.6 DNA- und Protein-Marker

Die Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gelelektrophorese erfolgte durch Einsatz des Markers „1 kb DNA-Ladder“ der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland). In Protein-Gelelektrophoresen wurde der Marker „PageRuler Prestained Protein Ladder“ von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland) verwendet.

2.1.7 Datenbanken und Software

Die nachfolgende Tabelle (Tab. 4) enthält eine Auflistung der Software und Datenbanken, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Programme und Datenbanken

Programm	Verwendungszweck
ClustalΩ	Multisequenz-Alignment
Microsoft Office 2021	Erstellung von Text, Tabellen und Diagrammen
Snapgene 1.1.3	Planung, Visualisierung und Dokumentation von Klonierungen und PCR-Reaktionen, Analyse von DNA-Sequenzen
Primer D'Signer	Generierung von Oligonukleotidprimern zur Generierung spezifischer Restriktions-Schnittstellen
NEBuilder Assembly Tool	Generierung spezifischer Primer für Klonierungen mithilfe des NEBuilder® HiFi DNA <i>Assembly</i> Master Mixes
NEBiolculator	DNA-Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente, welche für die Assemblierung eingesetzt wurden
GraphPad Prism 8.0	Erstellung von Graphen, Analyse und Charakterisierungen von Enzymaktivitäten (Michaelis-Menten-Kinetik)
Uniprot	Informationen zu Genen und Proteinen
KEGG	Informationen zu Genen und Proteinen, Analyse von Stoffwechsel-Prozessen
NCBI BLAST	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen
Primer3	Erstellung von Oligonukleotiden für (RT-)qPCR

2.1.8 Dienstleistungen

Zur Verifizierung der in dieser Arbeit durchgeführten genetischen Modifikationen wurden die DNA-Fragmente von Interesse unter Verwendungen der Q5- High-Fidelity DNA-Polymerase (Tab. 1) mittels PCR amplifiziert, und mithilfe des Monarch® PCR & DNA *Cleanup* Kit (Tab. 3) aufgereinigt. Das präparierte DNA-Material wurde zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) übermittelt. Dafür wurden 5 µl Template DNA mit 5 µl eines geeigneten Sequenzierungs-Primers (10 pmol µl⁻¹) gemischt. Die Auswertung der Sequenzdateien erfolgte mit Snapgene 1.1.3 (Tab. 4)

2.2. Organismen, Primer und Plasmide

2.2.1 Organismen

Alle Organismen, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Organismen

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>P. vulgatus</i> DSM 1447	Wildtyp	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>P. vulgatus</i> Δ bvu1663	Δ bvu1663	Diese Arbeit
<i>P. vulgatus</i> Δ bvu0984 Δ bvu3649	Δ bvu0984, Δ bvu3649	Neff <i>et al.</i> , 2023
<i>E. coli</i> NEB®5-alpha (bezeichnet als <i>E. coli</i>)	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) U169 <i>phoA glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>E. coli</i> NEB®5-alpha λ pir S17-1	<i>TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4: 2-Tc:Mu: Km Tn7</i> λ pir	Strand <i>et al.</i> , 2014
<i>E. coli</i> β 2155	<i>thrB1004 pro thi strA hsdS lacZD</i> M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacI^q traD36 proAB⁺</i>) Δ <i>dapA::erm</i> (Ery ^R) <i>pir::RP4</i> [:: <i>kan</i> (Kan ^R) aus SM10]	DSMZ

2.2.2 Oligonukleotidprimer

Oligonukleotidprimer, die für Klonierungen eingesetzt wurden, wurden entweder manuell, mit Hilfe des Primer D'Signers (IBA GmbH) oder durch das NEBuilder Assembly Tool (New England Biolabs) generiert. Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) wurde mit der Synthese der Primer, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, beauftragt. Die Sequenzen der Primer, die für Klonierungen, Kolonie-PCR, RT-pPCR oder Sequenzierungen eingesetzt wurden, sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Liste aller in dieser Arbeit verwendeten Primer

Primer	Sequenz (5'→3')
pg106_nPldh_bb_fw	AATAGCATGCAAGCTTGG
pg106_nPldh_bb_rev	AATTGTTTTCCATTTATAGTTCATATAAATAAC
pg106_1663_fw	TAAATGGAAAAACAATTATGAAACAAATGTTTCAGCC
pg106_1663_rev	GCCAAGCTTGCATGCTATTTTACAAACCTAACTTATATATTG
pg106_SacB_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAACATCAAAAAGTTTGC
pg106_SacB_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTATTTGTTAACTGTTAATTGTCC
pMM 656 BB fw	TAACAAATAACTATCCATTCAGTTTGATTTTTC
pMM 656 BB rev	GCAAACGTTATTAGTCTTTTCTCATCGGATTG
pMM656 SacB BB fwd	TTGTTTGCCAAGTTTCGAGAGCCTGTCTC
pMM656 SacB BB rev	CTGCCAGACGGGAGGGGAATTCCCATGTC
pMM656 SacB fw	GAGAGCCTGTCTCTCCGCAA
pMM656 SacB rev	ACGGCTAAAAACAATAGGCC
1663Up fw	ATTCCCCTCCCGTCTGGCAGGAAAGAAC
1663Up rev	TATACTTAGTCTTATGTATAAATGTTACTTTTCCACC
1663Do fw	ATACATAAGAACTAAGTATAAAGCCATGAATAGCAATAAAAAATC
1663Do rev	CTCTCGAACTTGGCAAAACAATGCCTGCG

2. Material und Methoden

0984Up fw	TGACATGGGAATTCCTCCGTACCAGACAAACCGAAGAA
0984Up rev	CTGTCCTTATAGTTTGAGCTATCTATGCTTTTGTTATATT
0984Do fw	AATATAACAAAAGCATAGATAGCTCAAACATAAGGACAG
0984Do rev	TATTCATGTAATAAGGCAGAAGTTCGAGAGCCTGTCTCTC
3649Up fw	CTGACATGGGAATTCCTCCGAAGCACACAAAGCCGGCTTA
3649Up rev	ATAGACACCTAAATTGGGAAAATCTTTATTTTGTGGTTA
3649Do fw	AACCACAAAAATAAAGATTTTCCCAATTTAGGTGTCTAT
3649Do rev	GGAGAGACAGGCTCTCGAACTCGTCAATTACTTCTTCTGC
inside_BVU1663_fw	AGGTTTCCGTAACTTTGCC
inside_BVU1663_rev	ATTAGTCATGGCAACGCGG
KO IS Screen Up fw	TGCCACCGCAATATCGTTA
KO IS Screen Down rev	TTGAAGCCGGACGCTTTATC
pmm656 d1663 BB fwd	CTATCCATTCAGTTTGATTTTTC
pmm656 d1663 BB rev	AATTGTTTTCCATTTATAGTTCATATAAAATAAC
BVU3649_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAAAAATATTATGCAGAATCTG
BVU3649_rev	AAATCAAACCTGAATGGATAGTTATATTCTTTCCAAGACTTTTTTC
BVU3649upp_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAAAAATATTATGCAGAATCTG
BVU3649upp_rev	GCAAACGTTATTATATTCTTTCCAAGACTTTTTTC
ldhNP Upp_fw	AAGAATATAATAACGTTTGCAGAATTGTC
ldhNP Upp_rev	AAATCAAACCTGAATGGATAGTTAGAGTTTCTCGCCGAATG
pASK for	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK rev	CGCAGTAGCGGTAAACG
Bacteria 468 fw	ACTCCTACGGGAGGCAG
Bacteria 468 rev	GACTACCAGGGTATCTAATCC
pg106 screening fw	CGATCGGTGCGGGCCTCTTC
pg106 screening rev	AGTTAGCTCACTCATTAGGC
pMM656 Screening fw	ACACTTAACGCTGACATGG
pMM656 Screening rev	CACTGGAAGATAGGCAATTAG
pMM656_updo_fw	GGCTTTTAAAGCTTTTAAGG
pMM656_updo_rev	CATCGGATTCTTTTAATATCGC
pMM656 3649 Screening fw	CTTATGGTATACAAGAGTGG
pMM656 3649 Screening rev	CTGTTACATACTGACTTAT
pMM656 0984 Screening fw	TTGATGGTTTGATAGAAAAA
pMM656 0984 Screening rev	ATACTTTACAGACGATGTAA
pMM656_3649_0984_screening_fw	GAGAGCCTGTCTCTCCGCAA
pMM656_3649_0984_screening_rev	ACGGCTAAAAACAATAGGCC
qPCR_0984 fw	AGCACATCATAAGAAGGATT
qPCR_0984 rev	ATATGCGCTACCCCTTGTTG
qPCR_3649 fw	CAATGAGGTTTGCGATCTGA
qPCR_3649 rev	TGGGATACGGAGTTCTCGTC
pASK3_1663_fw	ATGGTAGGTCTCAAATGAAACAAATGTTTCAGCCGGTAAGG
pASK3_1663_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCAAACCTAATTATATTTGTGAAATTT
AssBVU_2880_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAAATGAACAAAGTTTTTAAG
AssBVU_2880_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTACATTCTTTCGTGGAAAG
qPCR_BVU2880_fw	GAACGTGCCAATAACGGAGT
qPCR_BVU2880_rev	ATGGCAGGCTTTTTCTACGA
pASK3_BVU227374_fw	ATGGTAGGTCTCAAATGATGGCTGAAAAGAAATTATTGTTGGG
pASK3_BVU227374_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTCCAGTTCTTTACCGCATTCATCC
pASK5_BVU_2276_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCATGATTTGGAATAAAAAATAAAGAGTGC
pASK5_BVU_2276_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATTTTAAAAATCCGATTGTCTATCACAC
pg106_2275_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAAGATATTTAGTGAAGAATTAGTG
pg106_2275_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTCAATGATCTTCATGAAAAGC
pASK3_1010_fw	ATGGTAGGTCTCAAATGCGGAAATTATACAAAACCTGATCA
pASK3_1010_rev	ATGGTAGGTCTCAGCGCTTTTTCTTGCAACCTCCCTTTTTTAA
AssBVU_1010_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTTTTCGGAAATTATACAAAAC
AssBVU_1010_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTCAATTTTCTTGCAACCTC
qPCR__BVU1010_fw	AGGACAGCAAGAGATAGCCC
qPCR__BVU1010_rev	GGTCCACTATCGGGTTGTCA

2. Material und Methoden

pG106_UnaG Nterm_fw	AAAAACAATTATGGTGGAAAAGTTCGTTGG
pG106_UnaG Nterm_rev	TTTTATAAGCTTCGGTCGCACGACGATAG
pG106_IFP2.0_Nterm_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGGCTCGGGACCCTCAAC
pG106_IFP2.0_Nterm_rev	TAAAAAGCTATTTTATAAGCGGCTTCTTCCTCTGCACC
pg106_2499_BB_fwd	GCTTATAAAATAGCTTTTACGAC
pg106_2499_BB_rev	AATTGTTTTCCATTATAGTTCATATAAATAAC

2.2.3 Plasmide

Alle Informationen zu den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und generierten Plasmide könnten aus Tabelle 7 entnommen werden.

Tabelle 7: In dieser Arbeit verwendete Vektoren

Plasmid	Eigenschaften	Quelle
pASK IBA 3	Induzierbarer Tet-Promotor, <i>Amp^R</i> , C-terminales Strep-tag	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK IBA 5	Induzierbarer Tet-Promotor, <i>Amp^R</i> , N-terminales Strep-tag	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK 3 BVU 1663	Derivat von pASK3, mit Sequenz des Gens <i>bvu1663</i>	Diese Arbeit
pASK_3_BVU_2273+2274	Derivat von pASK3, mit Sequenz des Gens <i>bvu2273</i> und <i>bvu2274</i>	Diese Arbeit
pASK_5_BVU_2276	Derivat von pASK5, mit Sequenz des Gens <i>bvu2276</i>	Diese Arbeit
pASK 3_BVU_1010	Derivat von pASK3, mit Sequenz des Gens <i>bvu1010</i>	Diese Arbeit
pG106	<i>ErmAM</i> , <i>ErmF</i> , <i>origin of replication</i> für <i>Bacteroides</i> spp.	Jones et al., 2020
pG106_IdhnP	Derivat von pG106, mit 257 bp der 5'-UTR und Sequenz des Gens BVU_2499	Lück & Deppenmeier, 2022
pG106_IdhnP_sacB	Derivat von pG106 mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>sacB</i> aus <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit
pG106_1663	Derivat von pG106 mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>bvu1663</i>	Diese Arbeit
pG106_IdhnP_bvu2880	Derivat von pG106, mit 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und der Sequenz des Gens <i>bvu2880</i>	Diese Arbeit
pG106_IdhnP_2276	Derivat von pG106, mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und der Sequenz des Gens <i>bvu2276</i>	Diese Arbeit
pG106_IdhnP_bvu1010	Derivat von pG106, mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und der Sequenz des Gens <i>bvu1010</i>	Diese Arbeit
pG106_IFP2.0N_2499	Derivat von pG106, mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und der Sequenz des Gens <i>bvu2499</i> in Kombination mit der Sequenz des Fluoreszenz-Tags IFP2.0	Diese Arbeit

2. Material und Methoden

pG106_UnaGN_2499	Derivat von pG106, mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und der Sequenz des Gens <i>bvu2499</i> in Kombination mit der Sequenz des Fluoreszenz-Tags UnaG	Diese Arbeit
pMM656	Rhamnose-induzierbare <i>nanoluc</i> Expression, pNBU2-Rückgrat, <i>Amp^R</i> , <i>Ery^R</i>	Mimee <i>et al.</i> , 2015
pMM656_ <i>ldhnP</i>	Derivat von pMM656, mit 257 bp der 5'-UTR und Sequenz des Gens <i>bvu2499</i>	Lück & Deppenmeier, 2022
pMM656_ <i>ldhnP_sacB</i>	Derivat von pMM656, mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>sacB</i> aus <i>B. subtilis</i>	Diese Arbeit
pMM656_ <i>ldhnP_sacB_Δbvu1663</i>	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens <i>bvu1663</i>	Diese Arbeit
pMM656_ <i>ldhnP_bvu0984_bvu3649_Δbvu1663</i>	Derivat von pMM656 mit <i>bvu0984</i> und <i>bvu3649</i> (Jeweils beide kombiniert mit 257 bp der 5' UTR des Gens <i>bvu2499</i>) sowie 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens <i>bvu1663</i>	Diese Arbeit

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von *E. coli*

Vor der Verwendung von Kulturmedien wurden diese zur Sterilisierung der folgend aufgelisteten Medien, wurden diese vor Verwendung für 20 min bei 121 °C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde, vor dem Autoklavieren, 1,5 % (w/v) Agar zu dem jeweiligen Medium hinzugefügt. Nach ausreichender Abkühlung der Medien wurden, je nach Bedarf, Antibiotika zugesetzt (Kapitel 2.1.5.). Für das Ansetzen der Medien wurde dH₂O verwendet.

Zur Kultivierung von *E. coli* diente LB (Lysogeny-Broth) -Medium. Die Anzucht in Flüssigkulturen wurde unter aeroben Bedingungen bei 37 °C und 180 rpm durchgeführt. Für die aerobe heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* wurde das „Maximal induction“-Medium (MI-Medium; modifiziert nach Mott *et al.*, 1985) verwendet. Dem autoklavierten Basis-Medium wurde in einfacher Endkonzentration M9-Salze hinzugefügt.

Tabelle 8: Kulturmedien für die Anzucht von *E. coli*. *Die Zugabe zum Medium erfolgte nach der Sterilisation

LB-Medium (Lysogeny-Broth)

Substanz	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml
pH 7,1, eingestellt mit NaOH	

MI-Medium (Maximal Induction, Mott *et al.*, 1985)

Substanz	Menge
Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
*M9-Salze	50 ml
H ₂ O _{dest}	ad 950 ml

20x M9-Salze

Substanz	Menge
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	120 g
KH ₂ PO ₄	60 g
NaCl	10 g
NH ₄ Cl	20 g
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

2.3.2 Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen

P. vulgaris wurde unter anaeroben Bedingungen in PY- DMM- oder BHI-Medium (Tab. 9) bei 37 °C ohne Schütteln in 100 ml Serumflaschen kultiviert, wobei das Kultur-Volumen 50 ml betrug. Für die Erstellung des Mediums wurden alle Bestandteile in H₂O_{dest} gelöst und mit KOH auf pH 8 titriert. Als Sauerstoffindikator wurde das Medium außerdem mit Resazurin (1 mg/ml) versetzt. In Anwesenheit von Sauerstoff nimmt der Indikator einen blauen Farbstoff an (Resazurin), welcher unter reduktiven Bedingungen zunächst in pink (Resofurin) umschlägt, und anschließend farblos wird (Dehydroresofurin). Für die Anaerobisierung wurde das Medium zunächst für 10 Minuten mit N₂, und anschließend für 3 Minuten mit N₂/CO₂ (80%/20%, v/v) begast (Durch die Ansäuerung mit CO₂ erreichte das Medium den finalen pH-Wert von 7). Abschließend wurden die Flaschen mit einem Butyl-Gummistopfen und einer Metallkrampe versiegelt. Vor der Inokulation wurden dem Medium nach der Sterilisation eine C-Quelle in gewünschter Endkonzentration, sowie Hämin (0,5 mg/L), Wolin (0,4% v/v) (Wolin *et al.*, 1963) und Vitamin K1 (1 µl/L) zugesetzt. Zur Herstellung von Agarplatten wurde, vor dem Autoklavieren, 1,5 % (w/v) Agar zu dem jeweiligen Medium hinzugefügt. Zur Anaerobisierung wurden das mit Agar versetzte Medium, analog zu dem Flüssigmedium, in serum-Flaschen begast, oder die Platten wurden unter anaeroben Bedingungen unter der Sterilbank gegossen und über Nacht in der anaeroben-Kammer gelagert.

2. Material und Methoden

Tabelle 9: Kulturmedien für die Anzucht von *P. vulgatus*. *Komponenten wurden Sterilfiltriert, die Zugabe zum Medium erfolgte nach der Sterilisation

PY-Medium (Modifiziert nach DSMZ Nr. 104)

Substanz	Menge
Pepton aus Soja	5 g
Trypton aus Casein	5 g
Hefeextrakt	10 g
Fleischextrakt	5 g
* Glukose	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Tween 80	1 ml
Resazurin	1 mg
Salzlösung	40 ml
* L-Cystein	0,5 g
* Hämin-Lösung	1 ml
* Vitamin K1-Lösung	0,2 ml
KOH	Titrieren auf pH 8
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

DMM-Medium

Substanz	Menge
NaHCO ₃	4 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
K ₂ HPO ₄	2,2 g
NaCl	0,9 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,75 g
FeSO ₄ -Lsg.	1 ml
SL-6	2 ml
*L-Cystein	0,5 g
*Hämin-Lösung	10 ml
*Vitamin K1-Lösung	0,2 ml
*Butyrat	0,04 M
*10x Wolin	0,1x
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

BHI-Medium

Substanz	Menge
Hirn-Herz-Infus von Frischgewebe	8 g
Peptisch verdautes Tiergewebe	5 g
Pankreatisch verdautes Casein	16 g
NaCl	5 g
* Glucose	2 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml pH 8

2. Material und Methoden

Tabelle 10: Zusätze für die Erstellung von den in Tabelle 9 aufgeführten Medien

SL6-Lösung

Substanz	Menge
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ x 4H ₂ O	30 mg
H ₃ BO ₃	0,3 g
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,2 g
CuCl ₂ x 2H ₂ O	10 mg
NiCl ₂ x 6H ₂ O	20 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	30 mg
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Salzlösung

Substanz	Menge
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,25 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaHCO ₃	10 g
NaCl	2 g
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml

10 x Wolin (Wolin *et al.*, 1963)

Substanz	Menge
Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Thiamin x HCl	50 mg
Na-Riboflavin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B12	1 mg

Hämin-Lösung

Substanz	Menge
Hämin	50 mg
1 M NaOH	1 ml
H ₂ O _{dest}	Ad 100 ml

Vitamin K1-Lösung

Substanz	Menge
Vitamin K1	0,1 ml
96 % Ethanol	Ad 20 ml

FeSO₄-Lösung

Substanz	Menge
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,278 g
HCl (konzentriert)	2 Tropfen
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

2.3.3 Stammerhaltung der verwendeten Mikroorganismen

Für Lagerungszwecke wurden die verwendeten Mikroorganismen bei -70 °C kryokonserviert. Zu diesem Zweck wurden *E. coli* Stämme über Nacht in LB-Medium kultiviert, und am Folgetag wurden 800 µl der Kultur mit 200 µl sterilem Glycerol (100%) in 1,5 ml Kryogefäßen versetzt. Für die Reaktivierung der Kulturen wurden die Kryogefäße unter der Sterilbank in einem Eis-Block leicht angetaut, und mit einer sterilen Impföse wurde etwas Material für die Inokulation eines Kulturmediums entnommen. Für die Lagerung von Organismen, welche auf anaerobe Bedingungen angewiesen waren, wurden 2 ml der jeweiligen Kultur mit 2 ml anaerober Saccharose-Lösung (50% w/v) vermischt und kryokonserviert. Für die Erstellung der Saccharose-Lösung wurde diese in 20 ml Serumflaschen für 3 Minuten mit N₂ begast, mit Butyl-Stopfen verschlossen und anschließend sterilisiert. Um Kryokulturen zu reaktivieren wurden diese auf Eis und unter steriler N₂-Begasung solange angetaut, bis einige Tropfen der Kryokultur für eine Inokulation entnommen werden konnten.

2.3.4 Messung der optischen Dichte

Um das Wachstum bakterieller Zellsuspensionen zu quantifizieren, wurde die optischen Dichte der Kulturen bei 600 nm (OD₆₀₀) photometrisch ermittelt. Da anaerobisierte Kulturmedien Resazurin als Redoxindikator enthielten und sich daher bei Sauerstoffkontakt verfärbten, wurde den Proben mit einer Pipettenspitze ein wenig Natriumdithionit zugegeben. Dabei handelt es sich um ein starkes Reduktionsmittel und verhindert daher den Farbumschlag des Redoxindikators. Um den Effekt der Mehrfachsteuung zu verhindern, wurden die Proben ab einer OD₆₀₀ von 0,3 mit Medium verdünnt. Für die Bestimmung des Leerwerts wurde, abhängig vom Typ des Kulturmediums welches gemessen wurde, frisches Medium verwendet. Die kontinuierliche Analyse des Wachstumsverhaltens von Mikroorganismen wurden in einem Plattenlesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz). In 48-Well Platten wurden die Organismen in 700 µl Medium bei 37 °C kultiviert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte alle 20 Minuten bei 600 nm, und vor jedem Messpunkt wurde die Platte für 2 Minuten bei 250 rpm geschüttelt. Die erhaltenen Werte dienten direkt zur Erstellung einer Wachstumskurve. Für die

2. Material und Methoden

Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen wurde das Plattenlesegerät in der anaeroben-Kammer platziert.

2.3.5 Bestimmung von Wachstumsparametern

Die Bestimmung der Wachstumsrate μ und Verdopplungszeit td einer Bakterienkultur erfolgte anhand der logarithmischen Auftragung der durch das Plattenlesegerät erhaltenen Wachstumskurve gegen die Zeit. Durch diese Auftragung ließ sich die exponentielle Phase des Wachstums als ein linearer Verlauf darstellen, anhand dessen Steigung die Wachstumsrate berechnet werden konnte, wobei t und t_0 zwei Zeitpunkten innerhalb des exponentiellen Wachstumsverlaufs und N_t und N_0 den zugehörigen OD₆₀₀-Werten entsprechen:

$$\text{Wachstumsrate } \mu = \frac{\ln \left(\frac{N_t}{N_0} \right)}{(t - t_0)}$$

Die Wachstumsrate μ wurde anschließend zur Berechnung der Verdopplungszeit verwendet.

$$\text{Verdopplungszeit } td = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

2.3.6 Anreicherung und Isolierung von anaeroben Mikroorganismen

Die Anreicherung von anaeroben Mikroorganismen erfolgte aus dem Schlamm einer Biogas-Anlage sowie aus humanen Stuhlproben. Zu diesem Zweck wurden 50 ml Carbonat-Puffer (50 mM NaHCO₃, pH 7) zur Anaerobisierung 10 Minuten mit N₂ begast, mit Butyl-Stopfen verschlossen und autoklaviert. Vor der Verwendung wird dem Puffer Dithiothreitol (Anaerob, Endkonzentration 5 mM) zugefügt. Die Probennahme erfolgte durch kurzzeitiges Öffnen der Serumflasche, um Probenmaterial mit dem Puffer zu vermischen. Sofort nach der Material-Zugabe wurde die Flasche wieder versiegelt. In einer Anaeroben-Kammer wurden die Flaschen geöffnet, und 100 µl der Probensuspension wurde in einer Verdünnungsreihe (Bis 10⁻⁴) auf Agar-Platten ausgestrichen. Als Medien wurden PY1/10- (Die Menge der Komplexbestandteile des PY-Mediums wurden für dieses Medium auf 10% reduziert), DMM- und Bile-Agar verwendet. Bei Bile-Agar handelte es sich um PY-Agar mit Äskulin (1g/L), Gallensalzen (5g/L) und Ammonium Eisen (III)-Citrat (0,5g/L). Während die Gallensalze als selektive Komponente dienten, so wird Äskulin als Charakterisierung für *Enterococcus* Spezies verwendet. Diese Gattung ist in der Lage Äskulin zu hydrolysieren, wobei die Abbauprodukte mit Eisen (III)-Citrat zu schwarzen Salzablagerungen reagieren. Da die Gattung *Bacteroides* ebenfalls in der Lage ist, Äskulin zu hydrolysieren, wurde dieser Agar für die erleichterte Identifizierung eingesetzt. Nach der Sterilisierung des Mediums wurden bei Bedarf ein Antibiotikum, sowie Cellulose, Pektin, Xylan, Inulin oder Levan als Kohlenstoff- und Energiequelle zugefügt. Die inokulierten Agar-Platten wurden für 24-48h bei 37 °C inkubiert. Zur Identifizierung der Mikroorganismen, welche für eventuell gebildete Kolonien

verantwortlich waren, wurden diese mit den Primern Bacteria_468 fw/rev gescreent, und das Amplifikat wurde sequenziert. Durch anschließende Blast-Analysen wurden die Mikroorganismen bis auf die Art-Ebene identifiziert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von genomischer DNA

Für die Aufreinigung der genomischen DNA aus *P. vulgatus* DSM 1477 und *B. subtilis* DSM 10 wurde das Monarch® Genomic DNA Purification Kit von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) gemäß der Herstellerangaben verwendet. Für die Präparation der Genom-DNA wurden 2 ml Kulturvolumen eingesetzt.

2.4.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte durch das Monarch® Plasmid Miniprep Kit von New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) unter Verwendung von 2 ml Kulturvolumen einer entsprechenden Übernachtskultur von *P. vulgatus* oder *E. coli*.

2.4.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die Aufreinigung der während der PCR generierten Amplifikate erfolgte durch das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) nach Angaben des Herstellers.

2.4.4 Isolierung von RNA

Die Isolierung der Gesamt-RNA von *P. vulgatus* erfolgte unter Verwendung des Monarch® Total RNA Miniprep Kit. Vor der Verwendung des Kits wurde gemäß der Herstellerangaben 2 ml Kulturmaterial zunächst für 5 min mit Lysozym (1 mg/ml) bei 25 °C inkubiert. Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen wurde im Anschluss an die Aufreinigung ein Verdau mit DNaseI (Thermo Scientific™, Schwerte, Deutschland) durchgeführt. Für die Feststellung von DNA-Kontaminationen wurden 200 ng der aufgereinigten Nukleinsäuren für eine PCR mit anschließender Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Sofern unter Verwendung der Primer, welche ebenfalls für die RT-qPCR vorgesehen wurden, kein Amplifikationsprodukt detektierbar war, so konnten DNA-Kontaminationen ausgeschlossen werden. Andernfalls wurde der Verdau mit DNase I wiederholt.

2.4.5 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

Für die photometrische Quantifizierung von DNA wurde das Eppendorf BioPhotometer® D30 in Kombination mit der dafür vorgesehenen Eppendorf µCuvette® G1.0 genutzt. Dafür wurden 4 µl der zu messenden DNA-Präparation auf die Küvette gegeben und die Absorption der Lösung bei 260 nm (A₂₆₀) gemessen. Zur Messung eines Leerwerts wurde eine analoge Messung unter Verwendung von H₂O durchgeführt. Das verwendete Photometer ermöglichte eine Reinheits-Bestimmung der

gemessenen Lösung, indem der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm ermittelt wurde, da bei 280 nm auch spezifisch Proteine detektiert werden kann.

2.4.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels Polymerasekettenreaktion kann eine in-vitro-Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente erzielt werden (Mullis & Faloona 1987). Als Template für diesen Vorgang kann sowohl Plasmid-DNA als auch genomische DNA verwendet werden. Für die selektive Amplifizierung eines spezifischen Genbereichs bedient man sich zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer, die den zu vervielfältigenden Abschnitt flankieren und nach Ablauf einer Hitzedenaturierung mit komplementären Bereichen der einzelsträngigen DNA hybridisieren. Ausgehend von den freien 3'-OH-Enden dieser Primer erfolgt anschließend die Komplementierung der Einzelstrang-DNA, ein Vorgang, der von DNA-Polymerasen durchgeführt wird. Durch die zyklische Wiederholung dieses Prozesses kann eine exponentielle Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente erzielt werden. Grundlage für den zyklischen Ablauf ist die Verwendung thermostabiler DNA-Polymerasen im verwendeten PCR-Ansatz (Saiki *et al.* 1988). Diese überstehen unbeschadet hohe Temperaturen, die zur Denaturierung der DNA nötig sind, und müssen so dem Ansatz nicht erneut beigeführt werden. Bei der Polymerasekettenreaktion hat die Schmelztemperatur (T_M) der verwendeten Oligonukleotid-Primer eine hohe Bedeutung für einen erfolgreichen Ablauf und die Spezifität der Amplifizierung. Für die in dieser Arbeit für routinemäßige Screenings verwendete OneTaq®-Polymerase, empfiehlt der Hersteller eine Annealingtemperatur (T_A), die etwa 2 – 5 °C unter der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen liegt. Primäres Anwendungsgebiet der OneTaq Polymerase war die Kolonie-PCR, bei der im Anschluss an die Transformation von klonierten Plasmiden positive Transformaten identifiziert wurden. Für die Kolonie-PCR wurde Zellmaterial von auf Selektivplatten gewachsenen Einzelkolonien steril in 5 µl fassende H₂O_r-Aliquots und dazugehörige 100 µl LB-Backups überführt.

Tabelle 10: Zusammensetzung eines OneTaq PCR-Reaktionsansatzes.

Komponente	Menge [µl]
OneTaq Quick-Load 2X Master Mix mit Standard Puffer	12,5
10 µM Vorwärtsprimer	0,5
10 µM Rückwärtsprimer	0,5
Template DNA	5
H ₂ O _r	ad 25

Die mit Zellmaterial versetzten H₂O_r-Aliquots wurden mit den in Tabelle 10 aufgeführten Reaktions-Komponenten komplementiert und dem nachfolgend in Tabelle 11 beschriebenen PCR-Programm unterzogen. Bei erfolgreicher Amplifizierung eines ausgewählten Gen-Bereichs wurden die Backups in LB-Medium für die Inokulation von Übernachtskulturen eingesetzt.

2. Material und Methoden

Tabelle 11: PCR-Programm für OneTaq-basierte PCR-Reaktionen

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Initiale Denaturierung	94	60
Denaturierung	94	20
Annealing	T _A	30
Elongation	68	60/kb
		30x
Finale Elongation	68	120
Standby	12	-

Die Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase von New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland) zeichnet sich durch eine extrem hohe Genauigkeit und Syntheserate aus. Durch die Fusionierung mit einer Sso7d-Domäne, die sich positiv auf die Prozessivität der Polymerase auswirkt, eignet sich die Q5-Polymerase besonders für Klonierungen. Die Zusammensetzung eines entsprechenden Reaktionsansatzes ist in Tabelle 12 abgebildet.

Tabelle 12: Zusammensetzung eines Q5 PCR-Reaktionsansatzes.

Komponente	Menge [µl]
5X Q5 Reaction Buffer	10
10 mM dNTP's	1
10 µM Vorwärtsprimer	2,5
10 µM Rückwärtsprimer	2,5
Template DNA	1
Q5 High Fidelity DNA Polymerase	0,25
H ₂ O _r	ad 50

Nach Angaben des Herstellers wird bei Verwendung der Q5 Polymerase eine Annealing-Temperatur empfohlen, die 3 °C über der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen liegt. In dieser Arbeit wurden die Annealing- Temperaturen (T_A) der durchgeführten PCR-Ansätze in-silico mit Hilfe der Software SnapGene ermittelt und in das in Tabelle 13 dargestellte PCR-Programm integriert.

Tabelle 13: PCR-Programm für Q5-basierte PCR-Reaktionen

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Initiale Denaturierung	94	60
Denaturierung	94	20
Annealing	T _A	30
Elongation	68	60/kb
		30x
Finale Elongation	68	120
Standby	12	-

2.4.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die Visualisierung und Analyse von PCR-Amplifikaten erfolgte durch die Methode der Agarose-Gelelektrophorese. Diese ermöglicht durch einen Vergleich mit definierten Nukleinsäure-Standards die Größenbestimmung von linearer, doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Grundlage für diesen Vergleich ist die Auftrennung von DNA in einem engmaschigen Agarose-Polymer-Gel. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern negativ geladene DNA-Moleküle in Richtung der positiv geladenen Anode. Die Geschwindigkeit dieser Bewegungen verhält sich dabei umgekehrt proportional zur Größe des aufzutrennenden Fragmentes. Neben der Größe der DNA-Moleküle wird das Laufverhalten zusätzlich von der Porengröße des verwendeten Agarosegels beeinflusst. Für die Verwendung des horizontalen Gelelektrophorese-Systems „Horizon® 58“ der Firma Whatman Inc. (Little Chalfont, Großbritannien) wurde Agarose in NEEO Ultra-Qualität 1 %-ig [w/v] in 30 ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Essigsäure, 10 mM EDTA, pH 8,5) aufgekocht. Vor dem Gießen der Gele erfolgte die Zugabe von 1 µl ROTI® GelStain Red (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland). Dieser Farbstoff interkaliert mit der DNA und zeigt unter UV-Bestrahlung eine Fluoreszenz, welche somit die Detektion amplifizierter Nukleinsäuren ermöglicht. Amplifikate, die mit Hilfe des OneTaq Master Mix erzeugt wurden, konnten durch den enthaltenen Ladepuffers direkt für die Gelelektrophorese eingesetzt werden. Die im Zuge von Klonierungen durch die Q5-Polymerase erzeugten DNA-Fragmente wurden vor der elektrophoretischen Auftrennung mit dem 6X Ladepuffer Purple (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für eine Stunde. Als Größenstandard dienten die Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland).

2.4.8 Quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (RT-qPCR)

Die quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) ist eine Methode, mit der man die relative Menge von mRNA eines Zielgens mit der eines konstitutiv exprimierten Referenzgens vergleichen, und somit quantifizieren kann. Über diese Quantifizierung lassen sich Aussagen über die Bedeutung des untersuchten Gens treffen, da häufig die Transkriptionsmenge im Zusammenhang mit der Relevanz eines Genes steht. Hierfür wird zunächst isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, wonach eine PCR mit Gen-spezifischen Primern durchgeführt wird, die einen ca. 200 bp großen Teil der cDNA amplifiziert. Um die Amplifikation sichtbar zu machen, enthalten die Ansätze einen Farbstoff, wie bspw. SYBR Green, welcher an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet und dann fluoresziert. Das messbare Fluoreszenzsignal korreliert damit direkt mit der Menge an enthaltener dsDNA, die in einer PCR mit jedem Zyklus exponentiell zunimmt. Übersteigt die Fluoreszenz in einem Zyklus einen bestimmten Schwellenwert (Threshold), entspricht dieser Zeitpunkt dem Ct-Wert, welcher am Anfang der linearen Phase der exponentiellen Amplifikationskurve angesiedelt ist. Je geringer der Ct-Wert, desto mehr mRNA eines Gens befand sich vor der reversen

2. Material und Methoden

Transkription in der Probe, während ein höherer Ct-Wert mit geringen Transkriptmengen gleichzusetzen ist. Rückwirkend lässt sich so die relative Ausgangsmenge an cDNA berechnen, da der Zeitpunkt des Ct-Wertes mit der Ausgangsmenge an RNA im Zusammenhang steht. In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-qPCR genutzt, um die Menge an mRNA-Transkripten von in *P. vulgatus* überexprimierten Genen zu bestimmen. Die experimentelle Durchführung erfolgte in einem CFX Connect™ RT-PCR-Cycler von BioRad (München, Deutschland) und dem in Tabelle 14 aufgeführten PCR-Programm.

Tabelle 14: RT-qPCR-Programm

PCR-Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [sec]
Reverse Transkription	55	600
Initiale Denaturierung	95	60
Denaturierung	95	10
Hybridisierung & Elongation	60	30
		30x
Schmelzkurve	35-95	Jeweils 5

Am Ende des Programms wurde optional eine Schmelzkurve der Amplifikate erstellt, wobei schrittweise die Temperatur erhöht und die Fluoreszenz der Ansätze gemessen wurde. Hierdurch konnte die Spezifität der Primer bzw. der Amplifikation bewertet werden, da distinkte PCR-Produkte einen charakteristischen Schmelzkurvenverlauf zeigen. Die Ct-Werte wurden durch die Software des Thermo-Cyclers automatisch ermittelt. Um hieraus die relative Transkriptabundanz eines Gens von Interesse zu bestimmen, wurden der Ct-Wert mit dem Ct-Wert des Referenzgens des ribosomalen Proteins L21, das unter wachsenden Bedingungen konstitutiv exprimiert wird, verrechnet (Gleichung 1 und 2).

Gleichung 1: $\Delta Ct = Ct - Ct_{\text{Referenzgen}}$

Gleichung 2: $\Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$

ΔCt stellt dabei die Differenz zum Ct-Wert des Referenzgens dar, während $\Delta\Delta Ct$ das relative Verhältnis zur Transkriptmenge des Referenzgens angibt. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Reverse Transkriptase mit Primern für das Referenzgen.

2.4.9 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Für die gezielte Klonierung von DNA-Fragmenten (Insert) in ein Plasmid erfolgte ein Restriktionsverdau mit Hilfe von Endonukleasen (Restriktionsenzym), die Phosphodiesterbindungen eines DNA-Doppelstranges an einer spezifischen, palindromischen Erkennungssequenz spalteten. In Abhängigkeit des verwendeten Restriktionsenzyms entstehen entweder DNA-Fragmente mit glatten Enden oder kohäsive Enden mit

2. Material und Methoden

Nukleotid-Überhängen. Der Verdau von Vektor und Insert Einsatz mit dem gleichen Restriktionsenzym lässt anschließend die Hybridisierung der verdauten Enden der linearen Fragmente zu. Um eine unerwünschte Religation des Vektorrückgrats zu vermeiden, wurde den Vektor-Restriktionsansätzen 10 Minuten vor Ablauf der Inkubation 1 µl der Quick CIP (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) zugesetzt. Diese ermöglicht eine rapide Dephosphorylierung der 5'-Enden, wodurch die dephosphorylierten Vektor-Fragmente nur mit den gewünschten Insert-Fragmenten ligieren können. Zum Abstoppen der enzymatischen Reaktion und zur Aufreinigung der verdauten DNA-Fragmente wurden die Restriktionsansätze nach Abschluss der Inkubation mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) aufbereitet.

Für die Klonierung von Inserts in pASK-3/-5 Vektoren wurde das Restriktionsenzym Bsal verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt 15 µl Vektor oder 20 µl PCR-Amplifikat, 2,5 µl 10x CutSmart® Puffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) und 1 µl Bsal, und wurde mit H₂O_{dest} auf 25 µl aufgefüllt. Der Restriktionsverdau wurde für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine Aufreinigung mithilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) abgestoppt, und die verdauten Fragmente konnten anschließend für die Ligation verwendet werden.

2.4.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Nach einem Restriktionsverdau muss die Verknüpfung des inserierenden DNA-Fragment in den korrespondierenden Vektor vermittelt werden. Die Verknüpfung der komplementären Enden des Inserts und des Vektors wird dabei durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert, welche unter ATP-Verbrauch die freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektorrückgrats mit den 5'-Phosphatenden des verdauten DNA-Inserts ligiert. In dieser Arbeit wurde für die Ligation von „sticky-end“-Fragmenten der „Instant Sticky-end Ligase Master Mix“ von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Der in Tabelle 15 dargestellte Reaktionsansatz benötigt keine Inkubationszeit und kann nach dem Durchmischen der Komponenten direkt für die Transformation eingesetzt werden. Grundvoraussetzung ist jedoch das Vorhandensein von Sticky Ends bei den für die Ligation eingesetzten DNA-Fragmenten.

Tabelle 15: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes unter Verwendung des Instant Sticky-end Ligase Master Mix.

Komponente	Menge
Insert DNA (verdaut und aufgereinigt)	2 µl
Vektor DNA (verdaut und aufgereinigt)	0,5 µl
Instant Sticky-end Ligase Master Mix	2,5 µl

Im Anschluss an die Ligation wurde Material des Ligations-Ansatzes für eine Hitzeschock-Transformation nach Angaben des Herstellers mit *E. coli* DH5α durchgeführt.

2.4.11 Klonierung mittels NEBuilder HiFi DNA Assembly

Diverse Klonierungsstrategien, wie die in den Kapiteln 2.4.9 und 2.4.10 beschriebene Ligationsabhängige Klonierung, konnten sich in der Molekularbiologie für die Konstruktion von Plasmiden etablieren. Eine äußerst flexiblere und zeitsparendere Methodik ist in diesem Zusammenhang das „Seamless Cloning“, auch „Gene Assembly“ genannt, auf der das NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit basiert. Unabhängig von der Fragment-Länge, Inserierungsstelle und der Endkompatibilität wird hierbei die Fusionierung multipler DNA-Fragmente zu einem zirkulären Plasmid vollzogen. In dieser Arbeit wurde dieses Kit verwendet, um Plasmide basierend auf pMM656 und pG106 zu konstruieren, welche sowohl für die Überproduktion von Genen, als auch für die Deletion von Genen in *P. vulgatus* dienen.

Zu Beginn erfolgte die Amplifizierung des Vektorrückgrats und der entsprechend zu klonierenden Genom-Sequenz(en), welche über das Primer-Design komplementäre Überhänge zum Vektor-Rückgrat erhielten. Über diese wurde die Verknüpfung in der richtigen Orientierung bei der Assemblierung gewährleistet. Die dafür verwendeten Primer wurden mit Hilfe des NEBuilder® Assembly Tools erstellt (Tab. 4). Die linearisierten Fragmente wurde dann durch den in Tabelle 16 gezeigten Reaktionsansatz zu einem Plasmid verknüpft.

Tabelle 16: Zusammensetzung einer Assemblierungsreaktion unter Verwendung des NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mixes. Empfohlen wurde eine Vektor-Insert Verhältnis von 1:2.

Komponente	Menge
DNA-Fragment	x µl (0,03 - 0,2 pmol)
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µl
rH ₂ O	Ad 20 µl

Nach einer Aufreinigung der Amplifikate durch das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 3) wurde deren Konzentration mit einem Nanodrop-Photometer (Kapitel 2.4.5) bestimmt. Die Assemblierung der DNA-Fragmente erfolgte nach Angaben des Herstellers für 15 Minuten bei 50 °C. Basierte das Assembly auf der Konstruktion eines Vektors auf Basis von pMM656, so wurde das resultierende Plasmid für eine Hitzeschocktransformation in *E. coli* NEB DH5α eingesetzt. Im Falle der Klonierung von pG106-Derivaten erfolgte die anschließende Transformation mit *E. coli* NEB DH10β, da sich dieser Stamm besser für die Handhabung von Plasmiden mit einer Größe von >10 kb eignet.

2.4.12 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*-Stämme

Die Übertragung von pASK- und pG106 Plasmid-Derivaten erfolgte durch einen Hitzeschock in kompetente *E. coli* NEB® 5α/10β Zellen nach Herstellerangaben. Durch diverse Modifikationen, wie beispielsweise den Knockout der *endA1*- und *recA1*-Nukleasen, wurde der Genotyp dieser Zellen für eine hohe Plasmid-Stabilität optimiert. Für die Transformation wurden 50 µ kompetenter Zellen auf

2. Material und Methoden

Eis aufgetaut und mit 2 µl der in Kapitel 2.4.10. und 2.4.11 dieser Arbeit beschriebenen Reaktionsansätzen versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgte für 30 Sekunden ein Hitzeschock bei 42 °C. Im Anschluss wurden die geschockten Zellen erneut für fünf Minuten auf Eis gelagert, mit 950 µl SOC-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37 °C regeneriert. Zur Selektion positiver Transformanten wurden 100 µl der regenerierten Zellen auf LB-Selektivplatten mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eventuell entstandene Kolonien wurden einem Screening mittels Kolonie-PCR unterzogen, um den Erfolg der genetischen Modifikation zu überprüfen.

Die Übertragung von pMM656 Plasmid-Derivaten in die *E. coli* Stämme NEB®5-alpha λpir S17-1 und β2155 erfolgte über eine Elektroporation. Zu diesem Zweck wurden die Stämme zunächst über Nacht in 5 ml LB-medium kultiviert, und am Folgetag wurden 4 ml Kultur bei 8000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Um verbliebene Medien-Bestandteile zu entfernen erhaltene Zell-Pellet wurde in 1 ml eiskaltem HEPES (1mM, pH 7) zu Waschzwecken resuspendiert und für 1 Minute bei 12.000 rpm zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde dann ein weiteres Mal wiederholt. Es folgte eine Resuspendierung des resultierenden Zell-Pellets in eiskaltem Glycerin (10% v/v) und einer weiteren Zentrifugation bei 12.000 rpm für 1 Minute. Das gewaschene Zell-Pellet wurde final in 50 µl Glycerin (Eiskalt, 10%) aufgenommen und mit 2 µl DNA-Material (s. Kapitel 2.4.10 und 2.4.11) vermischt. Für die anschließende Elektroporation wurde das Zell-DNA-Gemisch luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt und im MicroPulsers (BioRad, München, Deutschland)) platziert. Der Elektropuls erfolgte für 4-5 ms bei einer Pulskontrolle von 200 Ω und einer Spannung von 2,2 kV. Zwecks Regeneration wurden die elektroporierten Zellen mit 1 ml SOC-Medium versetzt, in ein 2-ml Reaktionsgefäß überführt und für mindestens 3 Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Abschließend wurden 100 µl der Regenerationskultur auf LB-Selektivplatten mit einem geeigneten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Eventuell entstandene Kolonien wurden einem Screening mittels Kolonie-PCR unterzogen, um den Erfolg der genetischen Modifikation zu überprüfen.

2.4.13 Transformation von Plasmid-DNA in *P. vulgatus*

Die Übertragung von Plasmid-DNA in *P. vulgatus* erfolge mittels Elektroporation oder durch biparentale Konjugation.

Für die Übertragung von Plasmid-DNA (Primär pG106-Derivate) mittels Elektroporation wurde zunächst eine 50 ml Kultur von *P. vulgatus* über Nacht in BHI-Medium kultiviert. Alle folgenden Schritte wurden unter Kühlung der Proben auf Eis und unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die gesamte Kultur wurde in einen anaeroben Zentrifugenbecher überführt und mit einer Gummi-

2. Material und Methoden

Dichtung zwischen dem Schraubverschluss und der Gefäßöffnung verschlossen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 Minuten bei 4 °C und 8.000 rpm. Das entstandene Zell-Pellet wurde zweimal in 5 ml sterilem, anaeroben EP-Puffer (10 % Glycerol + 1 mM MgCl₂) zu Waschzwecken resuspendiert, und für 4 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 µl EP-Puffer resuspendiert, und 50 µl dieser Zellsuspension wurden mit 5 µl des zu transformierenden Plasmids versetzt. Die Suspension aus vorbereiteten Zellen und Plasmid wurde vorsichtig und luftblasenfrei in gekühlte Elektroporationsküvetten mit einer Elektrodendistanz von 1 mm (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) überführt und fest mit einem Gummistopfen verschlossen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit Hilfe eines MicroPulsers (BioRad, München, Deutschland) einem elektrischen Impuls von 2,5 kV für 6 ms ausgesetzt. Unmittelbar nach der Elektroporation wurden schnellstmöglich 500 µl vorgewärmtes BHI-Medium über eine Kanüle durch den Gummi-Stopfen in die EP-Küvette gegeben und in Serumflaschen mit 2 ml BHI-Medium überführt. Es erfolgte eine Regeneration über Nacht bei 37 °C. Anschließend wurden 50 µl der Regenerationskultur auf BHI-Agarplatten mit 100 µg/ml Erythromycin und 200 µg/ml Gentamycin ausplattiert und 48-72 h bei 37 °C anaerob kultiviert.

Für die Übertragung von Plasmid-DNA durch Konjugation wurden als Donorstamm *E. coli* S17-1 DH5α λpir oder *E. coli* β2155 eingesetzt und wurde primär für den Transfer von pMM656-Derivaten durchgeführt. Beide *E. coli*-Stämme besitzen eine genomisch integrierte Konjugationsmaschinerie des Plasmids RP4, sodass eine biparentale Konjugation (ohne Helferstamm) ermöglicht wird. *E. coli* β2155 eignet sich besonders gut für eine biparentale Konjugation, da der Organismus auxotroph für Diaminopimelinsäure (DAP) ist. So wird bei Selektion nach dem Mating neben der Anwendung von Gentamycin durch das Fehlen von DAP der Selektionsdruck massiv erhöht. Zunächst wurden Kulturen des Rezipienten (*P. vulgaris*) und des Donors (*E. coli*) bis zu einer optischen Dichte von 0,3-0,6 angezogen. Anschließend wurden Rezipient und Donor in einem Zellzahlverhältnis von 1:3 – 1:10 (v/v) zusammengegeben. Diese Zell-Mischung wurde pelletiert für 1 Minuten bei 10.000 rpm zentrifugiert, und das Zell-Pellet wurde in 200 µl BHI resuspendiert, auf einen auf einer BHI-Agarplatte (+ 0,3 mM DAP für β2155) zentrierten Filter gegeben und über Nacht bei 37 °C unter aeroben Bedingungen kultiviert. Nach Inkubation wurden die Zellen auf dem Filter mit 2 ml BHI-Medium abgespült und 50 µl auf BHI-Agarplatten (Ohne DAP) mit 100 µg/ml Erythromycin und 200 µg/ml Gentamycin ausplattiert. Es folgte eine Selektion für 48-72 h unter anaeroben Bedingungen bei 37 °C.

2.4.14 Gendeletion in *P. vulgaris*

Die Erstellung aller Deletions-Vektoren erfolgte im Zuge dieser Arbeit unter Verwendung des NEBuilder HiFi DNA Assembly Kits (Kapitel 2.4.8.). Als Basis diente der Vektor pMM656, welcher durch den Ersatz der NBU2 Integrase durch *sacB* aus *B. subtilis* als Gegenselektionsmarker eine markerlose Deletion in

2. Material und Methoden

P. vulgatus erlaubte. Für die Konstruktion des Deletions-Vektors wurden das Vektorrückgrat von pMM656_SacB sowie zwei 1000 bp große DNA-Fragmente, welche den *up*- und *downstream*- Bereich des zu deletierenden Gens flankieren, benötigt.

Die Transformation des Deletions-Plasmids in *P. vulgatus* erfolgte durch biparentale Konjugation mittels *E. coli* β 2155, und mit anschließender Selektion der Transformanten auf Erythromycin (100 μ g/ml) und Gentamycin (200 μ g/ml) -haltigen BHI-Agarplatten. Da der Vektor in *P. vulgatus* nicht replizierbar ist, konnten nur Zellen auf den Antibiotika-haltigen Platten wachsen, welche das Konstrukt über homologe Rekombination in das Genom integriert hatten. Mittels Kolonie-PCR wurden diese auf das im Vektorrückgrat codierte *sacb* überprüft. Klone, bei denen das entsprechende Fragment nachgewiesen wurde und damit eine erste homologe Rekombination erfolgte, wurden für die Durchführung der zweiten homologen Rekombination eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden über die Kultivierung ohne Antibiotikum in BHI-Medium für 4 h bei 37 °C die Entfernung des Deletionsvektors aus dem Genom induziert. Anschließend erfolgte eine Selektion auf PY-Agarplatten mit 150 mM Saccharose, um die Klone zu identifizieren, welche potenziell den Deletionsvektor über eine zweite homologe Rekombination aus dem Genom entfernt hatten. Saccharose diente in diesem System zur Gegenselektion, da es durch die heterolog produzierte Levansucrase (*sacb*) zu Levan umgesetzt wird. Eine intrazelluläre Akkumulation von Levan nimmt einen letalen Einfluss auf den Organismus. Somit konnten nur Zellen, welche im Zuge einer zweiten homologen Rekombination den Vektor aus dem Genom entfernen, auf entsprechenden Selektionsplatten überleben. Wachstumsfähige Kolonien wurde zuletzt gleichzeitig auf PY-Agarplatten mit 150 mM Saccharose, sowie auf Platten mit 150 mM Saccharose und Erythromycin (100 μ g/ml) ausplattiert. Klone, welche nur auf Platten ohne Erythromycin Wachstum zeigten, mussten demnach den Deletionsvektor aus dem Genom entweder ohne das Deletionsziel (Wildtyp-Revertante) oder mit dem Deletionsziel (Deletions-Mutante) entfernt haben. Das Screening für die Identifizierung von Deletionsmutanten erfolgte über eine Kolonie-PCR, um die Anwesenheit des Deletionsziels zu überprüfen. Die Gegenselektion mit 5-Fluorouracil (5-FU) erfolgte analog zur Gegenselektion mit Saccharose. Es erfolgte eine Substitution von Saccharose mit 50 μ g/ml 5-FU.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Überproduktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Für die heterologe Produktion rekombinanter Proteine wurden *E. coli*-Zellen mit entsprechendem Plasmid in einer LB-Vorkultur mit Carbanicillin (100 μ g/ml) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm kultiviert. Eine 100 ml MI-Hauptkultur mit Carbanicillin (100 μ g/ml) wurde mit 2,5 % der Vorkultur inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ 0,3-0,5 bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Anschließend erfolgte die Induktion der Überproduktion durch Anhydrotetrazyklin (AHT; 200 ng/ml), und die Produktion erfolgte ab diesem

2. Material und Methoden

Zeitpunkt über Nacht bei 18 °C und 250 rpm. Die Expression des klonierten Gens wird durch den *tet*-Repressor des pASK-IBA3/5 Vektor solange inhibiert, bis dieser durch AHT eine Konformationsänderung erfährt, und folgend den Promotor freigibt. Anschließend wird die Transkription des Ziel-Gens ermöglicht. Für die optimale Proteinproduktion wurden die Kultur über Nacht bei 18 °C und 100 rpm nach Induktion inkubiert. Nach Inkubation wurden die Zellen bei 8,000 rpm für 10 min pelletiert und in 10 ml Puffer W (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris/HCl, pH 8) resuspendiert.

Analog dazu erfolgte die Aufreinigung von Sauerstoff-sensiblen Proteinen unter anaeroben Bedingungen. Nach der Induktion mit AHT wurde die der Schüttelkolben der *E. coli* Produktionskultur feste mit einem Gummistopfen verschlossen. Im Laufe der Produktion verbrauchte *E. coli* den restlichen Sauerstoff im Schüttelkolben, sodass sich automatisch anaerobe Bedingungen entwickelten. Für die Ernte der Zellen nach der Produktion wurde die Kultur in einer anaeroben-Kammer in Zentrifugenbecher überführt und mit einer Dichtung zwischen der Gefäß-Öffnung und dem Schraubverschluss versiegelt. Das resultierende Zell-Pellet wurde abschließend in anaeroben Puffer W (10 Minuten Begasung mit N₂) resuspendiert.

2.5.2 Zellaufschluss mittels Ultraschalls

Die in Puffer W resuspendierten Zellen wurden pro ml für 2 Minuten bei halbmaximaler Leistung mit gepulstem Ultraschall (Sonoplus Sonicator, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) bei 4 °C aufgeschlossen. Zur Entfernung der Zelltrümmer erfolgte eine Zentrifugation mit 15.000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C, und das erhaltene Zelllysate wurde für die nachfolgende Proteinaufreinigung bei 4 °C aufbewahrt.

Für Sauerstoff-sensible Proteine erfolgte der Zellaufschluss ebenfalls über Ultraschall, jedoch wurde dieser Schritt in einer anaeroben-Kammer durchgeführt.

2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde die Strep-Tactin-Affinitätschromatographie angewendet. Grundlage dieser Methode ist die Interaktion zwischen dem künstlichen Oligopeptid „Strep-tag II“ (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK) und einem Strep-Tactin-Säulenmaterial (immobilisiertes Strep-Tactin). Die nachfolgend beschriebene Durchführung erfolgte bei 4 °C. Klares Zelllysate wurde auf eine 50 %ige (v/v) Strep-Tactin-Sepharose-Säule (Strep-Tactin-®XT Superflow®; IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland; Säulenvolumen (Column Volume, CV) 1 ml) gegeben, welche zuvor mit 2 CV Puffer W äquilibriert wurde. Anschließend wurde die Säule 5 x mit 1 CV Puffer W gewaschen. Durch die Zugabe von 6 x 0,5 ml CV Puffer BXT (Puffer W mit 50 mM Biotin) wurde das Fusionsprotein schrittweise von der Säule eluiert. Zur Regenerierung wurde die Säule mit 4 CV frisch

2. Material und Methoden

hergestellter NaOH (10 mM) behandelt. Durch die abschließende Zugabe von 8 CV Puffer W wurde das NaOH entfernt und die Säule für zukünftige Aufreinigungen bei 4 °C gelagert. Die Elutionsfraktionen wurden 1:1 mit 100% Glycerin versetzt und für nachfolgende Experimente bei –20 °C gelagert.

Die Aufreinigung von Sauerstoff-sensiblen Proteinen erfolgte in einer anaeroben-Kammer. Alle Komponenten, welche für die Aufreinigung notwendig waren, wurden vor Gebrauch zur Anaerobisierung für 5 Minuten mit N₂ begast. Für die Anaerobisierung des Säulenmaterials wurde die Säule vorbereitet und über Nacht in der anaeroben-Kammer aufbewahrt. Die Elutionsfraktionen wurden in 10 ml Serumflaschen aufgefangen, mit Butyl-Stopfen versiegelt und bei –70 °C gelagert.

2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentration

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde in dieser Arbeit das auf dem Bradford-Test basierende ROTI®-Quant Konzentrat verwendet (Bradford, 1976). Dieser Nachweis beruht auf der Verschiebung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 von 465 nm nach 595 nm bei Bindung an hydrophobe und kationische Seitenketten von Proteinen in saurer Lösung. Für die Protein-Quantifizierung wurden 980 µl des verdünnten 5x Konzentrats mit 20 µl der zu messenden Lösung versetzt, der Ansatz durchmischt und für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte eine photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm. Durch den Abgleich mit einer Kalibriergeraden, die unter Verwendung von BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen erstellt wurde, konnte der Proteingehalt der gemessenen Lösung berechnet werden.

2.5.5 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode, welche eine die Auftrennung denaturierter Proteine in einer Gelmatrix aufgrund der Größe ihrer Primärstruktur in einem elektrischen Feld erlaubt. Das Verfahren wurde in dieser Arbeit modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt. Hierbei enthält das diskontinuierliche Gel ein Tenn- und ein Sammelgel, deren Porengrößen durch die zugesetzte Acrylamid/Bisacrylamid Konzentration bestimmt werden. Das ionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS = sodium dodecyl sulfate) denaturiert und entfaltet die Proteine. Außerdem überdeckt es die Eigenladung der Proteine, sodass die Proteine eine konstante negative Ladungsverteilung aufweisen.

Die SDS-gebundenen Proteine wandern in einem elektrischen Feld in Richtung Anode und werden im Acrylamid/Bisacrylamid-Gel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Zunächst durchlaufen die Proteine das Sammelgel (pH 6,8) und dann das Trenngel (pH 8,8). Das im Laufpuffer enthaltene Glycin (Folge-Ion) liegt bei dem neutralen pH-Wert des Sammelgels als Zwitter-Ion vor und hat damit im Vergleich zum Chlorid-Ion (Leit-Ion) eine geringere Nettoladung und damit auch eine geringe Mobilität, wodurch ein Spannungsfeld zwischen beiden Ionen entsteht. Die Proteine laufen in diesem Spannungsfeld unabhängig von der Größe mit derselben Geschwindigkeit, und werden an der Front des Sammelgels

2. Material und Methoden

auf diese Weise konzentriert. Beim Übertritt ins Trenngel erhält Glycin aufgrund der Änderung des pH-Werts eine negative Ladung, und läuft den Proteinen voraus, sodass diese aufgrund der Porengröße des Acrylamid/Bisacrylamid-Gels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. In dem verwendeten diskontinuierlichen Gel betrug die Acrylkonzentration des Sammelgels 5 % und die des Trenngels 12,5 % (Tab. 17). Ammoniumpersulfat diente als Polymerisationsinitiator für die Gelbildung und TEMED fungierte als Katalysator der Reaktion. Vor der Beladung des Gels wurden die Proben 1:1 mit Ladepuffer versetzt und für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Als Marker diente die PageRuler Prestained Protein Ladder (Kapitel 2.1.6). Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Gelkammern. Dabei wurde für den Lauf durch das Sammelgel eine Spannung von 60 V und die Auftrennung durch das Trenngel eine Spannung von 100 V angelegt.

Tabelle 17: Zusammensetzung der Komponenten für die SDS-PAGE

Trenngel-Puffer

Substanz	Menge
Tris-Base	22,77 g
HCl	Titration auf pH 8,8
H ₂ O _{dest}	ad 1000 ml

Elektrodenpuffer

Substanz	Menge
Tris-Base	3 g
Glycin	14,4 g
SDS	1 g
HCl	Titration auf pH 8,8
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml

Ladepuffer

Substanz	Menge
Sammelgel-Puffer	2 ml
2-Mercaptoethanol	0,5 ml
1 % Bromphenolblau	0,1 ml
Glycin	5 ml
H ₂ O _{dest}	Ad 10 ml

10 % APS-Lösung

Substanz	Menge
Ammoniumpersulfat	0,1 g
H ₂ O _{dest}	Ad 1 ml

0,5 % SDS-Lösung

Substanz	Menge
SDS	0,5 g
H ₂ O _{dest}	Ad 100 ml

Tabelle 18: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel

Komponente	Trenngel (12,5 %)	Sammelgel (5 %)
Rotiphorese® Gel 40	2 ml	250 µl
Trenngel-Puffer	1,2 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	400 µl
SDS-Lösung	1,2 ml	400 µl
rH ₂ O	1,6 ml	950 µl
TEMED	5 µl	5 µl
APS	30 µl	30 µl

2.5.6 Silber-Färbung

Die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) ist eine Methode zur Visualisierung der im Polyacrylamidgel befindlichen Proteine mit einer extrem niedrigen Nachweisgrenze von wenigen ng Protein. Grundlage dieser Färbetechnik ist die Anlagerung von Silberionen an negativ geladene Proteinseitenketten. Durch Zugabe von Formaldehyd erfolgt eine Reduktion dieser Ionen zu sichtbarem, elementarem Silber, welches bereits mit dem bloßen Auge erkennbar ist.

Für die Färbung wurde das SDS-Gel zunächst für 20 min in Fixierlösung zur Präzipitation der Proteine inkubiert und anschließend 10 min mit 50 % Methanol überschichtet. Es folgte ein Waschen des Gels für 10 min mit rH₂O, sowie eine Inkubation für 1 min in Thiosulfatlösung zur Sensitivitäts- und Kontrasterhöhung. Nach zwei weiteren Waschschritten für 1 min mit H₂O_{dest} wurde die Imprägnierung des Gels für 20 min im Dunkeln bei 4 °C mit einer Imprägnierlösung durchgeführt. Durch die Inkubation mit Silbernitrat lagern sich die Silber-Ionen an die negativ geladenen Seitenketten der Proteine an. Anschließend wurde das Gel mit Entwicklerlösung überschichtet, um eine Reduzierung der Silberionen zu elementarem Silber durch Formaldehyd zu ermöglichen. Die Reaktion wurde durch die abrupte Zugabe der Stopplösung beendet und das Ergebnis wurde in einem Scanner (Chemidoc imaging System, Biorad, Kalifornien USA) Fotografiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 19: Zusammensetzung der Lösungen für die Silberfärbung von SDS-Gelen

Fixier-Lösung

Substanz	Menge
Methanol	500 ml
Essigsäure (100 %)	120 ml
Formaldehyd (37%)	0,5 ml
HCl	Titration auf pH 8,3
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml

Thiosulfat-Lösung

Substanz	Menge
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,01 g
H ₂ O _{dest}	Ad 50 ml

Imprägnier-Lösung

Substanz	Menge
AgNO ₃	0,05 g
H ₂ O _{dest}	Ad 50 ml

Entwickler-Lösung

Substanz	Menge
Na ₂ CO ₃	1,5 g
Formaldehyd (37 %)	0,050 ml
Na ₂ S ₂ O ₃ x 5 H ₂ O	0,004 ml
H ₂ O _{dest}	Ad 50 ml

Stopp-Lösung

Substanz	Menge
Methanol	25 ml
Essigsäure	2,5 ml
H ₂ O _{dest}	Ad 50 ml

2.5.7 Western-Blot

Neben dem unspezifischen Protein-Nachweis mittels Silberfärbung können Proteine im Anschluss an die SDS-PAGE auch durch einen immunologischen Nachweis detektiert werden. Beim Verfahren des Western Blots erfolgt ein spezifischer Nachweis von Protein-Epitopen durch Verwendung von Antikörpern oder speziellen Konjugaten (Towbin *et al.* 1979). Das in dieser Arbeit für die Aufreinigung von rekombinanten Proteinen genutzte Strep Tag II ermöglicht einen hochspezifischen Nachweis durch die Verwendung eines Strep-Tactin-Konjugats. Durch Kopplung von Strep-Tactin mit einer Meerrettich-Peroxidase und eine nachgeschaltete Farbreaktion, wird eine spezifische Färbung der rekombinanten

2. Material und Methoden

Proteine gewährleistet. Die Peroxidase katalysiert dabei die Oxidation des Farbstoffs 4-Chloro-1-naphthol in Anwesenheit des Elektronenakzeptors H_2O_2 . Das entstehende Oxidationsprodukt 4-Chloro-1-naphthol besitzt eine intensive blaue Färbung, welche bereits mit dem bloßen Auge erkennbar ist.

Durch das *Semidry*-Blot-Verfahren wurden die Proteine für 30 min bei einer Spannung von 15 V aus der Gel-Matrix auf eine Nitrocellulose-Membran (Bio-Rad, München, Deutschland) transferiert. Ober- und unterhalb des Gels bzw. der Membran wurden 3 Whatman-Paper platziert, welche zuvor in Towbin-Puffer äquilibriert wurden. Im Anschluss an den Transfer der Proteine wurde die Membran über Nacht bei Raumtemperatur in 20 ml PBS-Blockier-Lösung (PBS mit PBS-Puffer mit 0,5 % (v/v), Tween 20 und 5 % (w/v) Milchpulver) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzudecken und somit mögliche Fehlbindungen des Antikörper-Konjugats zu vermeiden.

Tabelle 20: Zusammensetzung von PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline).

PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline)

Substanz	Menge
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na_2HPO_4	0,256 g
KH_2PO_4	0,2 g
dH_2O	Ad 1000 ml
pH-Wert auf 7,4 eingestellt	

Es folgte ein dreimaliger Waschschrift für jeweils 5 min in 20 ml PBST-Puffer (PBS-Puffer mit 0,05% Tween 20 [v/v]) und eine anschließende Inkubation für 1 h in 20 ml PBST-Puffer, welcher 5 μl des Streptactin-Meerrettichperoxidase-Konjugats (IBA Lifesciences; Göttingen, Deutschland) enthielt. Es folgten zwei Waschschrift mit 20 ml PBST-Puffer, sowie zwei weitere Waschschrift mit 20 ml PBS-Puffer für jeweils 1 min. Für die Ausbildung einer Farbreaktion wurde die Membran in 20 ml PBS-Puffer gegeben, dem 20 μl Wasserstoffperoxid-Lösung und 200 μl Chromogen-Lösung zugefügt wurden. Bis zur Bildung sichtbarer Banden wurde die Färbung unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur durchgeführt.

Tabelle 21: Zusammensetzung der Chromogen-Lösung

Lösung	Zusammensetzung
Chloronaphthol-Lösung	3 % (w/v) 4-Chloro-1-naphthol in Methanol
Wasserstoffperoxid	30 % (v/v) H_2O_2

2.5.8 Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen

Für die Präparation der Membran- und Cytoplasmafraktion von *P. vulgatus* wurden 500 ml einer Kultur in BHI-Medium bis zu einer OD_{600} angezogen und bei 8000 rpm für 15 min geerntet. Das Zellmaterial

2. Material und Methoden

wurde in 20 ml Puffer W (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert und über Ultraschall aufgeschlossen (Bandelin Sonoplus Sonicator, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland; 30 min; gepulste Ultraschallintervalle; 60 % Intensität). Das entstandene Zelllysate wurde zur Entfernung der Zelltrümmer für 15 min bei 15.000 rpm und 4 °C. Der erhaltene Überstand wurde letztendlich ultrazentrifugiert (150.000 g, 4°C, 90 min) um die Membranfragmente von der löslichen Proteinfraction abzutrennen. Nach diesem Schritt stellte der Überstand die Cytoplasmafraction dar und wurde bei -70 °C gelagert. Die sedimentierte Membranfraction wurde erneut in Puffer W gewaschen und für weitere 60 min ultrazentrifugiert. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -70 °C.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Bei der Hochleistungs-Chromatographie (HPLC) handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren zur Auftrennung und Quantifizierung von Stoffgemischen. Die Proben für die Analyse werden mittels eines Laufmittels (mobile Phase) über eine Trennsäule (stationäre Phase) geführt, und durch die Wechselwirkung der Verbindungen mit der stationären bzw. mobilen Phase beeinflussen die Geschwindigkeit der Bewegung durch das Säulenmaterial. Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte über den Vergleich mit bekannten Standard-Substanzen über die Elutionszeiten. Für die Quantifizierung wurde die Fläche unter den Detektorsignalen berechnet. Mithilfe einer Standard-Substanz mit bekannter Konzentration konnten direkt Konzentrationen derselben Substanz aus experimentellen Proben berechnet werden. In Abhängigkeit der Anwendung wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene stationäre Phasen verwendet.

Für die Untersuchung der Stoffwechsel-Endprodukte von *P. vulgaris* wurde In dieser Arbeit verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Phase der Kulturüberstand mittels HPLC analysiert. Dafür wurde der Kulturüberstand 1:3 mit 5 mM H₂SO₄ verdünnt eingesetzt und mit Hilfe einer Aminex HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule und 5 mM H₂SO₄ (mobile Phase) bei 65 °C durchgeführt. Die Flussrate betrug 1,2 ml/min. Bio-Rad Aminex HPX-87H Säule ist grundsätzlich für die Analyse von Mono- bis Disacchariden und organische Säuren ausgelegt. Hierbei handelt es sich um einen Kationentauscher. Die stationäre Phase besteht aus negativ geladenem Material, an das die Substanzen in der Probe binden. Je nach Stärke der positiven Ladung der Substanzen werden diese nach unterschiedlichen Zeiten durch das Laufmittel verdrängt. Die Detektion, sowie Quantifizierung der Substanzen erfolgte über den Brechungsindex-Detektor (RI) und Bestimmung der Konzentrationen von Substratverbrauch und Produktbildung erfolgte mithilfe von Standardsubstanzen. Alle Messungen von kurzkettigen Fettsäuren erfolgten über folgendes System:

2. Material und Methoden

- Thermostat: AZURA Säulenthermostat CT 2.1
- Pumpe: Niederdruckgradientenpumpe AZURA 6.1L
- Probeninjektion: Autosampler AZURA AS 6.1L
- RI-Detektor: AZURA RID 2.1 L

Für die Analyse von Phenolsäuren wurde eine Kieselgel-Matrix, bestehend aus Pentafluorphenyl-Propyl-Resten (Nucleodur PFP, Macherey-Nagel), verwendet. Dieses Material zeichnet sich durch zwei besondere Retentionsmechanismen aus: Zum einen handelt es sich um ein sehr hydrophobes Material, zum anderen interagiert das Material mit π -Elektronen. Durch den Benzolring erhalten Phenolsäuren einen hydrophoben Charakter. Darüber hinaus sind delokalisierte π -Elektronen charakteristisch für Benzolringe. Dieses Säulenmaterial ist ungeeignet für die Retention geladener Moleküle. Daher wurde der mobilen Phase neben 20% Acetonitril 0,1% Formiat zugesetzt, um den organischen Säurerest der Analyten zu protonieren. Als Probenmaterial wurden entweder Kultur-Überstand oder Material aus Reaktionsansätzen 1:1 mit 40% Acetonitril mit 0,1% Formiat vermischt. Die Analyse erfolgte bei 30 °C mit einer Flussrate von 0,2 ml/min, und die Detektion erfolgte über einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Messungen von Phenolsäuren wurden mit folgenden Geräten durchgeführt:

- Entgaser: SpectraSystem SCM1000 Vakuum Entgaser
- Pumpe: SpectraSystem P4000 Gradienten-Pumpe
- Probeninjektion: SpectraSystem AS3000 Autosampler
- UV-Detektor: AZURA UV/Vis Detektor UVD 2.1L

2.6.2 Fluoreszenz-Mikroskopie

Die Auswertung der Zellen mit UnaG/IFP2.0 markierter LDH erfolgte mit einem speziell angefertigten Lasergestützten Fluoreszenz-Mikroskop (Zur Verfügung gestellt und betrieben von Dr. Koen Martens, Arbeitsgruppe Endesfelder, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn, Deutschland). Einzelne Laserlinien (638 nm, 1100 mW, betrieben mit 200 mW; oder 488 nm, 1000 mW, betrieben mit 50 mW, (Oxxius, Frankreich)) wurden über neigbare (dichroitische) Spiegel (DMLP605, DMLP505, Thorlabs GmbH, Dachau, Deutschland) auf ein achromatisches 10x-Objektiv (Olympus, Tokio, Japan) ausgerichtet, um in eine Multimode-Faser mit 50 μ m Durchmesser (M42L05, Thorlabs) eingekoppelt zu werden. Der Ausgang der Faser wird über eine reflektierende Blende (RC04FC-P01, Thorlabs) gebündelt, und der Strahl wird über eine Reihe von Linsen (LB1471-A-ML und LA4725-A, Thorlabs) erweitert. Dieser Strahl wird über eine achromatische Linse (AC254-400-A-ML, Thorlabs) und einen dichroitischen Spiegel (ZT405/488/561/648rpc, Chroma, Bellows Falls, VT, USA) fokussiert, der in ein handelsübliches inverses Mikroskop (Nikon Eclipse Ti-E, Nikon, Tokio, Japan) eingebettet ist, das

2. Material und Methoden

mit einem Fokus-Stabilisierungssystem (Perfect Focus System) auf der Back-Focal-Ebene eines 60x Apochromat TIRF 1,49 NA Objektivs (Nikon) ausgestattet ist. Die von der Probe ausgehende Emission wurde über das Objektiv und den dichroitischen Spiegel durch einen Filter (ZET405/488/561/642m-TRF, Chroma) geleitet und auf eine Prime BSI sCMOS Kamera (Teledyne Photometrics, Tucson, AZ, USA; 107 nm Pixelgröße) geleitet, die durch einen Emissionsfilter (ET510/80m, Chroma, oder FF01-689/23-25, Semrock, Oak Harbor, WA, USA) und ein 4f-System über zwei konvexe achromatische Linsen (AC508-100-A, Thorlabs) geleitet wird. Mikroskop, Kamera und Peripheriegeräte wurden über MicroManager 2.0, und der Lasertrigger wurde über ein TriggerScope 4 (Advanced Research Consulting, Newcastle, CA, USA) gesteuert (Edelstein *et al*, 2014).

Zur Vorbereitung wurden die Stämme *P. vulgatus* pG106_UnaGN_2499 und *P. vulgatus* pG106_IFP2.0N_2499 in BHI-Medium mit Erythromycin (100 µg/ml) kultiviert. Diese Vorkulturen wurden für die Inokulation von DMM-Medium verwendet, welches für die Induktion der Fluoreszenz im Falle von UnaG 25 µM Bilirubin, und im Falle von IFP2.0 2,5 µM Biliverdin enthielt. Als Stock-Lösung wurden Bilirubin und Biliverdin in DMSO gelöst, bei -20 °C gelagert, und bei Bedarf aufgetaut. Als Vorbereitung für die Mikroskopie wurde ein Objektträger mit Mulde mit warmen DMM + 1% Agarose bis zu ungefähre Höhe des Objektträgers befüllt. Die Mulde wurde anschließend mit einem Deckglas abgedeckt und für mindestens eine Stunde in der anaeroben-Kammer inkubiert. Nach Erreichen der späten exponentiellen Phase wurden 2 ml Kulturmaterial entnommen, für 2 Minuten bei 12.000 rpm zentrifugiert, und das Zell-Pellet wurde in 50 µl DMM-Medium mit Bilirubin/Biliverdin resuspendiert. Nach der Polymerisierung des DMM-Agarose-Gemischs wurde Kulturmaterial auf den vorbereiteten Objektträger gegeben und das Deckglas wurde an den Rändern durch das Auftragen von klarem Nagellack versiegelt. Die Fluoreszenz-Mikroskopie wurde mit dem oben beschriebenen Aufbau durchgeführt. Die Detektion des UnaG-Tags erfolgte über eine Anregungswellenlänge von 488 nm und einem 510/85 Emissions-filter (ET510/80m, Chroma, Oak Harbor, WA, USA). Für die Detektion des IFP2.0 Tags wurde eine Anregungswellenlänge von 638 nm in Kombination mit einem 689/23 Emissions-Filter (FF01-689/23-25, Semrock, Oak Harbor, WA, USA) verwendet. Die generierten Bilder wurden mit der Software FIJI (ImageJ) bearbeitet.

2.6.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Pyrophosphat

Die Quantifizierung von Pyrophosphat (PPi) wurde modifiziert nach Putnins & Yamada, 1975. Diese Methode ist spezifisch für PPi und lässt sich selbst durch eine 10-Fach höhere Konzentration an freiem Phosphat nicht beeinflussen. PPi und Molybdat reagieren in starker Schwefelsäure zu 12-molybdophosphorsäure, welche unter reduzierenden Bedingungen zur Bildung eines blauen Molybdänkomplexes führt. Für die Durchführung wurden 380 µl der Probe in 380 µl Trichloressigsäure (12 % [w/v]) gegeben. Im Anschluss wurden 100 µl Ammoniumtetramolybdat (2.5 % [w/v] in 2,5 M H₂SO₄), 100 µl 0.5 M β-Mercaptoethanol und 40 µl Eikonogen-Reagenz (0.25 g Natriumsulfit, 14,65 g

2. Material und Methoden

Kaliumdisulfit, 0,25 g 1-amino-2-naphthol-4-sulfonsäure gelöst in 80 ml 80 °C H₂O_r, abgekühlt auf Raumtemperatur, aufgefüllt auf 100 ml mit H₂O_r) hinzugegeben. Die Proben wurden für 15 min bei 37 °C inkubiert und die Absorption wurde bei 580 nm gemessen. PPI Konzentrationen wurden über eine Standardkurve (0-0,05 mM PPI) berechnet.

2.6.4 Quantifizierung von ATP

Um die Bildung von ATP im Rahmen von Enzymassays zu messen wurden zum gewünschten Zeitpunkt 50 µl aus dem Assay mit 20 µl Perchlorsäure (3 M) abgestoppt. Anschließend wurde die Probe durch Zugabe von 6,5 µl gesättigter Kaliumcarbonat-Lösung neutralisiert und mit 40 µl Natrium TES-Puffer (400 mM, pH 7,4) versetzt. Zur Entfernung der Kaliumchlorat-Präzipitate, welche bei der Neutralisierung entstanden, wurde die Probe für 1 min bei 13000 rpm abzentrifugiert. Abschließend wurden 20 µl des Überstands in 180 µl ATP-Bestimmungspuffer (5 mM Natriumarsenit, 4 mM MgSO₄, 20 mM Glycylglycin, pH 8) überführt. Die Bestimmung der ATP-Konzentration erfolgte über die Zugabe von Glühwürmchen-Extrakt und der damit verbundenen Emission von Lichtquanten, welche über einen Photodetektor quantifiziert werden können. Die Proben wurden in schwarze 96-Well Platten überführt und unmittelbar vor der Messung mit 50 µl Glühwürmchen-Extrakt versetzt. Die im Extrakt befindliche Luciferase oxidiert unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und Hydrolyse von ATP zu Oxoluciferin. Anhand der dabei entstehenden Lichtemissionen kann die Menge an ATP im Probenvolumen über eine Standardkurve quantifiziert werden. Für die Detektion der Photonen wurde ein 200 PRO NanoQuant Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit einem Detektionsintervall von 1 Sekunde verwendet.

2.7 Bestimmung von Enzym-Aktivitäten

2.7.1 Bestimmung der Indolpyruvat-Oxidoreduktase (IOR)-Aktivität

Die Aktivität der IOR aus *P. vulgaris* (BVU_2273-2274) wurde über die Absorptions-Änderung von oxidiertem Methylviologen (MV_{ox}) zu reduziertem Methylviologen (MV_{red}) gemessen. Der künstliche Elektronenakzeptor Methylviologen nimmt in reduzierter Form eine kräftige violette Farbe an, welche bei 604 nm detektiert werden kann. Für die allgemeine Aktivitätsbestimmung wurde der in Tabelle 22 aufgeführte Reaktionsansatz vorbereitet und bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert.

2. Material und Methoden

Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Bestimmung der Enzymaktivität der heterolog produzierten IOR (BVU_2273-2274)

Substanz	Konzentration
McIlvayne Puffer (pH 7)	40 mM
Phenylpyruvat	4 mM
Coenzym A	0,1 mM
Thiamin-Pyrophosphat	0,12 mM
Methylviologen	5 mM
IOR (2,3 mg/ml)	5 µg
dH ₂ O	Ad 1000 µl

Die Bestimmung des pH-Optimums wurde bei einer Temperatur von 37 °C gemessen, während der pH-Wert des eingesetzten Puffer-Systems zwischen 6-9,5 variiert wurde. Die Bestimmung des Temperatur-Optimums erfolgte bei einem pH-Wert von 7 und einem Temperatur-Bereich von 37 °C – 67 °C. Anhand der Absorptionsänderung pro Minute ($\Delta E_{604}/\text{min}$) wurde zunächst die Volumen-Aktivität des Enzyms anhand folgender Formel berechnet:

$$\text{Volumenaktivität} \left[\frac{U}{\text{ml}} \right] = \frac{\frac{\Delta E}{\text{ml}}}{\varepsilon * d} * \frac{\text{Testvolumen}}{\text{Enzymvolumen}}$$

$\Delta E/\text{min}$: Veränderung der Absorption pro Minute

d: Schichtdicke der Küvette (1 cm)

ε : Extinktionskoeffizient von MV bei 604 nm ($13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)

Für die Berechnung der spezifischen Aktivität wurde im Rahmen der folgenden Formel der Wert der Volumenaktivität durch die mittels Bradford ermittelten Proteinkonzentration der eingesetzten Proteinpräparation dividiert, sodass die Aktivität die Umsetzung von 1 µmol Substrat pro min und mg Enzym beschreibt:

$$\text{Spezifische Aktivität} \left[\frac{U}{\text{mg}} \right] = \frac{U/\text{ml}}{c(\text{Enzym}) \text{ in } \text{mg}/\text{ml}}$$

U: µmol umgesetztes Substrat pro Minute

Neben der Bestimmung der spezifischen Enzymaktivität erfolgte im Rahmen der Charakterisierung auch die Bestimmung der Affinität des Enzyms für das korrespondierende Substrat (K_M -Wert) sowie die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} . Zu diesem Zweck wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik erstellt, welche über die Auftragung der spezifischen Aktivität des Enzyms bei variierender Substratkonzentration die Ableitung des K_M - und V_{max} -Wertes erlaubt. Der K_M -Wert der IOR für Phenylpyruvat wurde dementsprechend durch die Bestimmung der spezifischen Aktivität bei Phenylpyruvat-

2. Material und Methoden

Konzentration von 0,01-4 mM ermittelt. Die Nicht-lineare Regression und der damit verbundenen Ermittlung des K_M - und V_{max} -Wertes erfolgten über den Einsatz der Software Prism 8.0.

Ausgehend von der spezifischen Aktivität erfolgte die Wechselzahl K_{cat} , welche die Substratumsetzung von einem Enzym pro Sekunde beschreibt:

$$K_{cat}(sek^{-1}) = \frac{\text{Spezifische Aktivität } (\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1})}{\text{Stoffmenge des Enzyms } (\mu\text{mol mg}^{-1})}$$

Durch die Bildung des Quotienten der Wechselzahl K_{cat} durch die Michaeliskonstante K_M ergibt sich die katalytische Effizienz K_{cat}/K_M ($M^{-1}s^{-1}$)

2.7.2 Bestimmung der Phenylelessigsäure-Coenzym A Ligase-Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Phenylelessigsäure-Coenzym A (CoA) Ligase aus *P. vulgatus* sowohl mit Hinblick auf die Bildung von Phenylacetyl-CoA als auch Phenylelessigsäure untersucht. Die Berechnung der Aktivität für die Reaktion von Phenylelessigsäure zu Phenylacetyl-CoA erfolgte über die diskontinuierliche Bestimmung von freigesetztem PPi (Kapitel 2.6.3).

Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Bestimmung der Enzymaktivität der heterolog produzierten Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) unter Bildung von Phenylacetyl-CoA

Substanz	Konzentration
HEPES Puffer (pH 7)	40 mM
Phenylelessigsäure	4 mM
Coenzym A	0,5 mM
ATP	0,5 mM
Phenylacetyl-CoA Ligase (3,5 mg/ml)	5 µg
dH ₂ O	Ad 1000 µl

Die Bestimmung des K_M - und V_{max} -Werts erfolgten für die beiden Substrate Phenylelessigsäure und ATP. Zu diesem Zweck wurde die Konzentration Phenylelessigsäure und ATP im Bereich von 0,01-1 mM variiert. Die Aktivitätsberechnungen wurden aufgrund der diskontinuierlichen Messung der PPi-Freisetzung angepasst. Die Inkubation des Reaktionsansatzes wurde für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Anschließend erfolgte die Quantifizierung von PPi gemäß Kapitel 2.6.3. Die so erhaltene Absorptionsänderung pro 30 Minuten wurde auf Absorptionsänderung pro Minute Berechnungen umgerechnet:

$$\frac{\Delta E}{\text{min}} = \frac{\Delta E}{\frac{30 \text{ min}}{30}}$$

$\Delta E/\text{min}$: Veränderung der Absorption pro Minute

$\Delta E/30 \text{ min}$: Veränderung der Absorption pro 30 Minuten

Nach der Ermittlung von $\Delta E/\text{min}$ erfolgten die restlichen Berechnungen für die Aktivitätsbestimmungen nach Formel X in Kapitel 2.7.1.

2.7.3 Gekoppelter Enzymtest zum Nachweis der Bildung von Phenylelessigsäure

Die partielle Charakterisierung der Phenylacetyl-CoA Ligase mit Hinblick auf die Bildung von Phenylelessigsäure wurde durch die Verwendung der IOR als Hilfsenzym durchgeführt. Der entsprechende Reaktionsansatz ist in Tabelle 24 definiert.

Tabelle 24: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für Bildung von Phenylelessigsäure durch Kombination der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) mit der IOR (BVU_2273-2273)

Substanz	Konzentration
Kalium-Phosphat Puffer (pH 7)	40 mM
Methylviologen	5 mM
Phenylpyruvat	4 mM
Thiamin-Pyrophosphat	0,12 mM
Coenzym A	0,05 mM
AMP	0,2 mM
PPi	0,2 mM
IOR (2,3 mg/ml)	15 μg
Phenylacetyl-CoA Ligase (3,5 mg/ml)	10 - 30 μg
dH ₂ O	Ad 1000 μl

Zunächst wurde die Reaktion durch die Zugabe von 15 μg IOR gestartet. Da der Reaktion nur sehr geringe Mengen CoA zugeführt wurden stoppte die Reaktion zeitnah nach dem Start. An diesem Punkt wurde die Phenylacetyl-CoA Ligase zugegeben. Die Reaktion von Phenylacetyl-CoA zu Phenylelessigsäure setzte erneut CoA frei, wodurch dieses der Reaktion für die IOR wieder zur Verfügung stand. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dem Assay eine Probe für die ATP-Bestimmung entnommen (Kap. 2.6.4). Die Ermittlung der spezifischen Aktivität Aktivitätsbestimmung erfolgte über den Nachweis von freigesetztem ATP gemäß Kapitel 2.7.2.

2.7.4 Charakterisierung der aromatischen Aminosäuren Ammoniak-Lyase (TAL) aus *P. vulgatus* (BVU_1010)

Die Aktivitätsbestimmung der TAL aus *P. vulgatus* erfolgte über den photometrischen Nachweis der gebildeten Produkte, ausgehend von den Substraten Phenylalanin und Tyrosin. Die Reaktion von Phenylalanin zu Zimtsäure wurde über die Absorptionsänderung bei 295 nm, und die Reaktion von Tyrosin zu Cumarsäure bei 310 nm gemessen. Anhand der Extinktionskoeffizienten von Zimtsäure ($17,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) und Cumarsäure ($16,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) wurde die Enzymaktivität gemäß Kapitel 2.7.1 berechnet.

2. Material und Methoden

Tabelle 25: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Charakterisierung der aromatischen Aminosäuren Ammoniak-Lyase aus *P. vulgatus*.

Substanz	Konzentration
McIlvayne Puffer (pH 7)	40 mM
Tyrosin/Phenylalanin	4 mM
TAL (2,86 mg/ml)	10 µg
dH ₂ O	Ad 1000 µl

Die Bestimmung des pH-Optimums wurde bei einer Temperatur von 37 °C gemessen, während der pH-Wert des eingesetzten Puffer-Systems zwischen 6,5-9,5 variiert wurde. Die Bestimmung des Temperatur-Optimums erfolgte bei einem pH-Wert von 7 und einem Temperatur-Bereich von 37 °C – 73 °C. Die Bestimmung des K_M - und V_{max} -Werts erfolgte über die Berechnung der spezifischen Enzymaktivität bei verschiedenen Substrat-Konzentrationen. Im Falle von Tyrosin wurde die Substrat-Konzentration in einem Bereich von 0,025-1,6 mM variiert, und im Falle von Phenylalanin im Bereich von 1-240 mM.

2.7.5 Charakterisierung der Exo-β-Fructosidase BVU1663

Die Aktivitätsbestimmung der Exo-β-Fructosidase BVU1663 aus *P. vulgatus* erfolgte über die chromatographische Quantifizierung von Fruktose-Monomeren sowie FOS verschiedener Kettenlängen. Als Substrat wurden Levan, Inulin, Levan-FOS und Inulin-FOS eingesetzt. Da die genaue Zusammensetzung der Fruktan-Präparate bezüglich Kettenlängen nicht bekannt war, wurde die eingesetzte Konzentration in Fruktose-Äquivalenten berechnet.

Tabelle 26: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Charakterisierung der Exo-β-Fructosidase BVU1663 aus *P. vulgatus*.

Substanz	Konzentration
Kaliumphosphat-Puffer (pH 7)	40 mM
Levan-FOS/Inulin-FOS	50 mM (Fruktose-Äquivalente)
BVU1663 (1,94 mg/ml)	5 µg
dH ₂ O	Ad 1000 µl

Pro Datenpunkt wurde jeweils ein separates Assay in 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Tabelle 26 vorbereitet und bei 37 °C im Heizblock inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 50 µl aus einem Reaktionsansatz mit 150 µl Ethanol (96%) für 15 Sekunden zum abstoppen der Reaktion vermischt. Um eventuell Überreste von Fruktan-Polymeren zu entfernen wurde die abgestoppte Probe für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Für die Quantifizierung der FOS-Konzentrationen wurden aus dem Überstand 100 µl entnommen und mit 300 µl Acetonitril (90 %) mittels Vortex-Mixer vermischt und erneut für 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden direkt für die HPLC-Analyse eingesetzt. Anhand der Freisetzung von

2. Material und Methoden

Fruktose-Einheiten in Abhängigkeit von der Zeit, der eingesetzten Substrat-Konzentration und Enzym-Menge wurde die Enzymaktivität anhand der Formeln aus Kapitel 2.7.1 berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung eines Systems für die markerlose Gendeletion in *P. vulgaris*

Für die Entwicklung und Optimierung eines biotechnologisch nutzbaren Mikroorganismus sind Werkzeuge für eine genetische Manipulation von essenzieller Bedeutung. Gängige Methoden, wie z.B. die transiente oder permanente Einbringung von Plasmiden, bedingen oft einen ständigen Selektionsdruck durch z.B. Antibiotika, damit die Plasmide nicht von den Organismen abgebaut werden. Dies steht im Konflikt mit den Anforderungen der angewandten Biotechnologie, da im Optimalfall auf die übermäßige Verwendung von Antibiotika zugunsten der Umwelt sowie zur Kostenreduktion verzichtet werden soll. Weiterhin beschränkt sich der Einsatz von Plasmid-Systemen auf die homologe oder heterologe Überexpression von Proteinen. Aus diesen Gründen werden solche Systeme durch die Deletion von Genen ergänzt oder ersetzt. Die Entfernung von Gensequenzen aus dem Genom kann den Stoffwechsel zu einem gewünschten Produkt gezielt lenken, indem die Synthese von Enzymen aus konkurrierenden Stoffwechselwegen unterbunden wird.

Ansätze zur biotechnologischen Herstellung von Plattformchemikalien mithilfe von Vertretern des Phylums Bacteroidota, einschließlich *P. vulgaris*, gibt es bisher nicht. Grundsätzlich muss zunächst das Potenzial dieser Organismen für solch eine Produktion beurteilt und analysiert werden. Durch den Einsatz von Vektoren zur Überproduktion von Enzymen kann überprüft werden, ob und wie sich der zentrale Kohlenstoffmetabolismus für eine Synthese gewünschter Produkte kanalisieren lässt. Zusätzlich können über die gezielte Deletion von Genen konkurrierende Stoffwechselwege unterbrochen werden, um die Bildung von ungewünschten Nebenprodukten zu vermeiden. Essenziell für diese gentechnischen Modifikationen ist die Fähigkeit des Organismus zur Aufnahme von rekombinanter DNA, sodass die Einbringung von Genen oder die Deletion chromosomaler Bereiche ermöglicht wird.

Die Methode zur markerlosen Deletion erfordert ein Plasmid mit drei Eigenschaften: Zum einen muss es homologe Sequenzen besitzen, welche sich stromauf- und abwärts der zu deletierenden Region befinden. Des Weiteren darf es keine, für den Zielorganismus erkennbaren Startpunkt der Replikation (Origin of Replication, Ori) codieren, sodass die Verdopplung des Plasmids nicht möglich ist. So können nach der ersten Selektion nur Organismen überleben, die nach Aufnahme des Plasmids durch ein initiales homologes Rekombinationsereignis das Plasmid in das Genom integrieren konnten. Zuletzt benötigt es, abgesehen von einer Antibiotikaresistenz-Kassette, einen Gegenselektionsmarker, welcher im Laufe der Deletion zusätzlichen Selektionsdruck für die Entfernung des Plasmids aus dem Genom ausüben kann. Im Gegensatz zu einer Antibiotikaresistenz vermittelt der Gegenselektionsmarker eine Sensibilität gegenüber einer Chemikalie anstatt der Gewährleistung einer

3. Ergebnisse

weiteren Resistenz. Im Rahmen der Gegenselektion wird so der Organismus auf die Abwesenheit des Markers getestet um festzustellen, ob das Suizidplasmid nach einer 2. Homologen Rekombination das Genom des Organismus wieder verlassen hat.

In dieser Arbeit wurde ein System für die markerlose Deletion von Gensequenzen aus dem Genom von *P. vulgaris* entwickelt. Basierend auf dem Genomintegrationsvektor pMM656 wurde ein Suizidplasmid mit homologen Bereichen zu dem Gen einer putativen β -Fructosidase BVU_1663 kloniert. Als Gegenselektionsmarker diente die Levansucrase SacB aus *Bacillus (B.) subtilis*.

3.1.1 Bioinformatische Analyse für die Anwendung von *sacB* in *Bacteroidota*

Im Kontext markerloser Deletionssysteme wird häufig auf SacB aus *B. subtilis* als Gegenselektionsmarker zurückgegriffen. SacB katalysiert die Synthese von Levan durch die initiale Hydrolyse von Saccharose zu Glucose und Fruktose, und der anschließenden Polymerisierung der Fruktose-Reste über eine β -2,6 glykosidische Bindung. Die heterologe Expression von *sacB* führt in vielen Mikroorganismen zu einer Sensibilität gegenüber Saccharose als Kohlenstoffquelle. Der genaue Mechanismus hinter diesem letalen Effekt ist nicht exakt bekannt, jedoch wird vermutet, dass die intrazelluläre Aktivität von SacB zu einer pathologischen Akkumulation von Levan führt, welche den Zellstoffwechsel behindert (Blomfield *et al.*, 1991; Jäger *et al.*, 1992; Pelicic *et al.*, 1996; Wu & Kaiser, 1996).

Für die Evaluation von SacB als Gegenselektionsmarker in *P. vulgaris* wurde mithilfe von Protein-Datenbanken untersucht, ob die Anwendung grundsätzlich möglich ist. Viele Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* sind in der Lage, Levan als Substrat zu verwenden, daher könnten diese Vertreter den letalen Effekt von SacB eventuell umgehen. Ernits *et al.* (2019) konnten in einer Studie das Enzym für die Degradation von Levan in *B. thetaiotaomicron* identifizieren. Das Enzym BT_1760 ist in der äußeren Membran lokalisiert und agiert als Endo-levanase. Durch die Aktivität dieses Enzyms werden die resultierenden Oligomere in das Periplasma transportiert, wo sie über die Fructosidasen BT_1759 und BT_1765 in Fruktose-Monomeren abgebaut werden und schließlich in das Cytoplasma gelangen (Sonnenburg *et al.*, 2010). Mittels Blastp-Analysen konnte gezeigt werden, dass im Genom von *P. vulgaris* kein homologes Gen zu *bt_1760* existiert (Abb. 2). Jedoch konnte mit dem Enzym BVU_1663 eine putative Exo- β -Fructosidase [EC: 3.2.1.80] identifiziert werden, welche eine starke Homologie zu der Hydrolase BT_1759 aufweist. Um die Evaluation der Wirksamkeit von SacB auf Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* auszuweiten, wurde eine umfassende Blast-Analyse durchgeführt (Abb. 2).

3. Ergebnisse

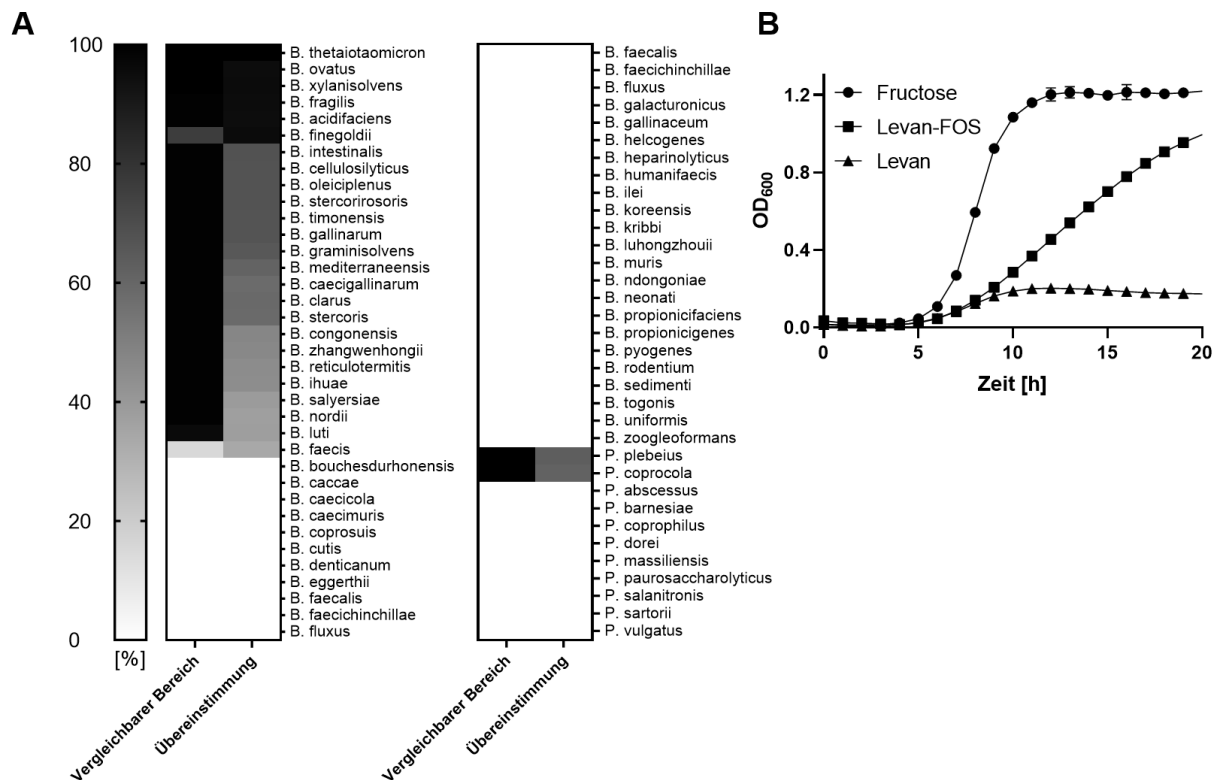


Abbildung 2: Vorkommen von *bt_1760* homologen Genen im Genom verschiedener *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies und Wachstum von *P. vulgatus* DSM 1447 auf Levan und Levan-FOS. [A] Die Daten wurden durch blastp Analysen unter Verwendung der primären Aminosäuresequenz von BT_1760 (Gen-Nummer AAO76867.1) erzeugt. Die Heat-Map zeigt die prozentuale Übereinstimmung in Abhängigkeit eines vergleichbaren Bereichs. [B] Wachstum von *P. vulgatus* in DMM-Medium mit 0,5% Levan und Levan-FOS. 0,5% des Fruktan entsprechen 27 mM in Fruktose-Äquivalenten. Als Positivkontrolle wurden 27 mM Fruktose als Substrat eingesetzt.

In knapp der Hälfte der untersuchten *Bacteroides* Spezies konnten homologe Proteine zu BT_1760 identifiziert werden, darunter auch in zwei *Phocaeicola* Spezies. Die Expression von *sacB* in *B. thetaiotaomicron* und *B. fragilis* führte nicht zu einer Sensibilität gegenüber Saccharose, vermutlich aufgrund der Existenz von BT_1760 und dessen Homolog in *B. fragilis*. Für die weitere Evaluation wurden Wachstumsexperimente mit *P. vulgatus* auf Levan und Levan-FOS durchgeführt um konkret zu überprüfen, ob der Organismus zur Degradation von Fruktan-Polymeren befähigt ist (Abb. 2 B). Die Wachstumsexperimente wurden auf DMM-Medium mit 0,5% Levan, bzw. Levan-FOS als Substrat durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass *P. vulgatus* auf Levan-FOS zwar langsamer als auf Fruktose, aber dennoch hohe eine optische Dichte erreichen konnte. Auf Levan hingegen wurde nur sehr rudimentäre Biomasse-Bildung beobachtet. Anhand dieses Ergebnisses lässt sich die Annahme, dass *P. vulgatus* durch das Enzym BVU_1663 primär FOS, aber kein hoch polymeres Levan degradieren kann, bestärken. Durch das Fehlen eines BT_1760-Homologs könnte das Ausbleiben der Biomasse-Bildung auf Levan erklärt werden. Die geringe Zunahme der optischen Dichte lässt unter anderem durch FOS-Kontaminationen in der verwendeten Levan-Präparation begründen, da durch den verwendeten Herstellungsprozess, kein hoch-reines Polymer erzeugt wird (Pohlentz *et al.*, 2022).

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde angenommen, dass durch die heterologe Expression von *sacB* in Spezies ohne homologe Proteine zu BT_1760, speziell in *P. vulgatus*, eine letale Sensibilität gegenüber Saccharose vermittelt werden kann.

3.1.2 Heterologe Überexpression von *sacB* in *P. vulgatus* mithilfe des Shuttle-Vektors

pG106

Für die Evaluierung von SacB in *P. vulgatus* wurde die Levansucrase zunächst in den Shuttle-Vektor pG106 kloniert und in den Organismus eingebracht. Dieser Vektor besitzt eine Mob-Rep-Region (Abb. 3), welche als OriV für die Plasmidreplikation von Vertretern der Familie *Bacteroidaceae* interpretiert werden kann (Jones *et al.*, 2020). Als Selektionsmarker codiert das Plasmid eine hybride Erythromycin-Resistenzkassette für die Vermittlung der Resistenz in *E. coli* (ErmAM) und in Spezies der Familie *Bacteroidaceae* (ErmF) (Fletcher *et al.*, 1995). In einer Studie von Lück und Deppenmeier (2022) wurde dieser Shuttle-Vektor als geeignetes Werkzeug für eine heterologe Überproduktion von Proteinen eingesetzt. Die Klonierung erfolgte über eine DNA-Assemblierung nach Angaben des Herstellers mit dem NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt am Main, Deutschland). Durch die Verwendung der Primer pg106_SacB_Ass_fw/rev wurde das *sacB*-Gen aus genomischer DNA von *B. subtilis* mit komplementären Enden zum Vektorrückgrat amplifiziert. Für die Generierung des Vektorrückgrats wurden die Primer pg106 LDHnp BB_fwd/rev verwendet. Für die Regulierung des *sacB*-Gens diente der konstitutive Promotor der Lactat Dehydrogenase (*ldh*, *bvu2499*) aus *P. vulgatus* (Lück & Deppenmeier, 2022). Das fertige Konstrukt pG106_Ldhnp_SacB wurde gemäß des Herstellerprotokolls in *E. coli* NEB® 10β transferiert und vervielfältigt. Das aufgereinigte Konstrukt wurde über Elektroporation in *P. vulgatus* eingebracht (Abb. 3). Die korrekte Assemblierung von pG106 konnte durch eine Kolonie-PCR nach Einbringung in *E. coli* 10β bestätigt werden (Abb. 3 B). Für die PCR wurden die Primer pG106 Screening fw/rev verwendet, welche den Integrationsbereich des *sacB*-Gens auf dem Plasmid flankieren. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese konnte ein Fragment der erwartungsgemäßen Größe von 1975 bp detektiert werden. Zusätzlich wurde Nukleotid-Sequenz der Klonierung über Sequenzierung bestätigt. *P. vulgatus* wurde mit dem Konstrukt mittels EP transformiert, wie ebenfalls durch Kolonie-PCR nachgewiesen werden konnte (Abb. 3 C). Nach der Transformation von *P. vulgatus* mit dem Plasmid pG106_Ldhnp_sacB wurde das Wachstumsverhalten des daraus resultierende Stamm *P. vulgatus* pG106 *sacB* auf DMM-Medium mit 20 mM Saccharose als Substrat getestet (Abb. 4).

3. Ergebnisse

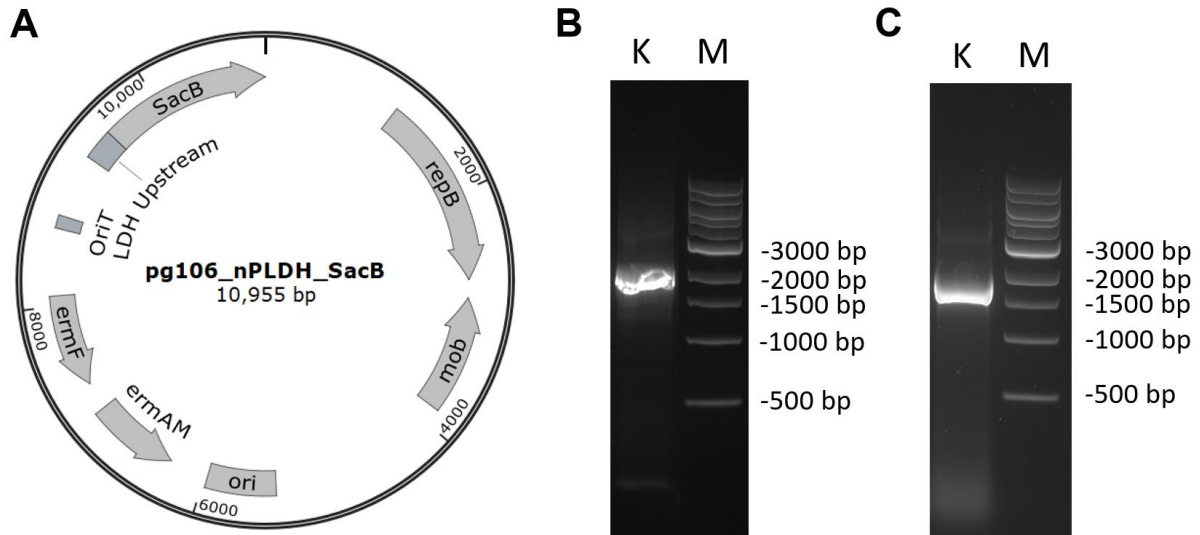


Abbildung 3: Konstruktion des Plasmids pG106_ldhnP_sacB und Transformation in *P. vulgatus*. [A] Plasmidkarte von pG106_ldhnP_sacB. ermF: Erythromycin-Resistenzkassette für *E. coli*; ermAM: Erythromycin-Resistenzkassette für *Bacteroidaceae*-Vertreter; mob: Gene für die Mobilisierung im Rahmen von Konjugationsprozessoren; repB: Gene für die Replikation in *Bacteroidaceae*-Vertretern; oriT: Origin of Transfer. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Konstruktion des Plasmids pG106_ldhnP_sacB. Die Primer pG106 Screening fw/rev flankieren den Integrationsbereich von sacB und wurden für dieses Screening verwendet. Das erhaltene Amplifikat entsprach einer erwartungsgemäßen Größe von 1975 bp. [C] Agarosegel nach Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer pG106 Screening fw/rev zum Nachweis der Aufnahme von pG106_ldhnP_sacB durch *P. vulgatus*. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

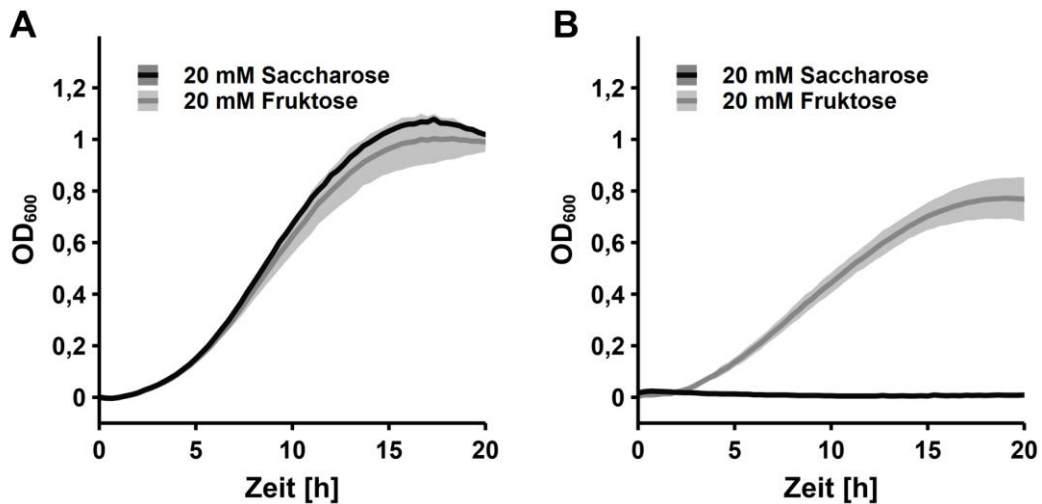


Abbildung 4: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106 sacB auf Saccharose und Fruktose. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei 37°C in einem Plattenlesegerät (Infinite® 200 PRO, Tecan Group, Schweiz) in Triplikaten. Der transparente Bereich um die Datenpunkte repräsentiert die Standardabweichung. Das DMM Saccharose Medium wurde mit 1% [v/v] einer Vorkultur inokuliert. Als Positivkontrolle wurde Fruktose als Kohlenstoffquelle verwendet.

Die Wachstumsexperimente konnten bestätigen, dass eine heterologe Expression von sacB in *P. vulgatus* zu einer letalen Sensibilität gegenüber Saccharose führt. Der Wildtyp-Stamm zeigte in Abhängigkeit des verwendeten Substrats keinen nennenswerten Unterschied im Wachstumsverhalten (Abb. 4 A). Der Plasmid-tragende Stamm hingegen konnte mit Saccharose als Substrat keine

3. Ergebnisse

nachweisbare Biomasse bilden (Abb. 4 B). In einer Studie von Lück & Deppenmeier (2022) wurde gezeigt, dass der Shuttle-Vektor pG106 eine hohe Copy-Number (~30 Kopien) aufweist. Daher musste geprüft werden, ob der letale Effekt von SacB durch die hohe Kopienzahl des *sacB*-Gens begründet war, und ob eine einzelne Kopie des *sacB*-Gens für die Vermittlung eines letalen Effekts ausreichte.

3.1.3 Integration von *sacB* in das Genom von *P. vulgatus* über das pMM656 Vektor-System

Im Rahmen der markerlosen Deletion existiert nach dem ersten homologen Rekombinationsereignis nur eine Kopie des *sacB*-Gens im Genom von *P. vulgatus*. Im folgenden Experiment sollte geprüft werden, ob diese einzelne Kopie für eine SacB-Aktivität ausreicht, um eine Sensibilität gegenüber der Metabolisierung von Saccharose zu erzeugen. Für diese Untersuchungen wurde das System von Mimeo *et al.* (2015) verwendet, das auf dem genomintegrativen Vektor pMM656 basiert und erstmals in *B. thetaiotaomicron* angewendet wurde. Durch die auf dem Plasmid codierende Integrase (IntN2; NBU2 Integrase) kann eine sequenzspezifische Rekombination zwischen der *attN2*-Site auf dem Plasmid und einer der beiden *attN*-Sites im Genom von *P. vulgatus* vermittelt werden, die sich am 3'-Ende der beiden, für tRNA^{Ser} codierenden Gene, befinden (Wang *et al.*, 2000). Für die Vervielfältigung des Vektors codiert pMM656 einen R6K-OriV welcher von einem geeigneten *E. coli* Stamm (z.B. *E. coli* λpir) genutzt werden kann. Da das Plasmid keinen entsprechenden OriV für Bacteroidota-Spezies codiert, handelt es sich bei pMM656 um einen geeigneten Ausgangspunkt für die spätere Klonierung eines Suizidplasmids.

Für die Evaluierung der Saccharose-Sensibilität, vermittelt durch eine einzelne genomischen Kopie des *sacB*-Gens in *P. vulgatus*, wurde dieses Gen in den genomintegrativen Vektor pMM656 kloniert und in den Organismus eingebracht. Die Klonierung erfolgte unter Verwendung des Assembly Master Mix. Durch die Verwendung der Primer LDHnP SacB_fwd/rev wurde das *sacB*-Gen in Kombination mit dem *ldh*-Promotor aus dem bereits erstellten Konstrukt pG106_*ldh*nP_SacB mit komplementären Enden zum pMM656 Vektorrückgrat amplifiziert. Für die Generierung des Vektorrückgrats wurden die Primer pMM656_BB_fw/rev verwendet. Das fertige Konstrukt pMM656_*ldh*nP_SacB wurde über Elektroporation (Kapitel 2.4.12) in *E. coli* λpir eingebracht (Abb. 5). Der Erfolg der Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer pG106 Screening fw/rev überprüft. Diese Primer amplifizieren den Integrationsbereich von *sacB* auf dem Vektor pMM656. Nach einer Agarose-Gelelektrophorese wurde ein Fragment mit der erwarteten Größe von 1975 bp nachgewiesen (Abb. 5 B). Die Integration von pMM656_nP*ldh_sacB* in das Genom von *P. vulgatus* wurde ebenfalls durch den Einsatz der Primer pG106 Screening fw/rev bestätigt (Abb. 5 C)

3. Ergebnisse

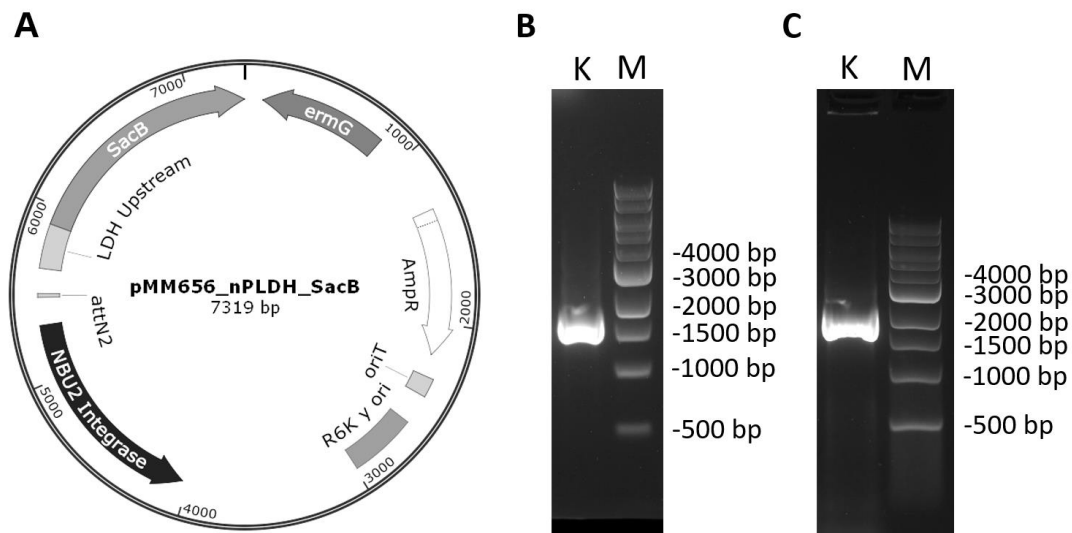


Abbildung 5: Konstruktion des Plasmids pMM656_ldhnP_sacB und Transformation in *P. vulgatus*. [A] Plasmidkarte von pMM656_ldhnP_sacB. ermG: Erythromycin-Resistenzkassette für Erythromycin-Resistenzkassette für Bacteroides/Phocaeicola-spezies; AmpR: Ampicillin-Resistenzkassette; oriT: Origin of Transfer. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Konstruktion des Plasmids pMM656_ldhnP_sacB. Die Primer pMM656 Screening fw/rev flankieren den Integrationsbereich von sacB und wurden für dieses Screening verwendet. Das erhaltene Amplifikat entsprach einer erwartungsgemäßen Größe von 1966 bp. [C] Agarosegel nach Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer pMM656 Screening fw/rev zum Nachweis der Aufnahme von pMM656_ldhnP_sacB durch *P. vulgatus*. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Nach der Transformation von *P. vulgatus* mit dem Plasmid pMM656_ldhnP_sacB wurden erneut Wachstumsexperimente durchgeführt. Für dieses Experiment wurden verschiedene Konzentrationen an Saccharose verwendet (20 mM bis 150 mM) um zu überprüfen, ab welcher Konzentration ein letaler Effekt eintrat (Abb. 6). Abbildung 6 A zeigt das Wachstumsverhalten vom *P. vulgatus* Wildtyp. Es konnte bei einer Saccharose-Konzentration von bis zu 50 mM keine nennenswerte Einschränkung bezüglich der Bildung von Biomasse beobachtet werden. Bei einer Konzentration an Saccharose von ≥ 70 mM nahm die maximal erreichbare optische Dichte sukzessive ab, während die Verdopplungszeit zunahm. Zwar zeigte der Wildtyp auch bei 150 mM Saccharose noch Wachstum, jedoch sank durch den hohen osmotischen Druck die maximal erreichbare optische Dichte auf 0,43, und die Verdopplungszeit erhöhte sich auf 5,75 h. Im Vergleich dazu zeigt Abbildung 6 B das Wachstum von *P. vulgatus* pMM656_ldhnP_sacB. Bereits geringe Saccharose-Konzentrationen von 20 mM führten zu einer Einschränkung der Biomasse-Bildung. Der Organismus erreichte eine maximale OD₆₀₀ von 0,47 mit einer Verdopplungszeit von 5,52 h. Ab einer eingesetzten Saccharose-Konzentration von 100 mM konnte überhaupt kein Wachstum mehr festgestellt werden.

3. Ergebnisse

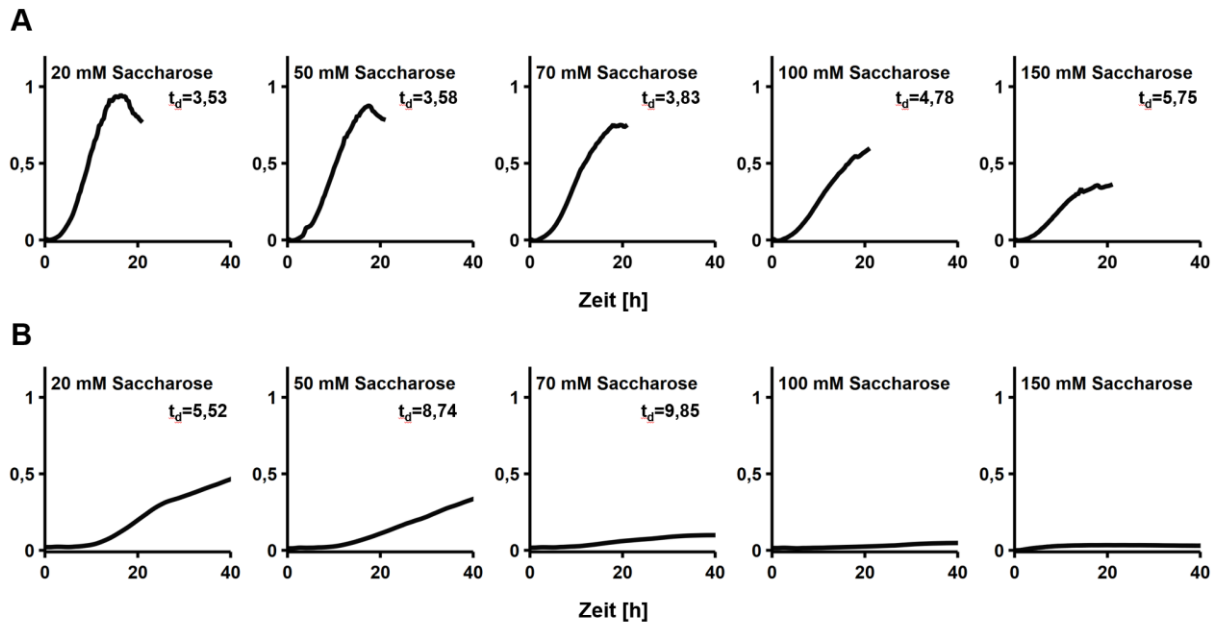


Abbildung 6: Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pMM656_ldhnP_sacB mit verschiedenen Saccharose - Konzentrationen. Die Kultivierung erfolgte in einem Plattenlesegerät (Infinite® 200 PRO, Tecan Group, Schweiz) bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Als Indikator für die Wachstumsgeschwindigkeit ist die Verdopplungszeit (t_d) in Stunden angegeben. [A] Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* Wildtyp mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen. [B] Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* pMM656_ldhnP_sacB mit verschiedenen Saccharose-Konzentrationen.

Dieses Experiment bestätigte, dass bereits eine einzelne genomische Kopie des *sacB*-Gens eine letale Sensibilität gegenüber Saccharose in *P. vulgatus* vermittelt. Jedoch setzte die Sensibilität erst ab einer Saccharose-Konzentration ab 100 mM ein. In der Studie von Lück und Deppenmeier (2022) wurde gezeigt, dass die Kopienzahl des Shuttle-Vektor pG106 in *P. vulgatus* ~ 32 beträgt. Aufgrund dieser hohen Kopienzahl konnte in diesem Experiment auch ein höheres Transkript-Level des *sacB*-Gens erreicht werden, was zu einer höheren Produktionsrate von SacB führte. Somit reichte eine Saccharose-Konzentration von 20 mM bereits aus, um das Wachstum von *P. vulgatus* zu inhibieren. Im Gegensatz dazu stand *P. vulgatus* bei Verwendung des pMM656-Vektors nur eine einzige Kopie des *sacB*-Gens zur Verfügung. Aufgrund des geringeren Transkript-Levels wurde erst bei einer Konzentration von 100 mM eine vollständige Unterdrückung des Wachstums erreicht. Es wurde geschlossen, dass die Vermittlung der Saccharose-Sensibilität in *P. vulgatus* in Abhängigkeit mit der produzierten Menge an SacB stand. Da der Wildtyp von *P. vulgatus* auch auf 150 mM Saccharose zuverlässiges Wachstum zeigte, wurde basierend auf diesen Ergebnissen für die Etablierung des Gegenselektionsmechanismus eine Saccharose-Konzentration von 150 mM festgelegt.

3.1.4 Klonierung eines Knockout-Vektors zur gezielten Deletion von *bvu_1663*

Durch die Bestätigung der Zuverlässigkeit von SacB in *P. vulgatus* konnte im nächsten Schritt die Klonierung eines Deletions-Vektors geplant werden. Als Basis für einen solchen Vektor diente das genomintegrative Plasmid pMM656, da der Transfer dieses Vektors in *P. vulgatus* zuverlässig

3. Ergebnisse

funktioniert. Als initiales Deletionsziel diente das Gen *bvu_1663*, welches für eine putative β -Fructosidase codiert. Durch die Deletion dieses Gens bestand die Möglichkeit, dass *P. vulgatus* die Fähigkeit zum Wachstum auf Levan- und Inulin basierten Fructooligosacchariden (FOS) verlieren könnte. Da der Phänotyp einer solchen Deletionsmutante leicht überprüft werden kann und es sich bei der Deletion dieses Gens um einen minimal-invasiven Eingriff in den Stoffwechsel handelt, wurde es als Deletions-Ziel ausgewählt.

Für die Modifizierung des Vektors pMM656 als Deletions-Vektor wurden Sequenzen, welche für die Integration in das Genom von *P. vulgatus* eine Rolle spielen, gegen die stromaufwärts (Up-Region) und stromabwärts (Down-Region) gelegene Sequenz des Deletionsziels ausgetauscht. Konkret bedeutete dies den Ersatz der NBU2-Integrase sowie der *attn*-Site durch 1000 bp der Up- und Down-Region von *bvu_1663*. Die Amplifizierung der entsprechenden Sequenzen erfolgte durch Verwendung der Primer 656 1663 Upstream fw/rev (Upstream-Sequenz) sowie 656 1663 Downstream fw/rev (Downstream-Sequenz). Das Plasmidrückgrat wurde mittels der Primer pMM656 SacB BB fwd/rev generiert (Kap. 2.2.2). Anschließend erfolgte die Assemblierung der drei Fragmente durch Einsatz eines Assembly Master Mixes. Das daraus resultierende Plasmid wurde fortlaufend als pMM656 Δ 1663 bezeichnet und die korrekte Klonierung wurde mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung bestätigt (Abb. 7).

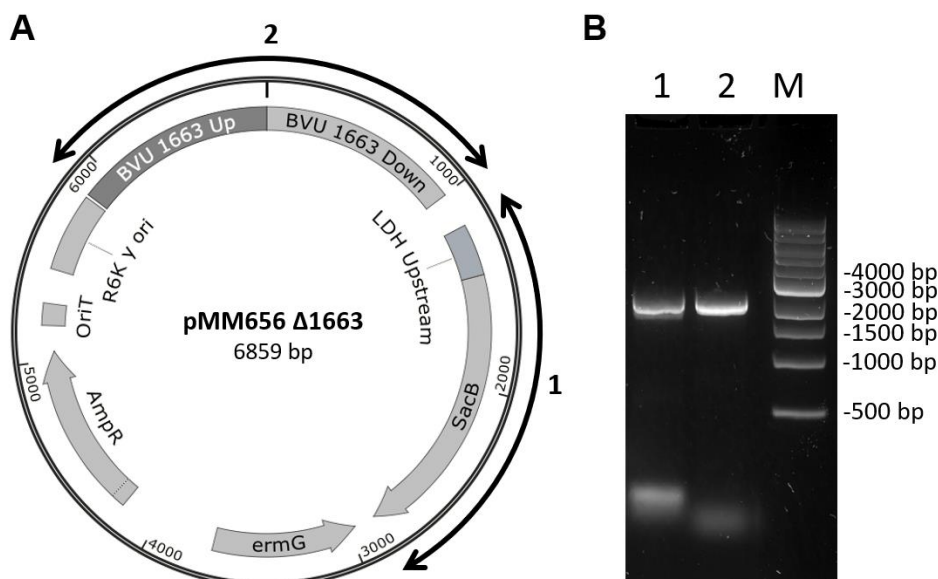


Abbildung 7: Konstruktion des Plasmids pMM656 Δ 1663. [A] Plasmidkarte von pMM656 Δ 1663. Die Doppelpfeile zeigen den amplifizierte Bereich für das gezeigte Agarose-Gelbild. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Konstruktion des Plasmids pMM656 Δ 1663. Lane 1 zeigt das Amplifikat erzeugt durch die Primer pMM656 Screening fw/rev. Diese flankieren den Integrationsbereich von *sacB* und das erhaltene Amplifikat entsprach einer erwartungsgemäßen Größe von 1966 bp. Lane 2 zeigt das Amplifikat für den Nachweis der Up- und Down-Region des Gens *bvu_1663*. Dazu wurden die Primer pMM656_updo_fw/rev verwendet und das erhaltene Amplifikat entsprach mit einer Größe von 2022 bp der Erwartung. M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

3. Ergebnisse

Für die Lagerung und Vervielfältigung des Plasmids wurde das Konstrukt über Elektroporation in *E. coli* β 2155 eingebracht. Dieser *E. coli* Stamm eignet sich besonders für den Transfer rekombinanter DNA über bi-parentale Konjugation. Es handelt sich um einen Diaminopimelinsäure (DAP)-auxotrophen Stamm und ist daher über den Verzicht von DAP im Medium zusammen mit einem Antibiotikum nicht mehr in der Lage, bei der Selektion nach einer Konjugation mit *P. vulgatus* zu wachsen. Unter Verwendung der Primer pMM656 Screening fw/rev konnte nach einer Agarose-Gelelektrophorese die Klonierung von *sacB* über ein Fragment der erwarteten Größe von 1966 bp nachgewiesen werden. Analog dazu führte die Verwendung der Primer pMM656_updo_fw/rev zu einem Fragment der Größe von 2022 bp, welches den korrekten Einbau der Up- und Down-Sequenz von *bvu_1663* bestätigte (Abb. 7 B).

3.1.5 Durchführung der ersten homologen Rekombination

Der Transfer des Deletionsplasmids pMM656 Δ 1663 in *P. vulgatus* erfolgte durch eine biparentale Konjugation mit *E. coli* β 2155 als Donorstamm. Die Selektion nach der ersten homologen Rekombination wurde auf BHI-Agarplatten mit 100 μ g/ml Erythromycin und 200 μ g/ml Gentamycin durchgeführt. Erythromycin diente zur Selektion von *P. vulgatus* Konjuganten, welche das Deletionsplasmid über ein erstes homologes Rekombinationsereignis im Genom integrieren konnten. Da *P. vulgatus* eine natürliche Resistenz gegen das Antibiotikum Gentamycin besitzt wurde dieses zusätzlich als Selektionsfaktor gegen den Donorstamm *E. coli* β 2155 verwendet. In Kombination mit dem Verzicht auf DAP im Regenerationsmedium bestand keine Möglichkeit zur Kontamination der Konjuganten durch überlebende Zellen des Donorstamms. Durch eine Kolonie-PCR wurden Kolonien auf die Anwesenheit des Gegenselektionsmarkers *sacB* überprüft, da dieses nicht natürlicherweise im Genom von *P. vulgatus* codiert ist (Abb. 8 A). In allen Kolonien von *P. vulgatus*, welche sich im Anschluss an die biparentale Konjugation auf dem Selektionsmedium bilden konnten, wurde das *sacB*-Gen mittels Kolonie-PCR nachgewiesen. Unter Verwendung der Primer pMM656 SacB seq fw/rev wurde die Anwesenheit von *sacB* mit einer Größe von 1966 bp in Transkonjuganten, aber nicht im Wildtyp bestätigt (Abb. 8, Lane 3). Für den Nachweis des *bvu_1663*-Gens wurden die Primer inside_BVU_1663_fw/rev verwendet. Sowohl im Wildtyp als auch in Transkonjuganten konnte das Gen über ein Fragment der erwartungsgemäßen Größe von 1851 bp detektiert werden (Abb. 8 A, B, Lane 2).

3. Ergebnisse

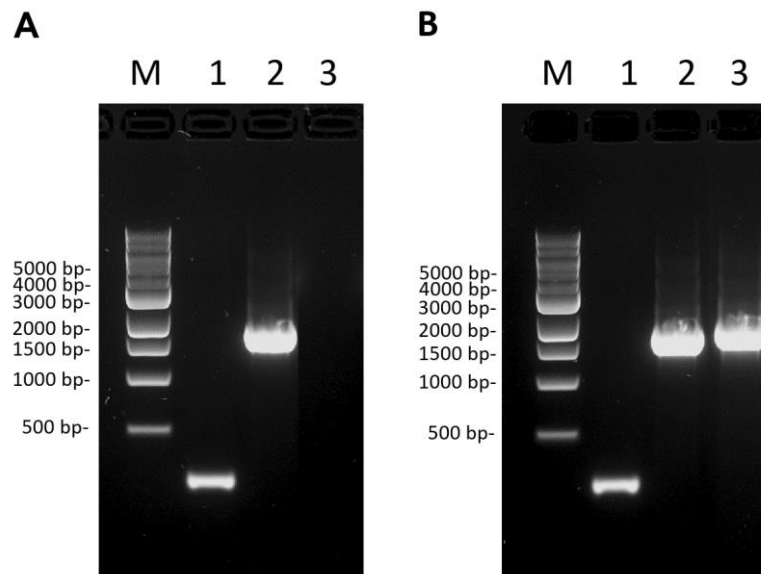


Abbildung 8: Genotyp vom *P. vulgatus* Wildtyp und nach der ersten homologen Rekombination. Agarosegel zum Nachweis des 16S rRNA spezifischen Bereichs von *P. vulgatus* (Lane 1), dem Nachweis von *bvu_1663* (Lane 2) und dem Nachweis von *sacB* (Lane 3). [A] Genotyp vom *P. vulgatus* Wildtyp. [B] Genotyp von *P. vulgatus* nach der ersten homologen Rekombination.

3.1.6 Durchführung der zweiten homologen Rekombination

Nach der Integration des Plasmids pMM656 $\Delta 1663$ in das Genom von *P. vulgatus* über homologe Rekombination wurde anschließend der zweite Rekombinationsschritt initialisiert. Dieser erfolgte durch die Kultivierung in BHI-Flüssigmedium ohne Antibiotikum für 4-6 h. Durch einen mangelnden Selektionsdruck sollte ein weiteres Rekombinationsereignis ermöglicht werden, welches zwischen der Up- oder Down-Region des Plasmids pMM656 $\Delta 1663$ und den korrespondierenden homologen Sequenzen im Genom stattfinden kann. Je nachdem, ob die zweite Rekombination über die Up- bzw. Down-Region erfolgte, entstand durch die Entfernung des Plasmids aus dem Genom entweder der Wildtyp-Genotyp oder eine Deletions-Mutante. Für die eindeutige Identifizierung von Klonen, welche das homologe Rekombinationsereignis durchlaufen haben, wurde eine Gegenselektion durchgeführt. Die potenziellen Mutanten wurden gleichzeitig auf PY-Agar + 150 mM Saccharose, sowie auf PY-Agar + 150 mM Saccharose + 100 $\mu\text{g/ml}$ Erythromycin kultiviert. Klone, welche auf PY + Saccharose wuchsen, aber kein Wachstum auf PY + Saccharose + Erythromycin zeigten, wurden auf ihren Genotyp hin überprüft (Abb. 9 A, B). Nach der zweiten homologen Rekombination konnte die Abwesenheit von *sacB* sowie die Deletion von *bvu_1663* nachgewiesen werden (Abb. 9 B). Die Amplifizierung des Deletionsbereiches im Wildtyp flankierte die Up- und Down-Region sowie das dazwischenliegende Gen *bvu_1663*, und zeigte eine korrekte Größe von 4901 bp (Abb. 9 A, Lane 3). Dieselbe Amplifizierung führte nach der zweiten homologen Rekombination zu einer Reduzierung der Amplifikatgröße auf 2924 bp (Abb. 9 B, Lane 3). Die fehlenden 1977 bp entsprachen exakt der Größe des deletierten Gens *bvu_1663*. Um die Deletion einwandfrei zu bestätigen wurden diese beiden Amplifikate, je vom

3. Ergebnisse

Wildtyp und der Mutante, sequenziert (Abb. 9 C). Die Sequenzierungsdaten bestätigten die Entfernung des Gens *bvu_1663* aus dem Genom von *P. vulgatus* auf die Base genau. Somit konnte eine Deletion des Ziel-Gens sowie die Zuverlässigkeit und Validität dieser markerlosen Deletionsmethode nachgewiesen werden.

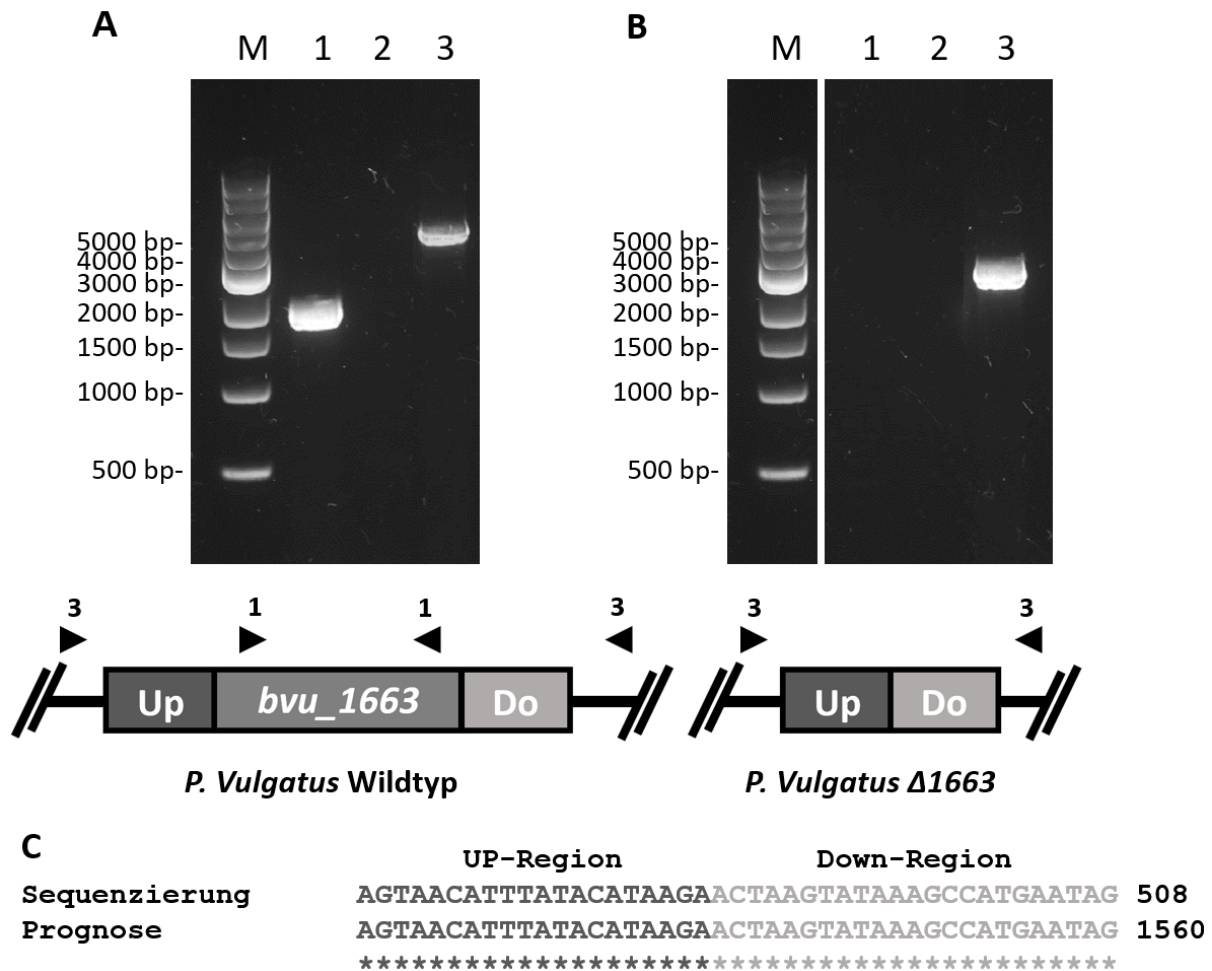


Abbildung 9: Kolonie-PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Deletion von *bvu_1663* in *P. vulgatus*. Agarosegel zum Nachweis von *bvu_1663* (Lane 1), *sacB* (Lane 2) und des Deletionsbereich (Lane 3) in [A] *P. vulgatus* Wildtyp und [B] nach der zweiten homologen Rekombination. Das Amplifikat des Deletionsbereiches betrug im Wildtyp 4901 bp und reduzierte sich nach der zweiten homologen Rekombination um 1977 bp auf 2924 bp. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). [D] Sequenzierung des Deletionsbereiches zur Bestätigung der markerlosen Deletion des Gens *bvu_1663* in der chromosomalen DNA von *P. vulgatus* Δ1663.

3.1.7 Phänotyp-Analyse und Komplementierung von *P. vulgatus* Δ1663

Nachdem der Genotyp der Deletionsmutante *P. vulgatus* Δ1663 bestätigt wurde, sollte im Folgenden der potenzielle Phänotyp charakterisiert werden. Da es sich bei *bvu_1663* um eine annotierte β-Fructosidase handelte wurde angenommen, dass die Deletionsmutante Levan- und Inulin-basierte FOS nicht mehr abbauen kann. Für die Analyse des postulierten Phänotyps wurden Wachstumsexperimente mit Levan- und Inulin-FOS durchgeführt. Bei Inulin sowie Levan handelt es sich um ein Polymer aus Fruktose-Resten, welche einen Polymerisierungsgrad von 600 bis mehreren

3. Ergebnisse

1000 Einheiten besitzen können. Inulin unterscheidet sich mit β -2,1 glykosidischen Bindungen zwischen den Fruktose-Monomeren von den β -2,6 Verknüpfungen in Levan. Die Wachstumsexperimente wurden in DMM-Medium mit 0,5 % Levan, Inulin sowie Levan-FOS und Inulin-FOS als Substrat durchgeführt. Die eingesetzten 0,5 % entsprachen einer Konzentration von 27 mM an Fruktose-Äquivalenten (Abb. 10).

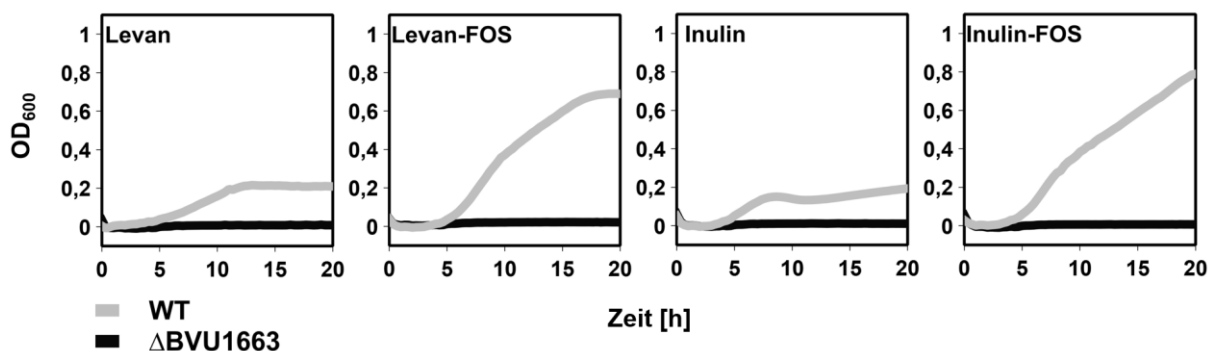


Abbildung 10: Wachstum *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* Δ 1663 auf Levan, Inulin sowie deren korrespondierenden FOS. Die Kultivierung wurde bei 37 °C für 24 h in DMM-Medium mit 0,5 % Levan, Levan-FOS, Inulin und Inulin-FOS durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenlesegerät (Tecan Infinite M200 plate reader (Tecan Group AG, Männedorf, Switzerland)) unter anaeroben Bedingungen.

Der Vergleich des Wachstumsverhalten zwischen *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* Δ 1663 bestätigte den erwarteten Phänotypen. Durch die Aktivität von BVU_1663 zeigte der *P. vulgatus* Wildtyp sowohl auf Levan-FOS sowie Inulin-FOS solides Wachstum. Bei Wachstum auf polymerem Levan und Inulin hingegen erreichte der Wildtyp nur eine sehr geringe optische Dichte. Während die Hydrolyse von niedermolekularen FOS für das Wachstum ausreichte, arbeitete das Enzym vermutlich eher ineffizient mit langkettigen Polymeren, wodurch das Wachstum beeinträchtigt wurde. Darüber hinaus handelte es sich bei den hier verwendeten Levan und Inulin nicht um ein hoch-reines Polymer, sondern um zum kleinen Teil durch FOS kontaminierte Präparate. Diese Verunreinigungen konnten durch *P. vulgatus* verwertet werden. Im Vergleich zum Wildtyp zeigte die Deletionsmutante keine Biomassebildung, unabhängig vom eingesetzten Substrat.

Als Gegenkontrolle wurde das Gen *bvu_1663* auf den Shuttle-Vektor pG106 kloniert und in die Deletionsmutante *P. vulgatus* Δ 1663 eingebracht um zu überprüfen, ob durch die homologe Expression von *bvu_1663* in der Deletionsmutante der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden konnte. Die Klonierung erfolgte mittels DNA Assembly Master Mix. Durch die Verwendung der Primer pG106_1663_fwd/rev wurde das *bvu_1663*-Gen aus genomischer DNA von *P. vulgatus* komplementären Enden zum Vektorrückgrat amplifiziert, und über den Einsatz der Primer pG106_BB_fw/rev wurde das Vektorrückgrat synthetisiert. Das fertige Konstrukt pG106_1663 wurde über Hitzeschock-Transformation in *E. coli* NEB® 10 β transferiert und vervielfältigt (Abb. 11 B). Das aufgereinigte Plasmid wurde zur Erstellung des Komplementationsstamms *P. vulgatus* Δ 1663::1663

3. Ergebnisse

über Elektroporation in die Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 1663$ eingebracht. (Abb. 11 C). Der Nachweis für die korrekte Klonierung sowie der Transformation des Konstrukts in *P. vulgatus* erfolgte über die Amplifikation des *bvu_1663*-Gens unter Verwendung der Primer pG106 Screening fw/rev, welche zu der Bildung eines Amplifikats der erwarteten Größe von 2100 bp führte.

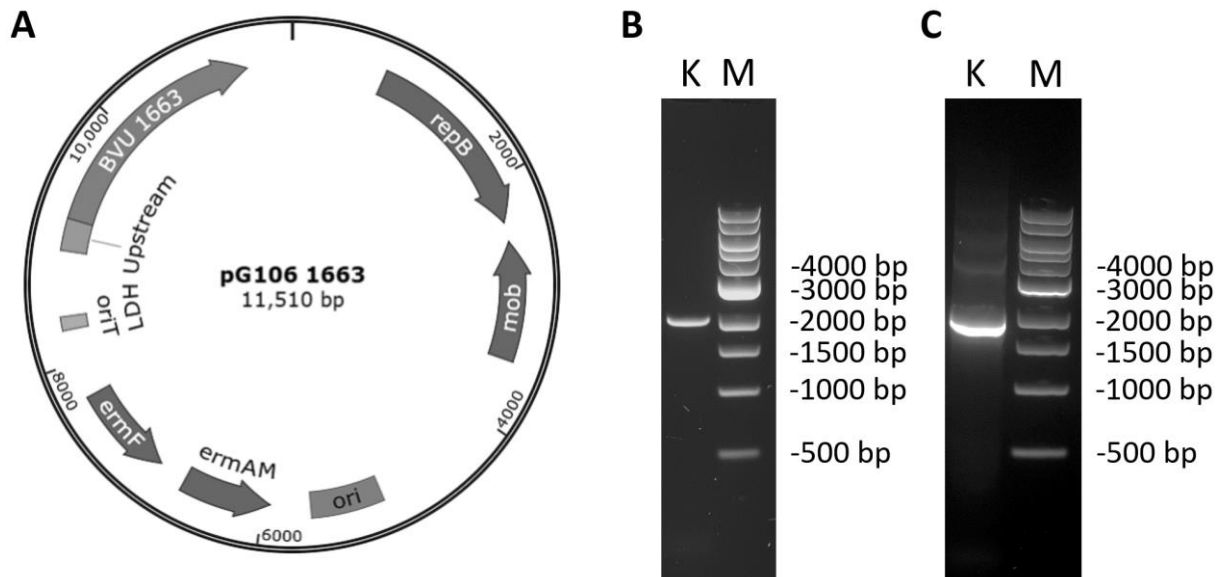


Abbildung 11: Konstruktion des Plasmids pG106 1663 und Wachstumsexperimente von *P. vulgatus* Wildtyp, $\Delta 1663$ und $\Delta 1663::1663$. [A] Plasmidkarte von pG106 1663. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Klonierung des Plasmids pG106 1663. Die verwendeten Primer pG106 Screening fw/rev flankieren den Integrationsbereich von *bvu_1663* und wurden für dieses Screening verwendet. Die PCR führte zu der Bildung eines Fragments der erwartungsgemäßen Größe von 2100 bp. [C] Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme von pG106_1663 durch *P. vulgatus*. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Erwartungsgemäß konnte in der Komplementierungsmutante *P. vulgatus* $\Delta 1663::1663$ die Fähigkeit, Levan- und Inulin-FOS zu metabolisieren, wiederhergestellt werden (Abb. 12). Quantitativ betrachtet zeigte der komplementierte Stamm jedoch langsames Wachstum im Vergleich zum Wildtyp. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass BVU_1663 in *P. vulgatus* alleine für die Verwertung von FOS verantwortlich ist, wie durch die Deletion von *bvu_1663* und das damit verbundene eingeschränkte Wachstum der Mutante gezeigt werden konnte. Außerdem wurde beobachtet, dass *P. vulgatus* polymeres Levan und Inulin nicht verstoffwechseln kann. Für die Analyse dieser Phänomene wurde in Folgeexperimenten das Enzym BVU_1663 näher untersucht.

3. Ergebnisse

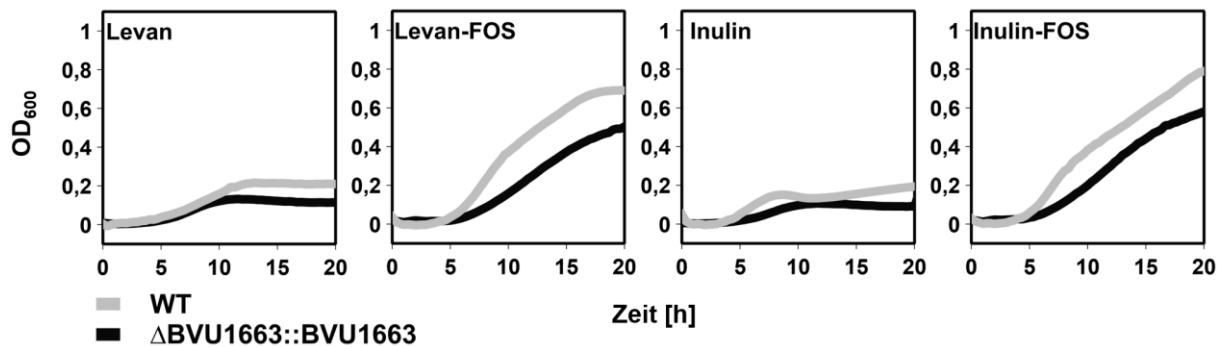


Abbildung 12: Wachstum *P. vulgatus* Wildtyp und Komplementierungsstamm *P. vulgatus* $\Delta 1663::1663$ auf Levant, Inulin sowie deren korrespondierenden FOS. Die Kultivierung wurde bei 37 °C für 24 h in DMM-Medium mit 0,5 % Levant, Levant-FOS, Inulin und Inulin-FOS durchgeführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte in einem Plattenlesegerät unter anaeroben Bedingungen.

3.1.8 Deletion von *bvu_1663* mit dem *upp*-Gegenselektionssystem

Die hier etablierte Methode zur markerlosen Gen-Deletion in *P. vulgatus* unter Verwendung von SacB als Gegenselektionsmarker wurde im Rahmen der Dissertation von Rebecca Lück (Lück, 2023) angewendet, um für die Entwicklung einer weiteren Gegenselektions-Methode einen mutierten *P. vulgatus* Stamm zu erstellen. Neben dem SacB-Gegenselektionsmarker wird häufig auch das sogenannte *upp*-Selektionssystem angewendet. Das allgemeine Prinzip des *upp*-Systems besteht in der enzymatischen Umwandlung von Fluor-haltigen Purin- oder Pyrimidin-Analoga (z.B. 5-Fluorouracil (5-FU)) durch Phosphoribosyltransferasen, die für die Zelle toxisch sind, da die Verstoffwechselung dieser Antimetabolite letztendlich zur Hemmung der lebensnotwendigen Thymidilat-Synthase führt. Dieses Enzym ist verantwortlich für die Bildung von Desoxythmidinmonophosphat (dTMP), und damit unverzichtbar für die DNA-Synthese. Organismen, welche keine Enzyme für die Metabolisierung von Fluor-haltigen Purin- oder Pyrimidin-Analoga besitzen, sind gegenüber diesen resistent (Kostner *et al.*, 2013). *P. vulgatus* besitzt zwei Gene, welche 5-FU in den Pyrimidin-Stoffwechsel einschleusen können: Eine Uridin-Phosphorylase (*bvu_3649*) und eine Uridin Kinase (*bvu_0984*). Die Arbeit von Rebecca Lück (2023) beschäftigte sich mit der Deletion der beiden Gene *bvu_3649* und *bvu_0984*. Aus dieser Arbeit resultierte die Doppeldeletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 3649 \Delta 0984$, welche resistent gegen 5-FU ist. Für die Deletion von weiteren Genen in dieser Doppelmutante konnten, analog zu der Methode mit SacB, die beiden Gene *bvu_3649* und *bvu_0984* als Gegenselektionsmarker verwendet werden, da diese eine 5-FU Sensibilität vermitteln. Wenn diese beiden Gene im Rahmen einer Rekombination im Genom der Doppelmutante integriert werden, so wird die toxische Wirkung von 5-FU auf *P. vulgatus* wiederhergestellt. Um das Potenzial der 5-FU- und Saccharose-Gegenselektion zu vergleichen wurde das Gen *bvu_1663* erneut unter Verwendung des *upp*-Systems deletiert. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Deletionsvektor pMM656 $\Delta 1663$ durch Klonierung angepasst, indem das *sacB*-Gen durch die beiden Gene *bvu_3649* und *bvu_0984* ersetzt wurde. Für die Konstruktion des Deletionsvektor wurden die Gene *bvu_3649* und *bvu_0984* aus der genomischen DNA von *P. vulgatus* amplifiziert.

3. Ergebnisse

Damit beide Gene auf dem Deletionsvektor unter der Kontrolle des *ldh*-Promotors stehen konnten, wurde die Klonierung in zwei Schritten durchgeführt. Initial wurde *sacB* auf dem Konstrukt pMM656 $\Delta 1663$ durch *bvu_0984* ausgetauscht. In einem zweiten Schritt wurde *bvu_0984*, gemeinsam mit dem *ldh*-Promotor, aus dem resultierenden Konstrukt amplifiziert, und erneut zusammen mit dem Gen *bvu_3649* in den Vektor eingebracht (Abb. 13 A, B). Für die Lagerung und Vervielfältigung des Plasmids wurde das fertige Konstrukt pMM656 $\Delta 1663$ *upp* über Elektroporation in *E. coli* $\beta 2155$ eingebracht (Abb. 13 C).

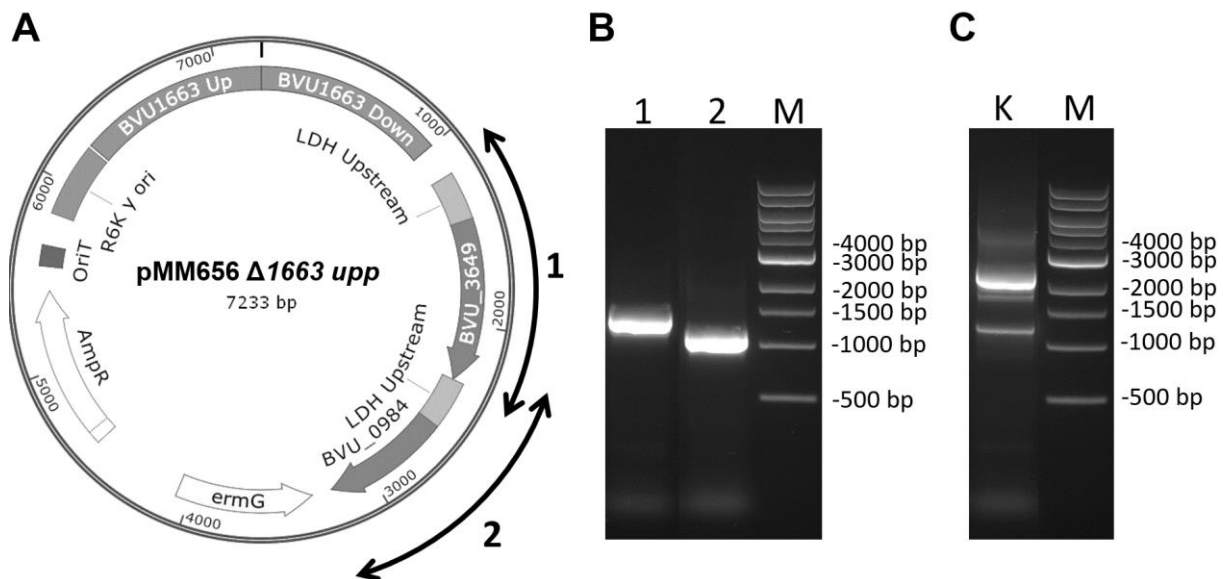


Abbildung 13: Konstruktion des Deletionsplasmids pMM656 $\Delta 1663$ *upp* und Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und $\Delta 0984$ $\Delta 3649$ $\Delta 1663$ auf Levan- und Inulin-FOS. [A] Plasmidkarte von pMM656 $\Delta 1663$ *upp*. Die Doppelpfeile zeigen den amplifizierte Bereich für das gezeigte Agarose-Gelbild [B]. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Konstruktion des Plasmids pMM656 $\Delta 1663$. Lane 1 zeigt das Amplifikat erzeugt durch die Primer pMM656 3649 Screening fw/rev. Diese flankieren den Integrationsbereich von *bvu_3649* und das erhaltene Amplifikat entsprach einer erwartungsgemäßen Größe von 1236 bp. Lane 2 zeigt das Amplifikat für den Nachweis des Gens *bvu_0984*. Dazu wurden die Primer pMM656 0984 Screening fw/rev verwendet, und das erhaltene Amplifikat entsprach mit einer Größe von 1004 bp der Erwartung. [C] Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme von pMM656 $\Delta 1663$ *upp* durch *P. vulgatus*. Die verwendeten Primer pMM656_3649_0984_screening_fw/rev flankieren die Integrationsstelle beider Gene, sodass ein Amplifikat der erwartungsgemäßen Größe von 2340 bp detektiert werden konnte. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Nach Einbringung des Konstrukts pMM656 $\Delta 1663$ *upp* in *E. coli* $\beta 2155$ wurde für die Überprüfung der korrekten Klonierung das Primer-Paar pMM656_3649_0984_screening_fw/rev verwendet, um die Integration der beiden Gene *bvu_3649* und *bvu_0984* zu bestätigen. Das erhaltene Fragment nach der Screening PCR entsprach einer erwartungsgemäßen Größe von 2340 bp. Das Agarose-Gelbild zeigte neben dem Fragment der berechneten Größe noch weitere, schwächere Banden. Durch eine anschließende Sequenzierung konnte jedoch einwandfrei die korrekte Klonierung des Plasmids bestätigt werden. Über Konjugation wurde das pMM656 $\Delta 1663$ *upp* Deletionsplasmid aus *E. coli* $\beta 2155$ in die Doppeldeletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 3649$ $\Delta 0984$ eingebracht. Nach den homologen

3. Ergebnisse

Rekombinationsereignissen und der Gegenselektion mit 5-FU konnte die Deletion von *bvu_1663* über Kolonie-PCR bestätigt werden (Abb. 14).

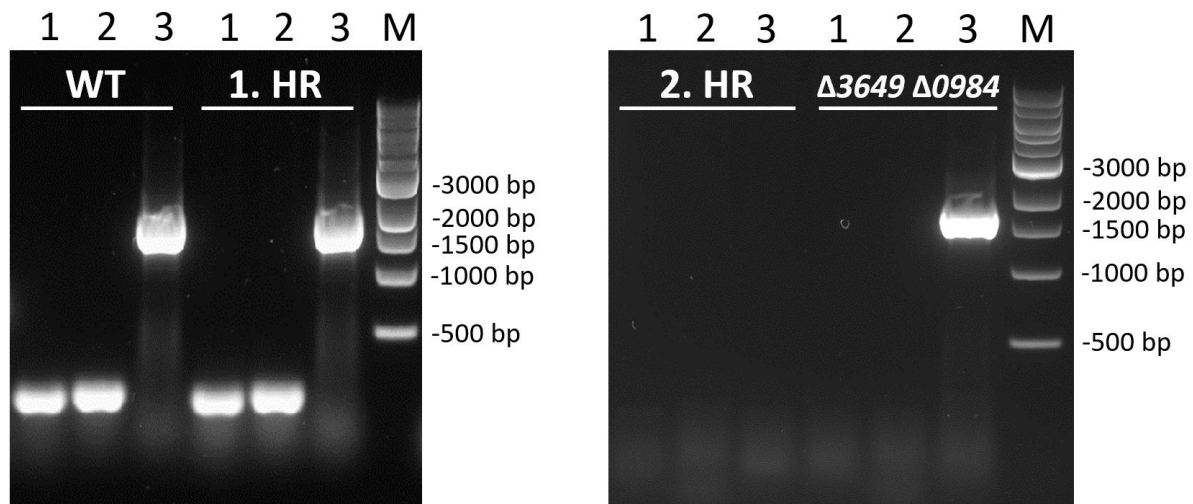


Abbildung 14: Deletion von *bvu_1663* mittels des *upp*-Systems. Agarosegel zum Nachweis von *bvu_0984* (Lane 1), *bvu_3649* (Lane 2) und *bvu_1663* (Lane 3). Der Nachweis erfolgte in *P. vulgatus* Wildtyp (WT), und der Doppelmutante *P. vulgatus* $\Delta 0984 \Delta 3649$ nach der ersten homologen Rekombination (1. HR) und nach der 2. Homologen Rekombination (2. HR). Als Kontrolle wurde die unbehandelte Doppelmutante *vulgatus* $\Delta 0984 \Delta 3649$ verwendet. Für den Nachweis von *bvu_0984* und *bvu_3649* wurden die Primer qPCR_0984 fw/rev (250 bp) und qPCR_3649 fw/rev (268 bp) eingesetzt. Der Nachweis von *bvu_1663* erfolgte über die Verwendung der Primer inside_BVU_1663_fw/rev, und führte zu einem Amplifikat der Größe 1851 bp. M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Die drei Gene *bvu_0984*, *bvu_3649* und *bvu_1663* konnten alle in *P. vulgatus* Wildtyp (WT) nachgewiesen werden. Aufgrund der Deletion von *bvu_0984* und *bvu_3649* konnte in der Doppelmutante *P. vulgatus* $\Delta 3649 \Delta 0984$ nur *bvu_1663* nachgewiesen werden. Nach der ersten homologen Rekombination (1. HR) von *P. vulgatus* $\Delta 3649 \Delta 0984$ mit dem Deletionsvektor pMM656 $\Delta 1663 upp$, welcher die beiden Gene *bvu_0984* und *bvu_3649* als Gegenselektionsmarker codierte, konnten alle drei Gene nachgewiesen werden. Anschließend wurde der Deletionsvektor zusammen mit *bvu_1663* in der zweiten homologen Rekombination (2. HR) wieder aus dem Genom entfernt, was zur Entstehung der dreifachen Deletionsmutante $\Delta 3649 \Delta 0984 \Delta 1663$ führte. Die Deletionsmutante wurde dementsprechend über die Abwesenheit der drei Gene im Genom von *P. vulgatus* bestätigt.

Für Überprüfung des Phänotyps wurden analog zu Kapitel (3.2.7) erneut Wachstumsexperimente auf DMM- Medium mit 0,5% Levan-FOS (Abb. 15 A) und 0,5% Inulin-FOS (Abb. 15 B) durchgeführt, wobei die Deletionsmutante mit dem Wildtyp verglichen wurde. Da die Deletionsmutante keine nachweisbare Biomasse auf den FOS-Substraten bildete konnte erneut gezeigt werden, dass die Deletion von *bvu_1663* zu einem Verlust der Fähigkeit für die Verwertung von FOS führt.

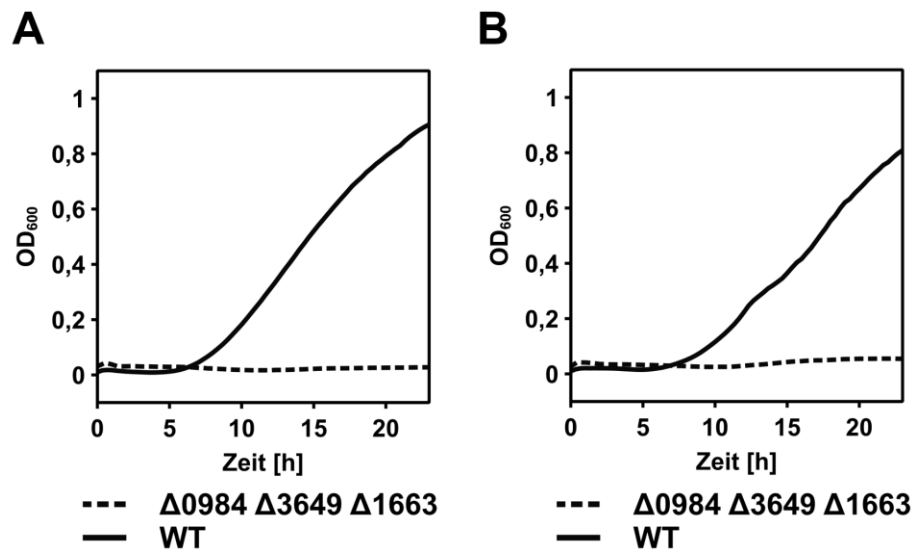


Abbildung 15: Untersuchung des Phänotyps von *P. vulgatus* $\Delta 0984 \Delta 3649 \Delta 1663$. Wachstum von *P. vulgatus* Wildtyp und Dreifach-Deletions-Mutante *P. vulgatus* $\Delta 0984 \Delta 3649 \Delta 1663$ in DMM-Medium mit 0,5 % Levan-FOS [A] und Inulin-FOS [B] bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C.

Im Rahmen der Entwicklung eines markerlosen Deletionssystems für *P. vulgatus* wurde die Levansucrase SacB als potenter Gegenselektionsmarker für die Deletion des Gens *bvu_1663* eingesetzt. Durch die zusätzliche Deletion von *bvu_0984* und *bvu_3649* wurde es möglich, eine weitere Gegenselektion mit 5-FU zu etablieren. Die Zuverlässigkeit dieses Gegenselektionsmarkers wurde bestätigt, indem das Gen *bvu_1663* erneut deletiert wurde.

3.1.9 Charakterisierung von BVU 1663

Die in Kapitel 3.1.1 durchgeführten Wachstumsexperimente mit dem *P. vulgatus* Wildtyp haben gezeigt, dass dieser Organismus nicht in der Lage ist, polymeres Levan oder Inulin abzubauen (Abb. 2 B). Um Klarheit über die Aktivität des Enzyms BVU_1663, die Art und Weise des Abbaus von Fruktan-Polymeren/Oligomeren und das Substratspektrum zu erlangen, bedurfte es einer genaueren Charakterisierung der β -Fructosidase BVU_1663. Außerdem sollte untersucht werden, in welcher Zellstruktur das Enzym lokalisiert ist.

3.1.9.1 Heterologe Überproduktion und Aufreinigung von BVU 1663

Für eine nähere Charakterisierung des Enzyms BVU_1663 wurde das respektive Gen *bvu_1663* in den Überexpressionsvektor pASK IBA 3 (IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland) kloniert. Das Gen *bvu_1663* wurde mit den Primern pASK3_1663_fw/rev aus dem Genom von *P. vulgatus* amplifiziert. Über die Primersequenzen wurde dem Amplifikat eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bsal stromaufwärts und stromabwärts der codierenden Region zugefügt. Durch Aufreinigung der Amplifikate und des pASK3 Vektors sowie nachfolgender Verdauung mit dem Restriktionsenzym Bsal wurde durch Ligation das Konstrukt pASK3_BVU_1663 erzeugt (Abb. 16 A).

3. Ergebnisse

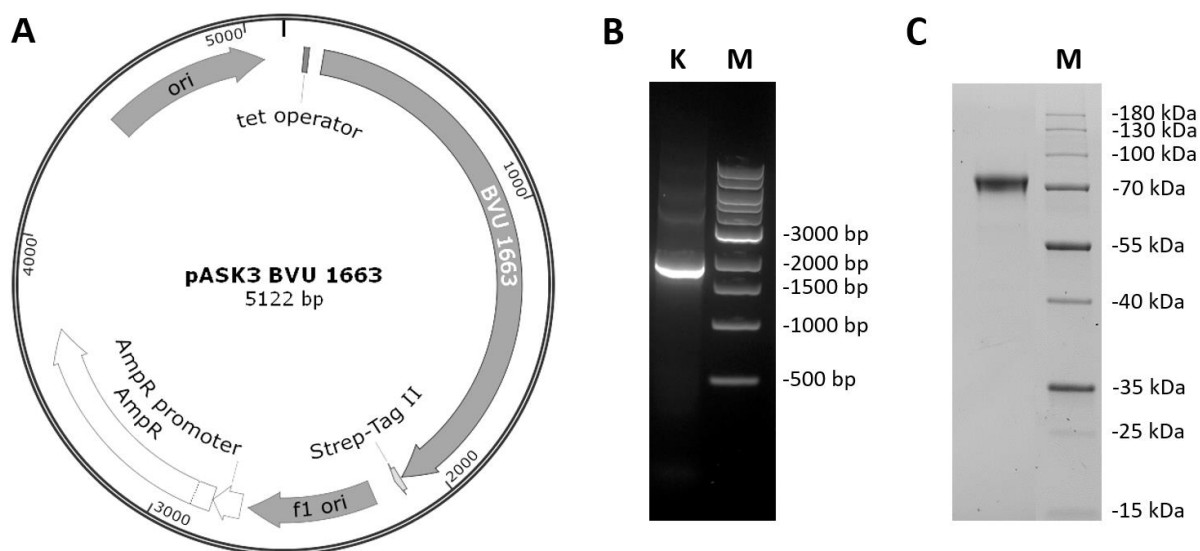


Abbildung 16: Konstruktion des Vektors pASK3_BVU_1663 und SDS-Page Analyse von BVU_1663. [A] Plasmidkarte des Konstrukts pASK3_BVU_1663 für die heterologe Überproduktion in *E. coli* DH5 α . [B] Kolonie-PCR zum Nachweis des Konstrukts pASK3_BVU_1663 in *E. coli* DH5 α . Die Amplifizierung führte zu einem Fragment mit der erwarteten Größe von 2165 bp. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). [C] Silberfärbung des aufgereinigten Protein BVU_1663. Die SDS-PAGE Analyse ergab eine einzige Bande mit der erwarteten Größe von 76 kDa. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Das ligierte Konstrukt wurde über Hitzeschock-Transformation in *E. coli* DH5 α eingebracht und die korrekte Klonierung konnte mittels einer Kolonie-PCR bestätigt werden. Die Verwendung der Primer pASK_for und pASK_rev (Kap. 2.2.2) führte zur Erzeugung eines Fragments mit einer erwartungsgemäßen Größe von 2165 bp (Abb. 16 B).

Durch die Fusion eines C-terminalen Strep-Tags, welches auf dem pASK3 Vektor stromaufwärts vor dem inserierten Gen *bvu_1663* codiert, wurde das heterolog produzierte Protein über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anhand der Proteinquantifizierung nach Bradford (Bradford, 1976) ergab sich eine Proteinausbeute von 43 mg/l Kultur in den Elutionsfraktionen. Um die Produktion sowie die Reinheit des Enzyms zu bestätigen, wurde das aufgereinigte Protein mittels SDS-Page und Silberfärbung analysiert (Abb. 16 C). Es konnte eine einzelne Bande mit einer Größe von etwa 76 kDa detektiert werden, was der berechneten Größe der β -Fructosidase in Kombination mit dem Strep-Tag entsprach. Zusätzlich wurde durch die Silberfärbung die Reinheit des Proteins bestätigt, da keine Verunreinigungen erkennbar waren.

3.1.9.2 Abbau von Levan- und Inulin-FOS durch BVU_1663

P. vulgatus zeigte in Wachstumsexperimenten auf polymerem Levan und Inulin nur eine sehr geringe Biomassebildung, während dem Organismus auf den korrespondierenden FOS Wachstum ohne auffällige Einschränkungen möglich war. Daher wurde zunächst die Hydrolyse von Levan und Inulin durch das Enzym BVU_1663 analysiert. Durch den Abbau von Fruktan-Oligomeren und Polymeren mit

3. Ergebnisse

aufgereinigtem Enzym werden Fruktose-Monomere freigesetzt, welche über HPLC-Analysen quantifiziert werden können. Über die Rate der Freisetzung von Fruktose konnte die Aktivität von BVU_1663 abgeleitet werden.

Um die Charakteristika des Abbaus von Levan- und Inulin-FOS durch BVU_1663 zu untersuchen, wurden Enzym-Assays mit aufgereinigtem Enzym und FOS als Substrat durchgeführt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dem Assay eine Probe entnommen und mittels HPLC analysiert und quantifiziert (Abb. 17).

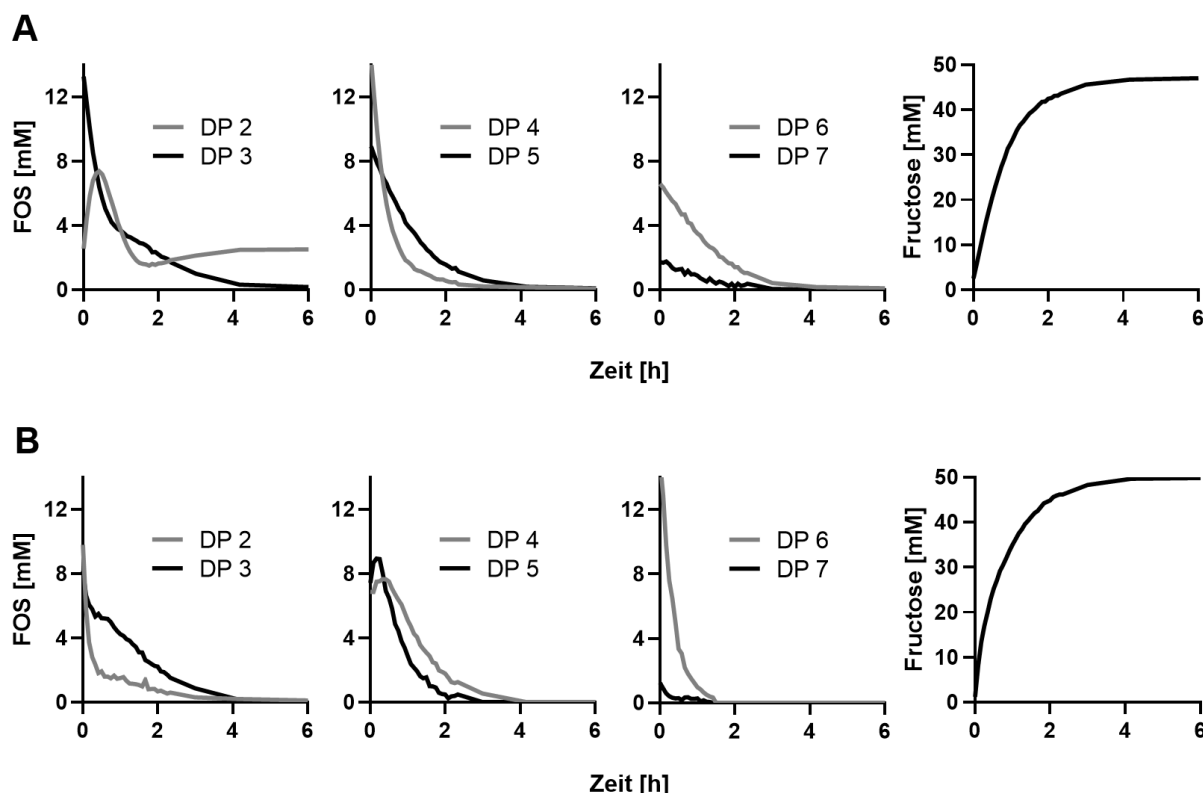


Abbildung 17: Hydrolyse von Inulin- und Levan-FOS durch die β -Fructosidase BVU_1663. Der Reaktionsansatz enthält Kaliumphosphat-Puffer (40 mM, pH 7,6), 50 mM der respektiven FOS (Konzentration angegeben in Fruktose-Äquivalenten) und 5 μ g des Proteins BVU_1663. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. Zur besseren Übersicht ist die Fruktose-Freisetzung als separater Graph angegeben. [A] Abbau von Inulin-FOS. [B] Abbau von Levan-FOS. DP: Grad der Polymerisation.

Die Levan- und Inulin-FOS Präparationen setzten sich aus unterschiedlichen Konzentrationen an FOS mit einem Polymerisierungsgrad von DP2-7 (DP, Degree of Polymerization) zusammen. Abbildung 17 zeigt die Freisetzung von Fruktose durch den Abbau von Inulin-FOS (A) und durch den Abbau von Levan-FOS (B). Es konnte gezeigt werden, dass BVU_1663 in der Lage ist, FOS-Moleküle mit einem DP von bis zu 7 zu hydrolysieren. Eine Besonderheit zeichnete sich bei dem Abbau von Inulin-DP2 ab: Während Moleküle mit einem DP von 3-7 sukzessive abgebaut wurden, stieg die Konzentration von DP2-Molekülen kurzfristig von anfänglichen 2,5 mM auf 7 mM an. Diese Besonderheit wurde bei der Hydrolyse von Levan-FOS noch einmal deutlicher. Im Laufe des Abbaus der FOS stiegen hier ebenfalls

3. Ergebnisse

die Konzentrationen von Molekülen mit einem DP von 4 und 5 zunächst an, bevor die Konzentration sank. Daraus geht hervor, dass es sich bei BVU_1663 um eine Exo-Fructosidase handeln muss, welche FOS durch die Hydrolyse von endständigen Fructose-Monomeren abbaut. Aus diesem Grund stiegen vereinzelt die Konzentration von Molekülen bestimmter Polymerisierungsgrade, da durch die Hydrolyse der endständigen Fructosyl-Reste Moleküle des nächstkleineren Polymerisierungsgrad entstanden. Weiterhin konnte durch die konstante Freisetzung von Fructose eine Endo-Fructosidase-Aktivität ausgeschlossen werden.

Um zu überprüfen, ob die Stöchiometrie bezüglich der Konzentrationen der Fructose-Äquivalente mit der Hydrolyse von Levan-FOS und Inulin-FOS übereinstimmte, wurden im Laufe der Hydrolyse von Inulin-FOS und Levan-FOS nach 0, 1, 2, 3 und 23 Stunden die Fragmente, aufgetrennt nach Polymerisierungsgrad, quantifiziert. Die Konzentration aller Moleküle wurde in Fructose-Äquivalente (mM) umgerechnet, um die Summe an Fructose-Äquivalenten im Reaktions-Ansatz zu bestimmen (Tab. 27).

Tabelle 27: Stöchiometrie der freigesetzten Fructose-Moleküle während der Hydrolyse von Inulin-FOS und Levan-FOS durch BVU_1663. Die Konzentration der Moleküle ist angegeben in mM Fructose-Äquivalenten nach 0, 1, 2, 3 und 23 Stunden Reaktionszeit.

Inulin-FOS

Zeit [h]	0	1	2	3	23
Fructose	2,6	34,16	43,32	45,23	48,3
DP2	2,56	3,38	1,65	2,21	2,66
DP3	12,51	3,65	2,09	0,88	0
DP4	14,48	1,71	0,49	0,19	0
DP5	9,13	3,97	1,44	0,55	0
DP6	6,9	3,69	1,29	0,3	0
DP7	1,79	1,05	0,25	0,11	0
Summe in Fructose-Äquivalenten	49,97	51,61	50,52	49,48	50,95

Levan-FOS

Zeit [h]	0	1	2	3	23
Fructose	1,09	34,25	43,85	46,94	49,1
DP2	10,22	1,58	0,58	0,32	0
DP3	7,67	4,25	2,2	0,73	0
DP4	7,44	5,07	1,69	0,29	0
DP5	7	2,83	0,26	0	0
DP6	15,32	0,7	0	0	0
DP7	1,73	0,31	0	0	0
Summe in Fructose-Äquivalenten	50,48	49	48,58	48,27	49,1

Die Ausgangskonzentration von Inulin-FOS und Levan-FOS im Reaktionsansatz betrug 50 mM Fructose-Äquivalente. Durch die Beobachtung der Stöchiometrie konnte gezeigt werden, dass zu jedem Zeitpunkt des Reaktions-Ansatzes knapp 50 mM der Fructose-Äquivalente nachzuweisen waren.

3. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob und wie BVU_1663 zur Hydrolyse von Levan oder Inulin befähigt ist wurden Enzym-Assays mit 50 mM polymerem Levan und Inulin durchgeführt (Abb. 18 A, B). Dabei konnte beobachtet werden, dass eine Freisetzung von Fructose stattfindet. Während BVU_1663 nach 23 h Inulin fast vollständig hydrolysierte, stoppte die Reaktion mit Levan bereits nach 8 h und einer freigesetzten Fructose-Konzentration von 16 mM. Durch die Freisetzung von Fructose in Abhängigkeit der Zeit konnte nun eine Aktivität für BVU_1663 für die einzelnen Substrate errechnet werden (Abb. 18 C).

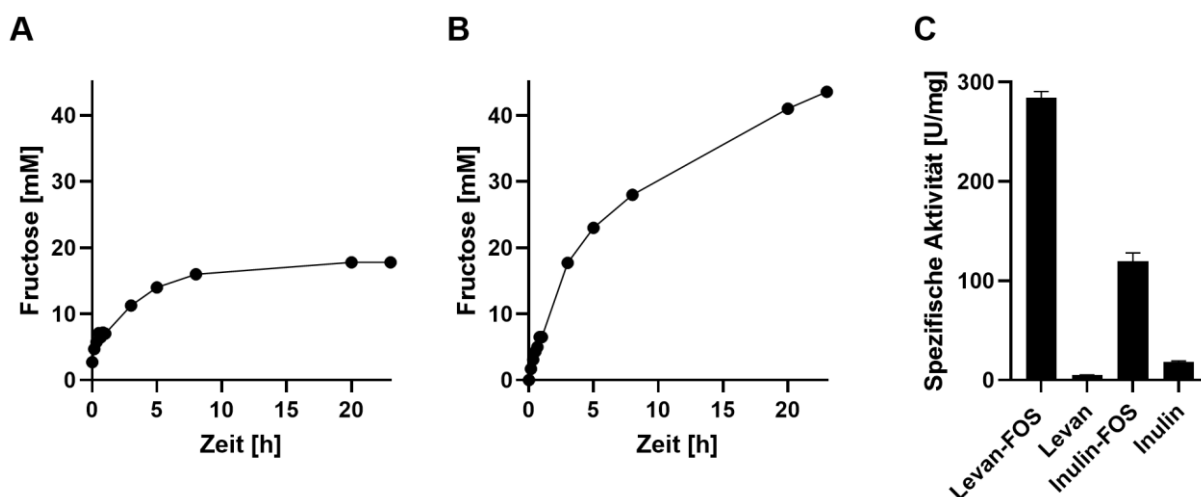


Abbildung 18: Abbau von Levan und Inulin durch die β -Fructosidase BVU_1663 und Aktivitätsberechnungen mit verschiedenen Substraten. Das Enzym-Assay enthielt Kaliumphosphat-Puffer (40 mM, pH 7,6), 50 mM Fruktan-Polymer (Konzentration angegeben in Fructose-Äquivalenten) und 5 μ g des Proteins BVU_1663. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. [A] Abbau von Levan durch BVU_1663. [B] Abbau von Inulin durch BVU_1663. [C] Aktivitätsberechnungen von BVU_1663 mit Levan, Inulin und deren Korrespondierenden FOS als Substrat.

Das Enzym BVU_1663 zeigte die höchste Aktivität bei der Hydrolyse von Levan-FOS mit einer Umsetzungsrate von 284 ± 4 U/mg Protein. Die Aktivität mit Inulin-FOS als Substrat lag mit $119 \pm 4,5$ U/mg Protein deutlich unterhalb der ermittelten Aktivität für Levan-FOS. Somit wurde bestätigt, dass BVU_1663 besser mit Levan-FOS als Substrat arbeitet. Interessanterweise kehrte sich die spezifische Aktivität von BVU_1663 für die Substrate Levan und Inulin um. Insgesamt war die ermittelte Aktivität mit polymerem Levan und Inulin deutlich geringer, allerdings zeigte das Enzym mit Inulin deutlich höhere Aktivitäten als mit Levan. Für Inulin konnte eine Aktivität von 18 ± 1 U/mg Protein und für Levan eine Aktivität von $5,2 \pm 0,2$ U/mg Protein festgestellt werden. Das bedeutet, dass BVU_1663 polymeres Inulin um den Faktor 3,5 schneller hydrolysieren konnte als polymeres Levan. Im Allgemeinen setzt BVU_1663 Fructose aus Levan- und Inulin-FOS in deutlich kürzerer Zeit frei als aus den entsprechenden Polymeren. Die geringe Aktivität mit Levan und Inulin könnte einen der Gründe darstellen, warum *P. vulgatus* nur sehr eingeschränkt Biomasse auf den polymeren Substraten bildete.

3. Ergebnisse

3.1.9.3 Mögliche Substrate von BVU_1663

Für die weitere Charakterisierung von BVU_1663 wurden die möglichen Substrate des Enzyms untersucht. Für diese Analyse wurden Enzymassays mit verschiedenen Di- und Trisacchariden durchgeführt und mittels HPLC-Messungen ausgewertet. Durch diese Analysen sollte ermittelt werden, welche Arten von glykosidischen Bindungen das Enzym BVU_1663 hydrolysiert (Tab. 28).

Tabelle 28: Liste der getesteten Substanzen für die Feststellung des Substratspektrums von BVU_1663. Angegeben sind die verwendeten Substanzen, die Art der Monomere und deren chemische Bindung, und ob eine Hydrolyse beobachtet werden konnte.

Substrat	Art der Bindung	Hydrolyse
Saccharose	Glc β -1,2 Frc	Ja
Raffinose	Glc α -1,6 Glc β -1,2 Frc	Ja
Melibiose	Glc α -1,6 Glc	Nein
Trehalose	Glc α -1,1 Glc	Nein
Lactose	Gal β -1,4 Glc	Nein
Palatinose	Frc α -1,2 Glc	Nein
Maltulose	Glc α -1,4 Frc	Nein
Lactulose	Gal β -1,4 Frc	Nein

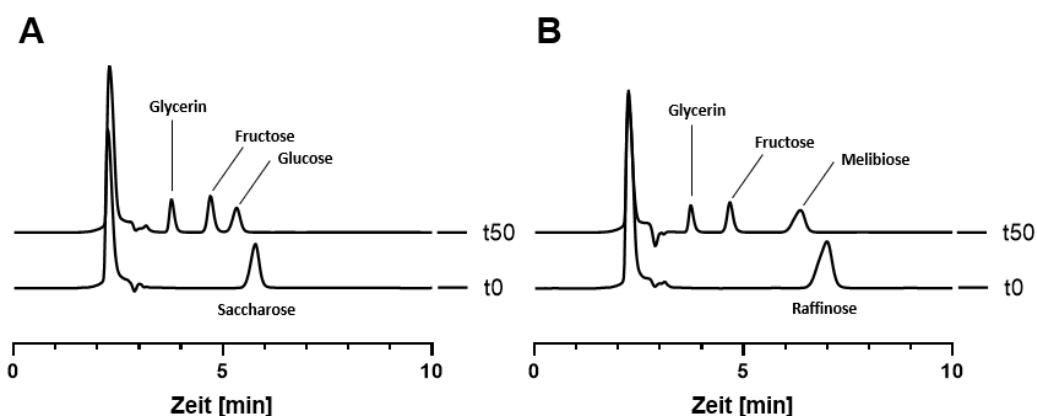


Abbildung 19: HPLC-Analysen des Substratspektrums von BVU_1663. Das Enzym-Assay enthielt Kaliumphosphat-Puffer (40 mM, pH 7,6), 20 mM des jeweiligen Substrats und 5 μ g des Proteins BVU_1663. Die Inkubationszeit betrug 50 min und die Inkubationstemperatur 37 °C. Die Entnahme der t₀-Probe erfolgte vor Zugabe des in Glycerin gelösten Enzyms. [A] HPLC-Profil zur Hydrolyse von Saccharose durch BVU_1663. [B] Hydrolyse von Raffinose durch BVU_1663.

Die Analyse des Substratspektrums von BVU_1663 zeigte, dass das Enzym in der Lage ist, die Hydrolyse von Saccharose und die partielle Hydrolyse von Raffinose zu katalysieren. Im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten fiel auf, dass BVU_1663 lediglich die β -1,2 glykosidische Bindung in Saccharose und Trehalose spalten konnte. Folglich entstanden nach der Hydrolyse von Saccharose Fructose und Glucose (Abb. 19 A), während Raffinose zu Melibiose und Fructose umgesetzt wurden (Abb. 19 B). Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass BVU_1663 in der Lage war, β -2,1 (Levantyp), β -2,6 (Inulintyp) und β -1,2 (Saccharose) glykosidisch verknüpfte Fructosyl-Reste hydrolytisch zu spalten.

3. Ergebnisse

3.1.9.4 Lokalisierung von BVU_1663 in *P. vulgatus*

Zuletzt sollte untersucht werden, ob die β -Fructosidase BVU_1663 intra- oder extrazellulär lokalisiert war. Dazu wurden zunächst Assays mit Zellextrakt und Kulturüberstand durchgeführt. Zur Erstellung des Zellextrakts und der Kulturüberstands wurde *P. vulgatus* Wildtyp auf DMM-Medium mit 0,5% Inulin-FOS als Substrat bis zur späten exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Zellpellet in 5 ml Puffer W resuspendiert und mittels Ultraschalles aufgeschlossen. Im Überstand enthaltene Proteine wurden über einen Zentrifugationsfilter bei 4000 rpm für 90 Minuten in einer Kühlzentrifuge aufkonzentriert. Exemplarisch wurde bei diesen Experimenten mit Inulin-FOS gearbeitet (Abb. 20).

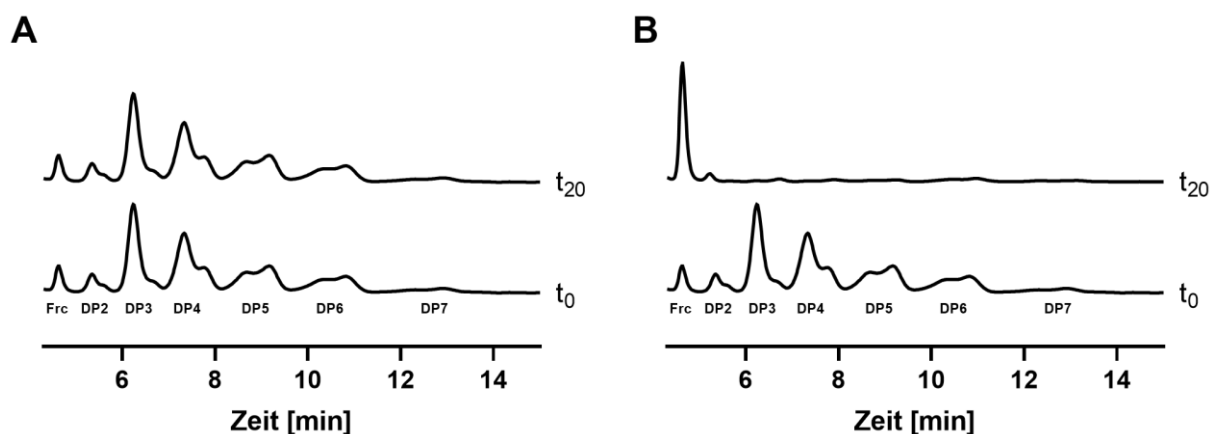


Abbildung 20: Degradation von Inulin-FOS durch Zellüberstand und Zellextrakt von *P. vulgatus*. Der Ansatz enthielt Kaliumphosphat-Puffer (40 mM, pH 7,6), 50 mM Inulin-FOS (angegeben in Fructose-Äquivalenten) und 500 μ g Protein. Die Inkubationszeit betrug 20 min und die Inkubationstemperatur 37 °C. [A] HPLC-Profil von Inulin-FOS vor (t₀) und nach Inkubation mit Zellüberstand (t₂₀). [B] HPLC-Profil von Inulin-FOS vor (t₀) und nach Inkubation mit Zellextrakt (t₂₀). Frc: Fructose.

Nach einer Inkubationszeit von 20 h konnte im Assay mit Zellüberstand keine Freisetzung von Fructose beobachtet werden. Fructose sowie Moleküle verschiedener Polymerisationsgrade lagen nach 20 h in derselben Konzentration wie zu Beginn der Messung vor (Abb. 20 A). Im Zellextrakt hingegen konnte nach spätestens 20h fast ausschließlich Fructose detektiert werden (Abb. 20 B). Die Konzentration der freigesetzten Fructose betrug 7 mM und entsprach damit nicht den erwarteten 50 mM. Vermutlich wurde die freigesetzte Fructose durch andere Enzyme des Zellextraktes umgesetzt, und konnte daher nicht mehr über HPLC-Analysen nachgewiesen werden. Durch dieses Experiment wurde die Lokalisation von BVU_1663 auf die Zelle beschränkt, da es sich, basierend auf diesem Ergebnis, nicht um ein extrazelluläres Enzym handeln konnte.

In einem Folgeexperiment wurde ermittelt, ob sich das Enzym im Cytoplasma von *P. vulgatus* befand, oder ob es sich um ein Membran-assoziiertes Protein handelte. Für diese Analyse wurde im Nachgang des Zellaufschlusses von *P. vulgatus* der Zellextrakt in eine lösliche Protein Fraktion und eine Membran-Fraktion getrennt. Zu diesem Zweck erfolgte eine Ultra-Zentrifugation des Zellextrakts für

3. Ergebnisse

90 Minuten bei 45.000 rpm und einer Temperatur von 4 °C. Die Membran-Präparation wurde in 2 ml Puffer W resuspendiert und die Cytoplasma-Präparation wurde über einen Zentrifugationsfilter aufkonzentriert.

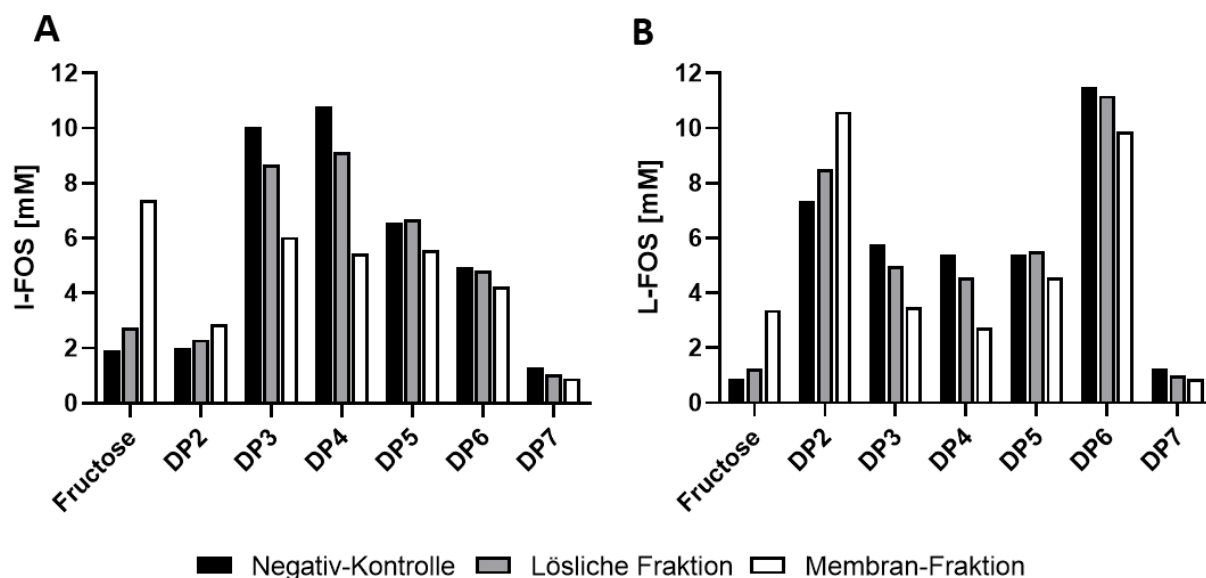


Abbildung 21: Abbau von Inulin-FOS und Levan-FOS durch lösliches Protein und Membran-Protein von *P. vulgatus*. Der Ansatz enthielt Kaliumphosphat-Puffer (40 mM, pH 7,6), 50 mM FOS (Konzentration angegeben in Fructose-Äquivalenten) und 300 µg lösliches Protein bzw. Membran-Protein. Als Negativkontrolle wurde der Reaktionsansatz ohne löslichen- bzw. Membran-Proteinen inkubiert. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C und die Inkubationsdauer 16 h. [A] Abbau von Inulin-FOS durch lösliches Protein und Membran-Protein. [B] Abbau von Levan-FOS durch lösliches Protein und Membran-Protein.

Für den Reaktionsansatz wurden 300 µg Cytoplasma-Protein sowie 300 µg Membran-Protein eingesetzt. Parallel dazu wurde als Negativkontrolle ein Assay-Ansatz ohne zugefügtes Protein inkubiert. Die Auswertung erfolgte über eine HPLC-Analyse mit einer anschließenden Quantifizierung der Moleküle, aufgetrennt nach dem Grad der Polymerisierung (Abb. 21). Abbildung 21 A zeigt das Ergebnis der Reaktion, welche mit Inulin-FOS als Substrat durchgeführt wurde. Klar erkennbar war eine Freisetzung von Fructose und eine Abnahme der Konzentration von Molekülen mit DP3 und DP4, wenn die Inkubation mit Membranprotein erfolgte. Im Vergleich zur Negativkontrolle stieg die Fructose-Konzentration von 1,9 mM auf 7 an. Die Konzentration der Moleküle mit DP3 und DP4 sanken von 10 mM auf respektive 6 mM und 5,5 mM. Es war ebenfalls eine Abnahme der Moleküle mit DP3 von 10 mM auf 8,6 mM, und von Molekülen mit DP4 von 10,7 mM auf 9,1 mM bei der Verwendung von Cytoplasma-Protein zu erkennen, doch eine signifikante Zunahme von Fructose konnte dabei nicht beobachtet werden. Abbildung 21 B stellt analog dazu die Ergebnisse bei Verwendung von Levan-FOS dar. Es konnte ebenfalls bei dem Einsatz von Membran-Protein eine Zunahme der Fructose-Konzentration von 0,9 mM auf 3,4 mM festgestellt werden. Außerdem stieg auch die Konzentration von Molekülen mit DP2 von 7,4 mM auf 10,6 mM. Gleichzeitig sank besonders die Konzentration von Molekülen mit DP3 und DP4 von 5,8 mM bzw. 5,4 mM auf 3,5 bzw. 2,7 mM. Die Zunahme von

3. Ergebnisse

Molekülen mit DP2 bestätigt erneut die Funktion von BVU_1663 als Exo-Fructosidase. Durch die Hydrolyse des endständigen Fructosyl-Rests von Molekülen mit DP3 entsteht Fructose und DP2. Bei der Durchführung des Assays mit Cytoplasma-Protein konnten keine signifikanten Konzentrations-Abweichungen festgestellt werden. Die hier erzielten Ergebnisse zeigten deutlich, dass die Aktivität von BVU_1663 mit der Membran-Fraktion zusammenhängen muss. Es konnte jedoch nicht festgestellt werden, ob sich die Lokalisation von BVU_1663 auf die innere oder äußere Membran beschränkt, da die aufgereinigte Membran-Fraktion beide Membran-Typen enthielt. Jedoch kann argumentiert werden, dass sich das Protein in der inneren Membran befand. Da *P. vulgatus* kaum Wachstum auf polymerem Levan bzw. Inulin zeigte, das aufgereinigtes BVU_1663 mit diesen beiden Substraten hydrolytisch aktiv war, kann vermutet werden, dass das Enzym in der inneren Membran lokalisiert ist. Der Kontakt von BVU_1663 mit großen Polymeren ist im intakten Organismus vermutlich nicht möglich. Um diese Annahme zu unterstützen wurde ein Assay mit gewaschenen Zellen von *P. vulgatus* und aufgereinigtem BVU_1663 durchgeführt um zu testen, ob eine hydrolytische Aktivität mit Zellmaterial zu beobachten war (s. Abb. 22).

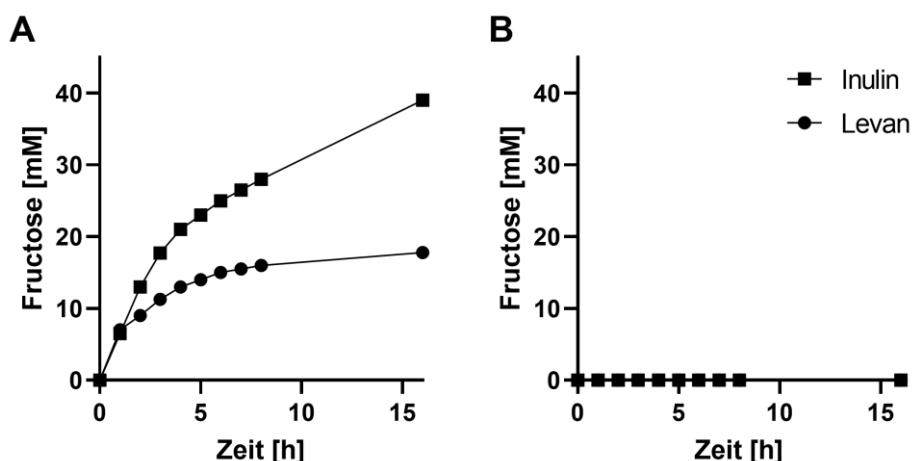


Abbildung 22: Inkubation von Levan und Inulin mit aufgereinigter β -Fructosidase BVU_1663 und gewaschenem Zellmaterial. Das Assay enthielt Kaliumphosphat-Puffer (40 mM, pH 7,6), 50 mM Fruktan-Polymer (Konzentration angegeben in Fructose-Äquivalenten) und wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Inkubationstemperatur betrug 37 °C. [A] Inkubation von Inulin und Levan mit 5 µg BVU_1663. [B] Inkubation von Inulin und Levan mit 1 ml gewaschener *P. vulgatus* Kultur. Die OD betrug 0,8 zum Zeitpunkt des Waschschritts.

Das Assay mit BVU_1663 wurde analog zu den in Abbildung 22 erzielten Ergebnissen durchgeführt. Für das Assay mit *P. vulgatus* Zellmaterial wurden aus einer Kultur in DMM-Medium in der späten exponentiellen Phase unter anaeroben Bedingungen 1 ml entnommen und für 1 min bei 12.000 rpm zentrifugiert. Das entstandene Zell-Pellet wurde zweimal in Frischem DMM-Medium mit Zusätzen ohne Kohlenstoff-Quelle gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in 40 mM Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen und mit 50 mM Inulin oder Levan versetzt. Es folgte eine Inkubation von 16h bei 37 °C unter anaeroben Bedingungen. Die erzielten Ergebnisse zeigen deutlich, dass intaktes

Zellmaterial von *P. vulgatus* nicht in der Lage ist, Fruktose aus polymerem Inulin oder Levan freizusetzen (Abb. 22 B). Dies ist keine eindeutige Bestätigung, dass es sich bei BVU_1663 um ein periplasmatisches Enzym handeln muss. Dennoch untermauert dieses Ergebnis diese Annahme.

3.2 Modifizierung des Kohlenstoff-Flusses in *P. vulgatus*

Bisher werden Bacteroidota-Arten, einschließlich *P. vulgatus*, nicht für biotechnologische Verfahren zur effizienten und nachhaltigen Produktion von Plattformchemikalien wie z.B. Phenolsäuren eingesetzt. Im Allgemeinen erfordert die biotechnologische Synthese mit Bakterien im industriellen Maßstab eine genetische Manipulation des Stoffwechsels der verwendeten Organismen. Dazu gehört beispielsweise die Überexpression von Genen, wodurch der zentrale Kohlenstofffluss gezielt in Richtung der Synthese des gewünschten Stoffwechselprodukts gelenkt werden kann. Ergänzend dazu können, mit dem in dieser Arbeit entwickelten Deletionssystem, konkurrierende Stoffwechselwege unterbrochen und somit die Bildung von Nebenprodukten verhindert werden. Um den Stoffwechsel eines Organismus zu manipulieren, muss dieser generell genetisch zugänglich sein, damit die Einführung rekombinanter DNA in die Zelle sowie die Deletion chromosomaler Gene realisierbar ist. Zur Beurteilung des biotechnologischen Potenzials von *P. vulgatus* wurden daher Experimente durchgeführt, die den zentralen Kohlenstoff-Stoffwechsel beeinflussen. Durch Verwendung des Shuttle-Vektors pG106 sollte das Gen *bvu_2880* homolog in *P. vulgatus* überproduziert werden. Dieses Gen codiert das Enzym Pyruvat Formiat-Lyase (PFL) [EC 2.3.1.54], welches ausgehend von Pyruvat und unter Freisetzung von Formiat die Acetylierung von Coenzym A katalysiert:



In dieser Arbeit konnte die Anwendung von pG106 für eine heterologe Überproduktion von SacB bereits bestätigt werden (Kapitel 3.1.2). Es wurde daher angenommen, dass eine homologe Überexpression von *bvu_2880* eine Steigerung der Formiat-Produktion zur Folge haben sollte.

3.2.1 Klonierung des Shuttle-Vektors pg106 BVU 2880

Für die Klonierung des *pfl*-Gens in den Shuttle Vektor pG106 wurde eine DNA-Assemblierung durchgeführt. Durch die Verwendung der Primer AssBVU_2880_fw/rev (Kap. 2.2.2) wurde das *pfl*-Gen aus genomischer DNA von *P. vulgatus* mit komplementären Enden zum Vektorrückgrat amplifiziert. Für die Generierung des Vektorrückgrats wurden die Primer pG106 LDHnp BB_fwd/rev verwendet und als Template diente der Vektor pG106_ldhnP (Lück & Deppenmeier, 2022). Die Verknüpfung beider Fragmente in korrekter Orientierung erfolgte durch Einsatz des DNA Assembly Master Mix. Für die Transkription des *pfl*-Gens diente der konstitutive Promotor des Lactat Dehydrogenase-Gens (*ldh*, *bvu2499*) aus *P. vulgatus* (Lück & Deppenmeier, 2022). Das fertige Konstrukt pG106_ldhnP_bvu2880

3. Ergebnisse

wurde gemäß des Herstellerprotokolls in *E. coli* NEB® 10β transferiert und vervielfältigt. Das aufgereinigte Konstrukt wurde über Elektroporation in *P. vulgatus* eingebracht (Abb. 23).

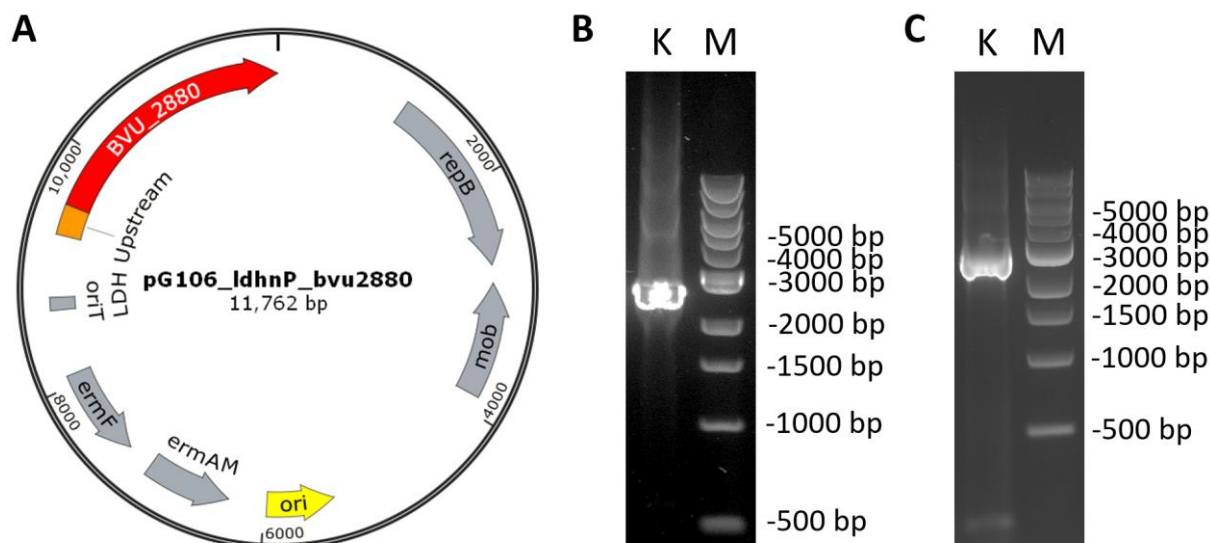


Abbildung 23: Konstruktion des Plasmids pG106_ldhnP_bvu2880. [A] Plasmidkarte von pG106_ldhnP_bvu2880. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Konstruktion des Plasmids pG106_ldhnP_bvu2880. Die Primer pG106 Screening fw/rev flankieren den Integrationsbereich von *bvu_2880* und wurden für dieses Screening verwendet. Die PCR führte zu einem Fragment mit einer erwartungsgemäßen Größe von 2782 bp. [C] Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme von pG106_ldhnP_bvu2880 durch *P. vulgatus*. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Die korrekte Assemblierung von pG106 konnte durch eine Kolonie-PCR nach Einbringung in *E. coli* 10β bestätigt werden. Für die PCR wurden die Primer pG106 Screening fw/rev verwendet, welche den Integrationsbereich des *pfl*-Gens auf dem Plasmid flankieren. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese konnte ein Fragment mit der erwarteten Größe von 2782 bp detektiert werden (Abb. 23 B). Zusätzlich wurde die Nukleotid-Sequenz über die Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt. *P. vulgatus* wurde mit dem Konstrukt mittels EP transformiert, wie ebenfalls durch Kolonie-PCR nachgewiesen werden konnte (Abb. 23 C). Der daraus resultierende Stamm *P. vulgatus* pG106 2880 wurde anschließend mit dem *P. vulgatus* Wildtyp hinsichtlich der Transkript-Abundanz von *bvu_2880* sowie des Stoffwechsel-Endprodukt-Spektrums verglichen.

3.2.2 Vergleich der Transkript-Abundanz von *bvu_2880* im *P. vulgatus* Wildtyp mit *P. vulgatus* pg106 2880

Für eine genauere Analyse der homologen Überproduktion der PFL aus *P. vulgatus* wurde die Kopienzahl des *pfl*-Gens zwischen dem Wildtypen und dem Plasmid-tragenden Stamm verglichen. Zu diesem Zweck wurde eine qPCR durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Anzahl der *pfl*-Gene wurden die Gen-spezifischen Primer qPCR__BVU2880_fw/rev (Kap. 2.2.2) verwendet. Um die genaue Kopienzahl des *pfl*-Gens festzustellen, wurde das Ergebnis der qPCR für *P. vulgatus* Wildtyp auf 1 normiert. Aufgrund der Tatsache, dass das Gen nur ein einziges Mal im Genom codiert ist, ließ sich für

3. Ergebnisse

den Plasmid-tragenden Stamm durch den Vergleich mit dem Wildtyp die genaue Kopienzahl für das *pfl*-Gen ermitteln (Abb. 24 A).

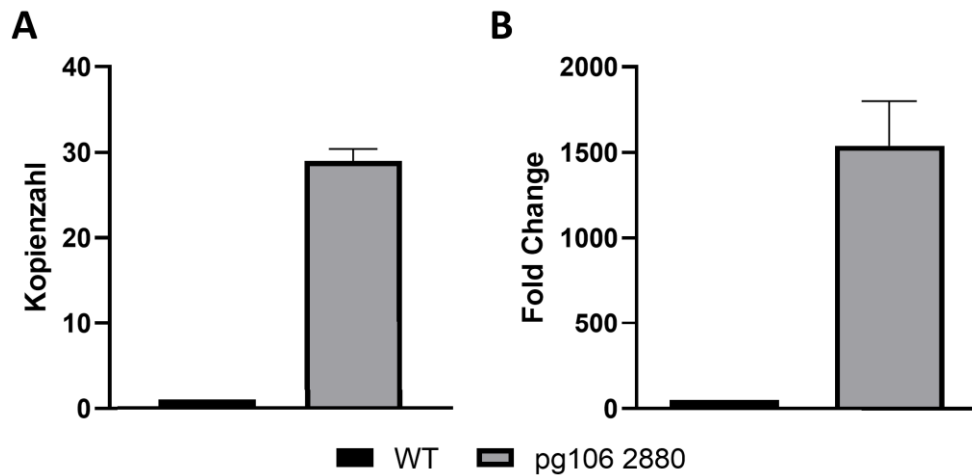


Abbildung 24: *pfl*-Kopienzahl und Transkript-Abundanz im *P. vulgatus* Wildtyp und in *P. vulgatus* pG106 2880. [A] Um die Kopienzahl des *pfl*-Gens zwischen dem Wildtyp und der Plasmid-tragenden Mutante zu vergleichen wurde eine qPCR durchgeführt. [B] Die relative Transkript-Menge des *pfl*-Gens wurde mittels RT-qPCR analysiert. Δ CT-Werte stellen die Differenz des Ct-Werts des *pfl*-Gens (*bvu_2880*) mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L23 (*bvu_0803*) dar. Für die Bestimmung der Verhältnisse an mRNA zum Wildtyp wurden die $\Delta\Delta$ CT-Werte berechnet und die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet. Die in dieser Abbildung gezeigten Ergebnisse wurden in zweifacher Ausführung mit DNA- oder RNA-Präparaten aus drei verschiedenen Kulturen ermittelt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Der Plasmid-tragende Stamm *P. vulgatus* pG106 2880 wies eine deutlich höhere Kopienzahl des *pfl*-Gens als der Wildtyp auf (Abb. 24 A). Konkret lag die Kopienzahl in der Mutante um 28 ± 1 -mal höher als im Wildtyp. Somit konnten in *P. vulgatus* pG106 2880 ca. 28 Kopien von *bvu_2880* nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis legte nahe, dass die Präsenz des Plasmids einen signifikanten Einfluss auf den Transkriptionslevel, und somit auch auf die Expression des *pfl*-Gens haben könnte. Darüber hinaus lag die Kopienzahl des Plasmids (mit *bvu_2880*) in derselben Größenordnung wie bereits von Lück & Deppenmeier (2022) beschrieben wurde. Neben der Quantifizierung der *pfl*-Kopienzahl wurde ebenfalls die mRNA-Transkript-Abundanz des *pfl*-Gens im Wildtyp sowie des Plasmid-tragenden Stamms untersucht. Für diese Analyse wurde die Gesamt-RNA aus Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase der jeweiligen Stämme isoliert. Die mRNA-Konzentration wurde mittels RT-qPCR unter Verwendung der für das *pfl*-Gen spezifischen Primer qPCR__BVU2880_fw/rev bestimmt. Als Referenzgen wurde das Gen *bvu_0803* (*ribL23*), welches für das ribosomale Protein L23 aus *P. vulgatus* codiert, verwendet. Das L23 Protein wird während der exponentiellen Wachstumsphase konstant produziert, daher eignet es sich aufgrund eines gleichmäßigen Transkript-Levels als Referenz-Gen (Lück & Deppenmeier, 2022). Die Methodik sowie die damit verbundene Auswertung der RT-qPCR sind in Kapitel 2.4.8 beschrieben.

Aufgrund der hohen Kopienzahl des *pfl*-Gens wurde erwartungsgemäß bei *P. vulgatus* pG106 2880 eine 1537 ± 185 -fach höhere Transkript-Menge an *pfl* mRNA im Vergleich zum Wildtyp festgestellt. (Abb. 24 B). Die ermittelten Daten zeigten, dass das *pfl*-Gen in der *shuttle*-Vektor basierten Mutante durch die hohe Kopienzahl in erheblich größeren Mengen transkribiert wurde. Als nächstes galt es zu untersuchen, ob die erhöhte Transkriptmenge einen Einfluss auf die Enzymproduktion und den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus nahm.

3.2.3 Einfluss der *pfl*-Transkriptmenge auf das Verhältnis der Stoffwechselendprodukte in *P. vulgatus*.

Im Folgenden Experiment wurde untersucht, ob durch die stark erhöhte Kopienzahl sowie Transkriptabundanz des *pfl*-Gens in *P. vulgatus* pG106 2880 ein Einfluss auf den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus erkennbar war. Zu diesem Zweck wurde mehrere Kulturen von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106 2880 in DMMG-Medium kultiviert und die Stoffwechselendprodukte mittels HPLC analysiert (Abb. 25). Die Probennahme erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase und die ermittelten Stoff-Konzentrationen wurde mit dem gebildeten Trockengewicht (TG) des jeweiligen Zeitpunkts ins Verhältnis gesetzt.

Der Substrat-Verbrauch wies im Vergleich zwischen den beiden Stämmen einen leichten Unterschied auf (Abb. 25 A). Es konnte eine Diskrepanz zwischen dem Wildtyp ($24,9 \pm 0,9$ mmol/g TG) und dem Plasmid-tragenden Stamm ($20,4 \pm 2,6$ mmol/g TG) beobachtet werden. Dieser Unterschied drückte sich ebenfalls im Vergleich des Wachstums zwischen *P. vulgatus* Wildtyp und dem Plasmid-tragenden Stamm aus (Abb. 25 B), und ließ sich vermutlich auf die Zugabe von Erythromycin zurückzuführen, welches für die Plasmid-Erhaltung für *P. vulgatus* pG106 2880 notwendig war. Als Stoffwechsel-Endprodukte konnten mittels HPLC-Analyse Succinat, Lactat, Formiat, Acetat und Propionat nachgewiesen werden (Abb. 25 C). Der Vergleich beider Stämme zeigte drei signifikante Unterschiede: Die Succinat-Produktion im Wildtyp war mit $11,5 \pm 1,5$ mmol/g TG mehr als doppelt so hoch wie in der Mutante ($4,6 \pm 0,9$ mmol/g TG). Die Bildung von Formiat durch die Mutante stieg auf $11,2 \pm 1,8$ mmol/g TG, wobei die Produktion im Wildtyp $3,5 \pm 0,3$ mmol/g TG betrug. Außerdem konnte eine Veränderung in der Acetat-Bildung festgestellt werden. Während der Wildtyp-Stamm eine Produktionsrate von $16,2 \pm 1,8$ mmol/g TG aufwies, so sank die Produktionsrate in der Mutante auf $11,6 \pm 1,4$ mmol/g TG. Bezüglich der Laktat- und Propionat-Konzentrationen konnte keine nennenswerte Abweichung zwischen Wildtyp und Mutante ermittelt werden. Der Unterschied der Formiat-Produktionsrate zwischen dem Wildtyp und der Mutante wird in Abbildung 25 D noch einmal deutlich. Unabhängig vom Zeitpunkt der Probennahme konnte bei der Mutante in jedem Falle eine höhere Formiat-Produktionsrate im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden.

3. Ergebnisse

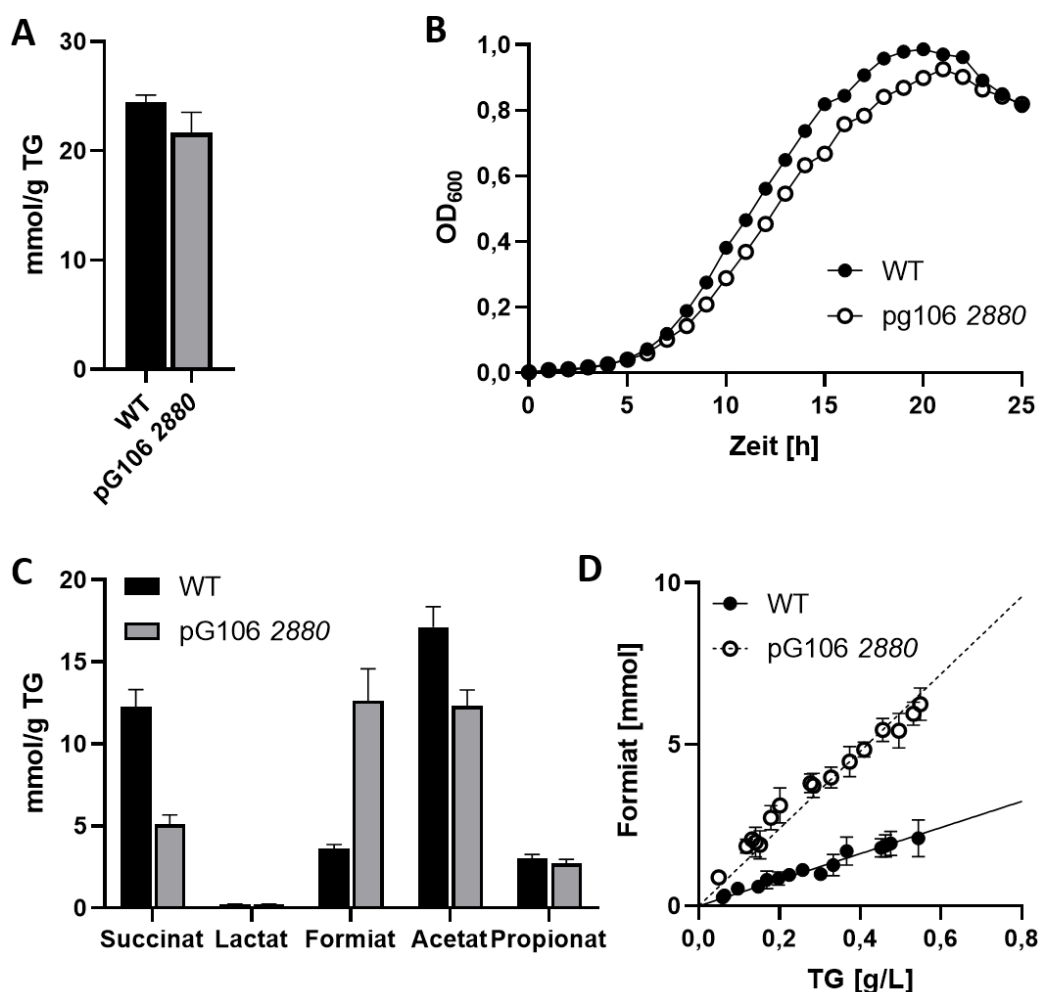


Abbildung 25: Vergleich des Substratverbrauchs, des Wachstums und der Stoffwechsel-Endproduktbildung von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106 2880. Es wurden aus 15 Kulturen von jedem Stamm zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase Proben entnommen und mittels HPLC analysiert. Der Substratverbrauch und die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte wurden mit dem gebildeten Trockengewicht zum entsprechenden Zeitpunkt der Probennahme korreliert. Die gezeigten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die Kultivierung wurde in 50 ml DMMG-Medium durchgeführt. [A] Glucose-Verbrauch von *P. vulgatus* WT und *P. vulgatus* [B] Bildung der Stoffwechselendprodukte in mmol pro Gramm Trockengewicht. [C] Formiatkonzentrationen in Abhängigkeit des Trockengewichts der einzelnen Kulturen bei Wachstum auf DMMG-Medium.

Zusammenfassend führte die Überexpression des *pfl*-Gens mittels des Shuttle-Plasmids pG106 zu einer gesteigerten Transkriptmenge, und damit einhergehend zu einer erhöhten Aktivität der PFL in *P. vulgatus* pG106 2880. Dies führte schlussendlich zu einer Verschiebung des Produktspektrums und vermehrten Bildung von Formiat sowie der reduzierten Bildung von Succinat und Acetat. Die gezielte Manipulation des Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* durch eine homologe Überexpression von Proteinen scheint damit durch den Einsatz des Shuttle-Vektors pG106 möglich zu sein, und sollte in weiteren Experimenten zur Aufklärung des Phenolsäure-Stoffwechsels angewendet werden.

3.3 Isolierung von Bakterien des Phylums Bacteroidota aus humanen Stuhlproben

Viele unverdauliche Nahrungsbestandteile können von der Darm-Mikrobiota zu kurzkettigen Fettsäuren abgebaut werden (Duncan et al, 2007). Die meisten dieser Metabolite werden direkt durch die Colonocyten resorbiert und dem Wirtstoffwechsel zugeführt. Metabolite, die nicht zwangsläufig für den Energiestoffwechsel verwendet werden können, wird zunehmend eine Einflussnahme auf diverse Signal-Kaskaden, wie Entzündungssignale und endokrine Regulationsmechanismen, zugesprochen (Huang *et al.*, 2009). Zu dieser Art von Metaboliten gehören auch einige sekundär-Metabolite aus dem bakteriellen Stoffwechsel der Darmmikrobiota. Durch den Phenylpropanoid-Stoffwechselweg wird eine Reihe von Phyto-Chemikalien wie z.B.: Benzol-Säuren, Zimtsäuren und Flavonoide synthetisiert. Vielen dieser bioaktiven Phenolsäuren wird eine entzündungshemmende, anti-oxidative und sogar krebsbekämpfende Wirkung zugesprochen (Hsu 2008, Huang 2009).

Drei der am häufigsten im menschlichen Darm nachgewiesenen Phenolsäuren sind Phenylessigsäure, 4-Hydroxyphenyl-Essigsäure und Indoleessigsäure (Russel *et al.*, 2013, Smith & McFarlane 1996). Diese Verbindungen stammen aus Nahrungsmitteln, die reich an pflanzlichen Bestandteilen sind oder entstehen im Dickdarm mittels mikrobieller Fermentation von aromatischen Aminosäuren, primär Tyrosin, Phenylalanin und Histidin. Es wurde gezeigt, dass fünf Mitglieder der Gattung *Bacteroides* und noch weitere Vertreter des Phylums Bacteroidota die Fähigkeit besitzen, alle drei AAAs zu fermentieren und dass die Proteinfermentation die wahrscheinliche Quelle der Hauptproduktion von Phenolsäuren ist (Russel *et al.*, 2013; Bourgeau *et al.* 1983, Kaczmarek & Coykendall 1980).

Aus diesem Grund wurden die ersten Bemühungen für die biotechnologische Synthese von Phenolsäuren durch Bacteroidota-Spezies auf die Erstellung einer Stammbibliothek gerichtet, um Organismen zu identifizieren, welche die gewünschten Stoffe bereits natürlicherweise produzieren.

3.3.1 Identifizierung geeigneter Isolierungsparameter

In vielen anaeroben Habitaten in unserer Umwelt sind Arten der Gattung *Phocaeicola* und *Bacteroides* vertreten. Besonders im menschlichen Dickdarm und in Schlamm von Biogasanlagen existiert eine massive Artenvielfalt an Mikroorganismen, wobei die jeweilige Mikrobiota durch das Phylum Bacteroidota dominiert wird (Chassard *et al.*, 2007; Kabaivanova *et al.*, 2022). Daher wurden zu Beginn der Experimente Parameter für die Isolierung von Bacteroidota-Stämmen festgelegt. Als primäres Medium diente 10%iger PY-Agar, es wurden aber auch DMM und Bile-Agar eingesetzt. Für eine initiale Selektion wurden als Kohlenstoffquelle 0,5% verschiedener Heteropolysaccharide verwendet, da viele Bacteroidota-Spezies auf den Abbau solcher Substrate spezialisiert sind. Zusätzlich wurden die Isolierungsansätze mit verschiedenen Antibiotika versetzt. Für die Probenentnahme diente anaerober NaHCO₃-Puffer (50 mM) mit Dithiothreitol (5 mM) und als Probenmaterial wurde Schlamm einer Biogas-Anlage oder frischer Stuhl verwendet. In Puffer gelöstes Probenmaterial wurde unter

3. Ergebnisse

anaeroben Bedingungen auf die Nährböden ausgestrichen und bis zur Bildung von sichtbaren Kolonien inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden über die Sequenzierung der konservierten 16s-rRNA Regionen bis auf die Spezies-Ebene identifiziert. Nach mehreren Anreicherungsversuchen konnte eine erste Stammbibliothek erstellt werden (Tab. 29).

Tabelle 29: Stammbibliothek von Mikroorganismen, angereichert aus natürlichen, anaeroben Habitaten.

Probenmaterial	Substrat	Antibiotikum	Medium	Organismus	Anzahl an Isolaten
Biogas-Schlamm	Cellulose	-	PY1/10	<i>Lactobacillus ingluviei</i>	2
Humane Faeces	Cellulose	-	PY1/10	<i>Escherichia sp.</i>	2
Biogas-Schlamm	Pektin	-	PY1/10	<i>Lactobacillus agilis</i>	4
Biogas-Schlamm	Trypton	-	PY1/10	<i>Streptococcus lutetiensis</i>	3
Humane Faeces	Trypton	-	PY1/10	<i>Clostridium perfringens</i>	1
Humane Faeces	Xylan	-	PY1/10	<i>Streptococcus thermophilus</i>	1
Biogas-Schlamm	Muzin	-	PY1/10	<i>Streptococcus salivarius</i>	1
Biogas-Schlamm	Cellulose	Vancomycin	PY1/10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2
Humane Faeces	Cellulose	Vancomycin	PY1/10	<i>Klebsiella oxytoca</i>	3
Humane Faeces	Pektin	Vancomycin	PY1/10	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1
Humane Faeces	Trypton	Vancomycin	Bile-Agar	<i>Escherichia coli</i>	9
Humane Faeces	Pektin	-	PY1/10	<i>Bifidobacterium breve</i>	1
Humane Faeces	Pektin	Vancomycin	PY1/10	<i>Leuconostoc lactis</i>	1
Humane Faeces	Pektin	-	DMM	<i>Bifidobacterium dentium</i>	1
Humane Faeces	Cellulose	Vancomycin	PY1/10	<i>Selenomonas ruminantium</i>	1
Humane Faeces	Pektin	-	PY1/10	<i>Lactobacillus mucosae</i>	1
Humane Faeces	Glucose	Kanamycin	PYG	<i>Anaerostipes hadrus</i>	1
Humane Faeces	Inulin	-	DMM	<i>Bacteroides cellulosilyticus</i>	1

Bereits nach den ersten Isolierungsversuchen konnten Organismen aus verschiedenen Phyla angereichert werden. Allerdings stellten Stämme der Art *E. coli* eine Herausforderung dar, da sie sich unter allen getesteten Bedingungen ebenfalls in großer Zahl anreichern ließen. Zudem wurde deutlich, dass das verwendete Substrat Inulin ein entscheidender Faktor für die Isolierung von Arten der Familie *Bacteroidaceae* war. Aus diesen Gründen wurden die folgenden Anreicherungsversuche unter Berücksichtigung der problematischen Präsenz von *E. coli* und der Verwendung von Inulin als Substrat durchgeführt.

3.3.2 Screening nach Organismen des Phylums Bacteroidota

Für die Anreicherung von Vertretern des Phylums Bacteroidota wurden Isolierungsversuche unter Verwendung von Amikacin unternommen (Tab. 30). Dabei handelt es sich um ein Antibiotikum, welches primär das Wachstum von Organismen der Familie *Enterobacteriaceae* hemmt (Ramirez & Tolmasky, 2017). Da unter Verwendung von Inulin als Substrat für *B. cellulosilyticus* angereichert wurde, wurden die verwendeten Kohlenstoff- und Energiequellen für die Anreicherungsversuche von Bacteroidota-Vertretern zusätzlich um Levan erweitert. Bei Levan handelt es sich wie bei Inulin um ein Fruktan-Polymer. Im Gegensatz zu Inulin, welches über β -2,1 Verknüpfungen zwischen den Fruktose-Monomeren charakterisiert wird, besitzt Levan β -2,6 Verknüpfungen. (Van den Ende, 2013).

3. Ergebnisse

Tabelle 30: Anreicherung von anaeroben Mikroorganismen aus humanen Stuhlproben unter Verwendung von Amikacin und Levan.

Probenmaterial	Substrat	Antibiotikum	Medium	Organismus	Anzahl der Isolate
Humane Faeces	Levan	Amikacin	PY1/10	<i>Phocaeicola vulgatus</i>	8
Humane Faeces	Levan	Amikacin	PY1/10	<i>Phocaeicola dorei</i>	2
Humane Faeces	Levan	Amikacin	PY1/10	<i>Bacteroides kribi</i>	4
Humane Faeces	Levan	Amikacin	PY1/10	<i>Bacteroides ovatus</i>	1
Humane Faeces	Levan	-	PY1/10	<i>Blautia luti</i>	4
Humane Faeces	Levan	-	PY1/10	<i>Dorea longicatena</i>	1
Humane Faeces	Levan	-	PY1/10	<i>Coprococcus comes</i>	1

Unabhängig von der Verwendung von Amikacin konnten keine Vertreter der Familie *Enterobacteriaceae* isoliert werden. Die Verwendung von Levan als Kohlenstoffquelle übte bereits den nötigen Selektionsdruck aus. Durch die Zugabe von Amikacin konnte eine Anreicherung von mehreren *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Isolaten erreicht werden. In vorigen Experimenten (Kapitel 3.1.1) wurde bereits festgestellt, dass der Typstamm *P. vulgatus* DSM 1447 in Minimalmedium mit Levan als Substrat kaum zu Wachstum befähigt war. In diesem Experiment wurde jedoch Komplexmedium verwendet, daher war die Anreicherung von *P. vulgatus* vermutlich auf die Metabolisierung von Bestandteilen wie Pepton und Hefeextrakt zurückzuführen. Dieser Ansatz führte demnach zu einer Erweiterung der Stammbibliothek und stellte eine vielversprechende Grundlage für Folgeexperimente dar.

3.4 Produktion von Phenolsäuren durch *P. vulgatus*

Die meisten Lebensmittel enthalten nicht nur Kohlenhydrate, Fette und Proteine, sondern auch andere Nährstoffe, die nicht primär zur Energiegewinnung dienen. Die genaue Wirkung dieser Substanzen auf den Körper und ihre Funktionen sind nicht immer klar definiert (Domínguez-Avila *et al.*, 2021). Zu diesen Stoffen zählen bioaktive phenolische Verbindungen. Diese werden hauptsächlich durch den Verzehr von pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Obst und Gemüse aufgenommen, können aber auch durch Bakterien im Dickdarm freigesetzt werden (Clifford *et al.*, 2004; Russell *et al.*, 2013). Da diese phenolischen Verbindungen aufgrund ihrer komplexen Struktur im Dünndarm kaum aufgenommen werden, gelangen sie nahezu unverändert in den Dickdarm. Dort können Teile von ihnen von der lokalen Mikrobiota in verschiedene bioaktive Phenolsäuren umgewandelt werden (Scalbert *et al.*, 2002; Parkar *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2014). Analysen von menschlichem Stuhl geben Einblick in die phenolischen Metaboliten, die wahrscheinlich durch den Abbau von Polyphenolen entstehen (Jenner *et al.*, 2005). Häufig nachgewiesene Substanzen sind Derivate von Benzoesäure, Zimtsäure, Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure. In mehreren unabhängigen Studien wurde gezeigt, dass unter den nachweisbaren phenolischen Verbindungen Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure den größten Anteil ausmachen (Sánchez-Patán *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011b; Muñoz-González *et al.*,

2013; Gutiérrez-Díaz *et al.*, 2018). Allerdings können Phenolsäuren ebenfalls in Individuen nachgewiesen werden, deren Ernährungsweise durch gesättigte Fettsäuren und tierische Proteinquellen und nicht durch Polyphenol-haltige Pflanzenbestandteile geprägt ist (Russel *et al.*, 2011a; Russel *et al.*, 2011b). Daher wird vermutet, dass neben dem Abbau von Polyphenolen auch die Fermentation von Proteinen durch *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies eine wichtige Rolle bei der Produktion von Phenolsäuren im Darm spielt.

3.4.1 Etablierung eines chromatographischen Nachweisverfahrens zur Analyse von Phenolsäuren

Für die biotechnologische Produktion von Phenolsäuren durch Mikroorganismen ist ein zuverlässiges Nachweisverfahren für diese Stoffklasse unerlässlich. Phenolsäuren bestehen aus einem Benzol-Ring, der mit einer kurzkettigen Fettsäure assoziiert ist und welche primär die chemischen Eigenschaften des Moleküls beeinflusst. Aus diesem Grund eignet sich das HPLC-Messverfahren ideal als Nachweismethode, da sich Phenolsäuren aufgrund der UV-Absorption des Benzolrings mit einer sehr geringen Nachweisgrenze über einen UV-Detektor erfassen lassen. Außerdem existiert eine Vielzahl an stationären Phasen, welche über mehrere Interaktionsmechanismen Verbindungen dieser Stoffklasse auftrennen können.

3.4.1.1 Chromatographische Analytik durch Polymerbasierte Aminex-Trennsäulen

Initiale Versuche dienten der Identifizierung eines geeigneten Säulenmaterials. Zunächst wurde als stationäre Phase eine Trennsäule mit Polystyren-Divinylbenzene (Aminex HPX-87H, Biorad) verwendet. Dieses Polymer interagiert mit Carboxyl- und Hydroxylgruppen, und trennt Analyten basierend auf ihrer Molekülgröße. Bei einer Säulentemperatur von 65 °C und einer Flussrate der mobilen Phase von 1 ml/min konnten bereits einige Substanzen über einen UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 210 nm nachgewiesen werden (Abb. 26).

3. Ergebnisse

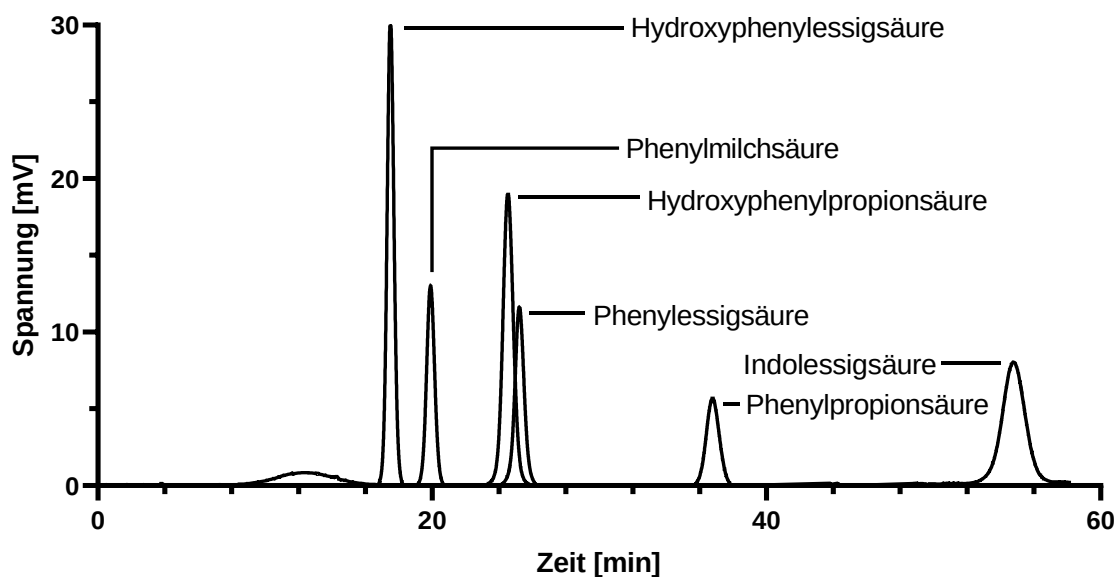


Abbildung 26: Elutionsprofil verschiedener Phenolsäuren mit einer polymerbasierten Aminex-Trennsäule. Als stationäre Phase wurde eine Polymer-basierte Trennsäule (Aminex HPX-87H, Biorad) verwendet. Die Flussrate der mobilen Phase (5 mM H_2SO_4) betrug 1 ml/min, und die Temperatur des Säulenofens wurde auf 65 °C eingestellt. Der UV-Detektor erfasste Analyte bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Konzentration des Phenolsäuren-Standards betrug 2 mM.

Da geladene Moleküle nicht mit dem hier verwendeten Säulen-Material interagieren, können sie mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden. Daher wurde als mobile Phase 5 mM H_2SO_4 verwendet, da die Phenolsäuren bei einem geringen pH-Wert protoniert vorliegen und somit keine Ladung besitzen. Das Ergebnis zeigte, dass eine polymerbasierte Matrix für die Auftrennung von Phenolsäuren grundsätzlich geeignet ist. Jedoch sind unverhältnismäßig lange Elutionszeiten von bis zu 60 Minuten beobachtet worden, was einen limitierenden Faktor für die Datenerhebung bei einer größeren Probenzahl darstellt. Weiterhin konnte nicht alle Verbindungen aufgetrennt werden. Abgesehen von den in Abbildung 26 detektierten Phenolsäuren wurden biotechnologisch wichtige Substanzen wie Phenylpyruvat, Zimtsäure und Cumarsäure unter diesen Bedingungen nicht detektiert.

3.4.1.2 Chromatographische Analytik durch Silica-Partikel mit Pentafluorophenylgruppen

Um die Eignung anderer Interaktionsmöglichkeiten zwischen den Analyten und dem Säulenmaterial zu evaluieren wurde im nächsten Schritt der Optimierung die stationäre Phase ausgetauscht. Im Folgenden wurde eine Kieselgel-Matrix bestehend aus Pentafluorophenyl-Propyl-Resten (Nucleodur PFP, Macherey-Nagel) gewählt. Dieses Material zeichnet sich durch zwei besondere Retentionsmechanismen aus: Zum einen handelt es sich um ein sehr hydrophobes Material, zum anderen interagiert das Material mit π -Elektronen. Durch den Benzolring erhalten Phenolsäuren einen hydrophoben Charakter. Darüber hinaus sind delokalisierte π -Elektronen charakteristisch für Benzolringe. Dieses Säulenmaterial ist ebenfalls ungeeignet für die Retention geladener Moleküle.

3. Ergebnisse

Daher wurde der mobilen Phase neben 20% Acetonitril 0,1% Formiat zugesetzt, um den organischen Säurerest der Analyten zu protonieren.

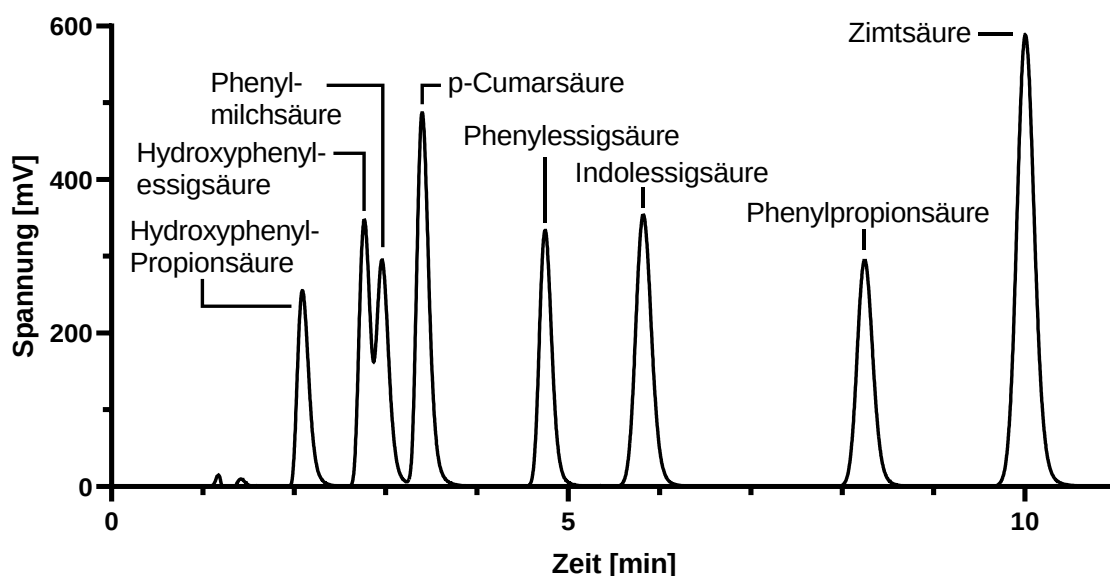


Abbildung 27: Elutionsprofil verschiedener Phenolsäuren unter Verwendung von Silica-Partikel mit Pentafluorophenylgruppen. Als stationäre Phase wurde ein Silica Gel (Nucleodur PFP, Macherey-Nagel) verwendet. Die Flussrate der mobilen Phase (20 % Acetonitril, 0,1 % Formiat) betrug 0,25 ml/min, und die Temperatur des Säulenofens wurde auf 30 °C eingestellt. Der UV-Detektor erfasste Analyten bei einer Wellenlänge von 210 nm. Die Konzentration der Phenolsäuren betrug 2 mM.

Durch die Kombination der Retentionsmechanismen und 20% Acetonitril als mobile Phase konnten alle wichtigen Standardsubstanzen in einer Konzentration von 2 mM detektiert werden (Abb. 27). Im Vergleich mit der polymerbasierten Säule wurden in diesem Fall nicht nur alle Analyten nachgewiesen, es konnten auch die Retentionszeiten auf 10 Minuten und die Flussrate auf 0,25 ml/min reduziert werden. Darüber hinaus war die Erfassung der Analyten durch den UV-Detektors deutlich sensibler, wodurch Nachweisgrenzen im unteren μmol -Bereich erreicht werden konnten. Aufgrund des geringen Zeitaufwands und der erhöhten Nachweisempfindlichkeit bildete diese Methode die Grundlage für alle weiteren Messungen von Phenolsäuren in dieser Arbeit.

Für die Identifizierung von natürlichen Phenolsäure-Produzenten wurden die angereicherten Organismen (Kap. 3.3.2), welche dem Phylum Bacteroidota angehörten, in 50 ml DMMG kultiviert. Aufgrund der Vermutung, dass die Synthese von Phenolsäuren auf der Umsetzung von aromatischen Aminosäuren beruht, wurde pro getesteten Organismus eine Kultur mit 4 mM Tyrosin und eine mit 4 mM Phenylalanin supplementiert. Nach dem Erreichen der späten exponentiellen Phase wurden Proben entnommen und über die neu etablierte HPLC-Methode auf die Produktion von Phenolsäuren analysiert. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte für keinen der angereicherten Organismen die Bildung von Phenolsäuren unter den getesteten Bedingungen nachgewiesen werden. Aus diesem

Grund wurde in weiteren Experimenten der Fokus auf die Aufklärung potenzieller Stoffwechsel-Wege zur Synthese von Phenolsäuren verlagert.

3.4.2 Aufklärung des Phenolsäure-Stoffwechsels von *Phocaeicola vulgatus*

Für die biotechnologische Nutzung von *P. vulgatus* als Produktionsplattform von bioaktiven Phenolsäuren war die Aufklärung respektiver Stoffwechselwege essenziell. Im Gegensatz zu dem bereits detailliert untersuchten zentralen Kohlenstoffmetabolismus und dessen Endprodukte sind über die Stoffwechselwege für die Bildung von Phenolsäuren in *P. vulgatus* nur sehr wenige Informationen verfügbar. Unter Laborbedingungen wurden im Endprodukt-Spektrum von Bacteroidota-Fäkal-Isolaten sowie dem DSM 1447 Typstamm von *P. vulgatus* mit den zur Verfügung stehenden Nachweismethoden keine Substanzen detektiert, welche als Phenolsäuren identifiziert werden konnten. Daher wurden erste Bemühungen darauf gerichtet, Enzyme und Stoffwechselwege für die Synthese von Phenolsäuren zu identifizieren und näher zu charakterisieren.

3.4.2.1 Bildung von Phenylelessigsäure

Bioinformatische Analysen im Rahmen dieser Arbeit konnten zeigen, dass Enzyme für einen potenziellen Stoffwechselweg für die Bildung von Phenylelessigsäure in *P. vulgatus* existieren. Obwohl natürlicherweise keine Produktion von Phenylelessigsäure durch *P. vulgatus* nachgewiesen werden konnte, so lag die Vermutung dennoch nahe, dass der Organismus zu der Bildung befähigt ist. Die Theorie wird durch den Umstand bestärkt, dass sich alle beteiligten Gene in einer Operon-Struktur auf dem Genom befinden und somit gemeinsam eine metabolische Funktion erfüllen könnten (Abb. 28). Bioinformatische Analysen ergaben, dass ausgehend von Phenylalanin über eine Amino-Transferase durch die Umsetzung von α -Ketoglutarat (α KG) zu Glutamat (Glu) Phenylpyruvat gebildet werden kann. Im nächsten Schritt verknüpft eine Indolpyruvat-Oxidoreduktase Phenylpyruvat mit Coenzym A (CoA). Dabei wird Ferredoxin (Fd) reduziert und CO_2 freigesetzt. Zuletzt spaltet eine Phenylacetyl-CoA Ligase den Phenylacetyl-Rest von CoA ab, wodurch Phenylelessigsäure entsteht und Adenosin-Triphosphat (ATP) aus Adenosin-Monophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PPi) gebildet wird.

3. Ergebnisse

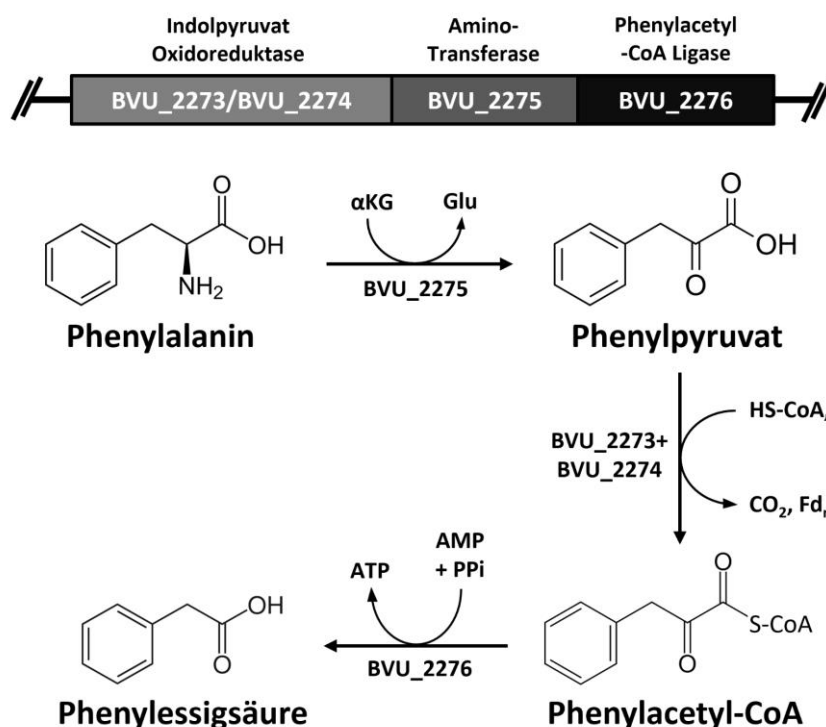


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Bildung von Phenylelessigsäure in *P. vulgaris*. Mögliche Operon-Struktur in *P. vulgaris* welche für eine Enzymkaskade codiert, die eine Synthese von Phenylelessigsäure unter Generierung von ATP ermöglicht. αKG : α -Ketoglutarat; Glu: Glutamat; CoA: Coenzym A; Fd: Ferredoxin; ATP: Adenosin-Triphosphat; AMP: Adenosin-Monophosphat; PPi: Pyrophosphat; BVU_2275: Putative Aminotransferase; BVU_2273: Indolpyruvat Oxidoreduktase Untereinheit iorA; BVU_2274: Indolpyruvat Oxidoreduktase Untereinheit iorB; BVU_2276: Phenylacetyl-Coenzym A Ligase.

Im Zuge dieser Reaktionen entstehen Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Ferredoxin sowie ATP, was sich positiv auf das Wachstum von *P. vulgaris* auswirken sollte. Um diesen Stoffwechselweg zu validieren, wurden die beteiligten Enzyme heterolog in *E. coli* produziert, aufgereinigt und charakterisiert.

3.4.2.2 Heterologe Produktion und Aufreinigung der Indolpyruvat Oxidoreduktase (IOR) BVU_2273/74 aus *P. vulgaris*

Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Gene *bvu_2273/bvu_2274* für die Produktion und Aufreinigung der Indolpyruvat-Oxidoreduktase (IOR) in den Überexpressionsvektor pASK IBA 3 (IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland) kloniert. Zu diesem Zweck wurden unter Verwendung der Primer pASK3_BVU227374_fw/rev die beiden Gene *bvu2273* und *bvu2274* amplifiziert. Es handelt sich bei dem Produkt des Gens um ein Heterodimer aus einer α -Untereinheit (*bvu_2273*) und einer β -Untereinheit (*bvu_2274*), daher wurden beide Gene gemeinsam kloniert. Über die Primersequenzen wurde dem Amplifikat eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BsaI stromaufwärts und stromabwärts der codierenden Region zugefügt. Durch Aufreinigung der Amplifikate und des pASK3 Vektors sowie nachfolgender Verdauung mit dem Restriktionsenzym BsaI wurde durch Ligation das Konstrukt pASK3_BVU_2273/74 erzeugt (Abb. 29 A).

3. Ergebnisse

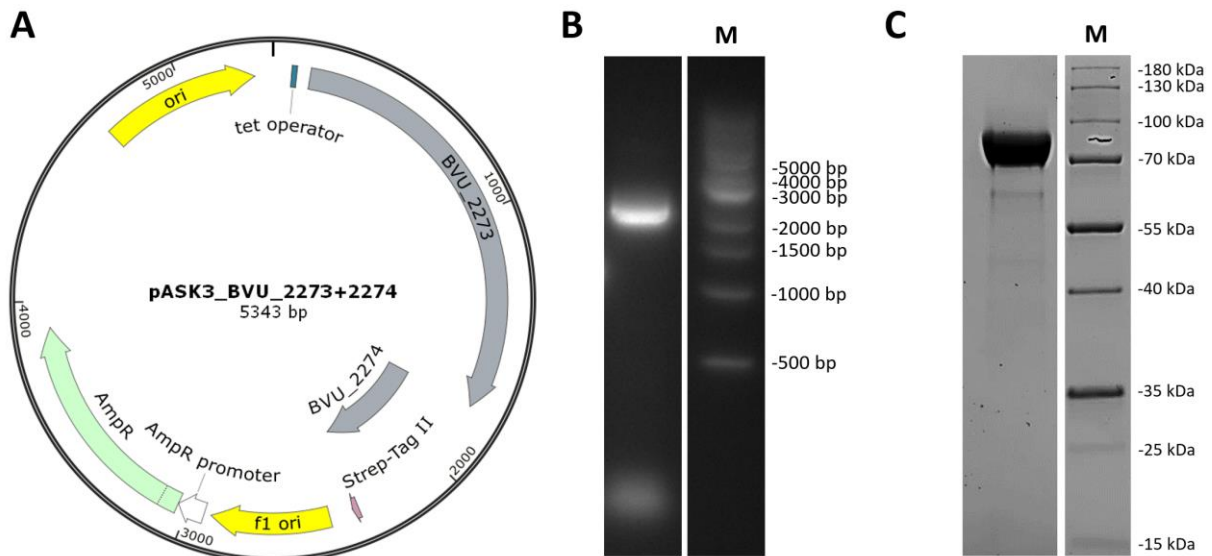


Abbildung 29: Konstruktion des Vektors pASK3_BVU_2276 und SDS-Page Analyse von BVU_2273/2274 [A] Plasmidkarte des Konstrukts pASK3_BVU_2273/74 für die heterologe Überproduktion in *E. coli* DH5 α . [B] Kolonie-PCR zum Nachweis des Konstrukts pASK3_BVU_2273/74 in *E. coli* DH5 α . Die Amplifizierung mit den Screening Primern pASK_for/rev führte zu einem Fragment mit der erwarteten Größe von 2386 bp. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). [C] Silberfärbung des aufgereinigten Protein BVU_2273+BVU_2274. In Form eines Heterodimers inklusive des Strep-Tags bestätigte die detektierte Bande die berechnete Größe von 81 kDa. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Nach einer Hitzeschock-Transformation in *E. coli* NEB® DH5 α konnte die korrekte Klonierung mittels einer Kolonie-PCR bestätigt werden. Die Verwendung der Primer pASK_for und pASK_rev (Kap. 2.2.2) führte zur Erzeugung eines Fragments mit einer erwartungsgemäßen Größe von 2386 bp (Abb. 29 B).

Durch die Fusion eines C-terminalen Strep-Tags, welcher auf dem pASK3 Vektor stromabwärts hinter dem inserierten Gen *bvu_2274* codiert ist, wurde das heterolog produzierte Protein über eine Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anhand der Proteinquantifizierung nach Bradford (Bradford, 1976) ergab sich eine Ausbeute von 63 mg/l Kultur in den Elutionsfraktionen. Um die Produktion und Reinheit der rekombinanten IOR zu bestätigen, wurden die aufgereinigten Proteine mittels SDS-Page und Silberfärbung analysiert (Abb. 29 C). Sonderbarerweise wurde eine einzelne Bande mit einer Größe von 81 kDa detektiert, was der berechneten Größe des Heterodimers, bestehend aus der α -Untereinheit sowie der β -Untereinheit inklusive Strep-Tag entsprach. Durch die Verwendung von β -Mercapto-Ethanol und durch 10-minütiges Aufkochen der Proben wurden die Proteine vor der SDS-PAGE bis auf die Primärstruktur denaturiert. Bei intakten Heterodimeren müssten dementsprechend nach einer Denaturierung eine separate Bande für jede der beiden Untereinheiten (59 kDa für BVU_2273 und 21 kDa für BVU_2274) sichtbar werden. Die codierende Sequenz beider Untereinheiten wurde in diesem Experiment ohne Unterbrechung in den Expressionsvektor kloniert, da die codierende Region von BVU_2274 um eine Base versetzt in der codierenden Region von BVU_2273 liegt. Bei der Translation der resultierenden mRNA wäre ein -1 programmiertes ribosomales Frameshifting

(Translation Slip) möglich, sodass, anstatt der zwei separaten Untereinheiten, ein großes Protein entsteht (Naphthine *et al.*, 2017).

3.4.2.3 Charakterisierung der Indolpyruvat Oxidoreduktase (IOR) BVU_2273/74 aus *P. vulgatus* BVU 2273/74

Die Charakterisierung der IOR erfolgte, aufgrund der Sauerstoff-empfindlichen Eisen-Schwefel Cluster im Protein, unter anaeroben Bedingungen. Zu diesem Zweck wurden alle Substanzen, die für die Enzymreaktionen relevant waren, in gelöster Form für 5 min mit N₂ anaerobisiert. Für die Bestimmung des optimalen Temperatur- und des optimalen pH-Bereichs wurde die Aktivität der IOR unter verschiedenen pH- sowie Temperatur-Bedingungen untersucht. Die Analyse des Temperatur-Optimums erfolgten mit 5 µg Enzym unter Verwendung von 40 mM McIlvaine Puffer (pH 7). Des Weiteren enthielt der Ansatz 5 mM Phenylpyruvat und 0,1 mM Coenzym A als Substrat sowie 5 mM Methylviologen (MV) als artifizieller Elektronenakzeptor. Weiterhin benötigt die IOR den Cofaktor Thiaminpyrophosphat (TPP). Daher wurde dem Ansatz außerdem 0,12 mM TPP zugeführt (Zhou *et al.*, 2015). Für die Ermittlung des pH-Optimums wurde das Enzym bei 37 °C untersucht und der pH-Wert wurde über den McIlvaine-Puffer variiert. Die Aktivität des Enzyms wurde über die Reduktion von MV_{ox} in Echtzeit erfasst. In reduzierter Form nimmt MV_{red} eine kräftige violette Farbe an, welche bei dem entsprechenden Absorptionsmaximum von 604 nm gemessen werden kann. Über die Absorptionsänderung ΔE_{604} wurde die Aktivität des Enzyms berechnet. Phenylpyruvat diente in der katalysierten Reaktion der IOR als Elektronendonator und wurde gemeinsam mit Coenzym A zu Phenylacetyl-Coenzym A umgesetzt (Abb. 30 A). Die Bestimmung des Temperaturoptimums erfolgte bei einem pH-Wert von 7. Die maximale IOR-Aktivität konnte bei einer Temperatur von 57 °C erreicht werden und betrug $9,8 \pm 0,6$ U/mg Enzym (Abb. 29 B). Bei höheren Temperaturen wurden weiterhin hohe Aktivität gemessen, jedoch verlor das Enzym bei Temperaturen über 62 °C deutlich an Stabilität. Dies ließ sich durch eine hitzebedingte Denaturierung des Enzyms zurückführen. Der optimale pH-Wert wurde bei einer Temperatur von 37 °C bestimmt (Abb. 29 C). Dabei konnte ein Aktivitätsmaximum von 5741 ± 759 U/mg Enzym bei einem pH-Wert von 9 ermittelt werden. Bei der Untersuchung des optimalen pH-Werts zeigte sich derselbe plötzliche Aktivitäts-Verlust, wie auch bei der Messung des Temperatur-Optimums festgestellt wurde.

3. Ergebnisse

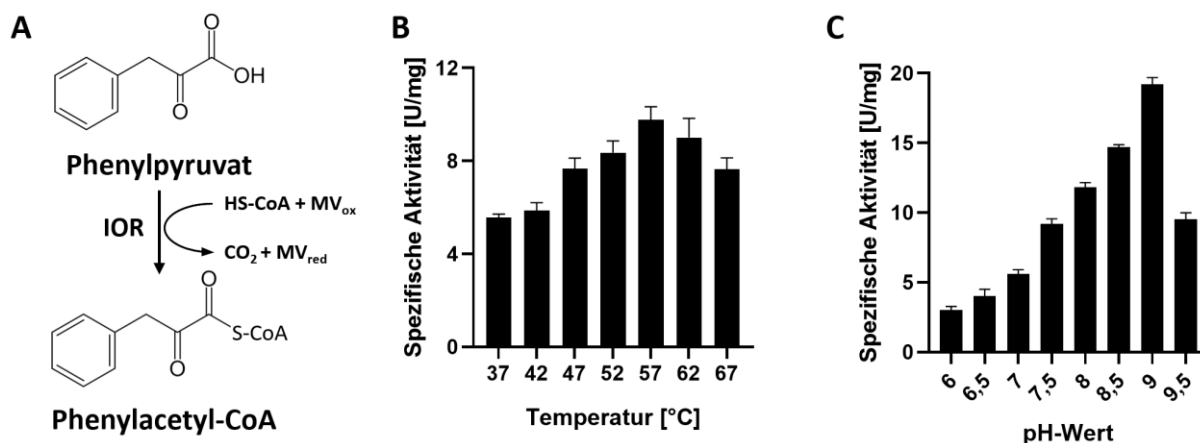


Abbildung 30: Reaktionsschema für die Aktivitätsmessungen der IOR aus *P. vulgatus* und Bestimmung des Temperatur-Optimums sowie pH-Optimums. [A] Katalysierte Reaktion der IOR aus *P. vulgatus*. Als artifizieller Elektronenakzeptor wurde Methylviologen verwendet. [B] Aktivitätsbestimmung der IOR bei verschiedenen Temperaturen und einem pH-Wert von 7. [C] Aktivitätsprofil der IOR bei variierendem pH-Wert. Das pH-Aktivitäts-Spektrum wurde unter Verwendung des Mcllvaine-Puffersystems generiert. Die Messungen erfolgten mit 5 µg aufgereinigtem Enzym in 40 mM Mcllvaine-Puffer. Als Substrate wurden 5 mM Phenylpyruvat und 0,1 mM Coenzym A eingesetzt. Für eine Erhöhung der Enzymaktivität wurden 0,12 mM Thiaminpyrophosphat zugegeben. Die Experimente wurden für jeden Messpunkt zweimal durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung.

Um zu untersuchen, mit welcher Geschwindigkeit die IOR Phenylpyruvat oxidiert, wurde eine Michaelis-Menten-Kinetik für das Enzym mit MV_{ox} als Akzeptor erstellt. Da *P. vulgatus* als Darmkommensal physiologischen Bedingungen von ~37 °C und pH-Werte von ~6,8 ausgesetzt ist, wurden bei diesen Bedingungen die maximale Umsatzrate V_{max} sowie der K_{M} -Wert der IOR bestimmt. Zu diesem Zweck wurde die Konzentration an Phenylpyruvat im Test variiert und es wurden jeweils die spezifischen Aktivitäten bei den entsprechenden Phenylpyruvat-Konzentrationen berechnet. Die spezifischen Aktivitäten wurden gegen die Phenylpyruvat-Konzentrationen aufgetragen, wodurch sich eine charakteristische Michaelis-Menten Kinetik ergab (Abb. 31).

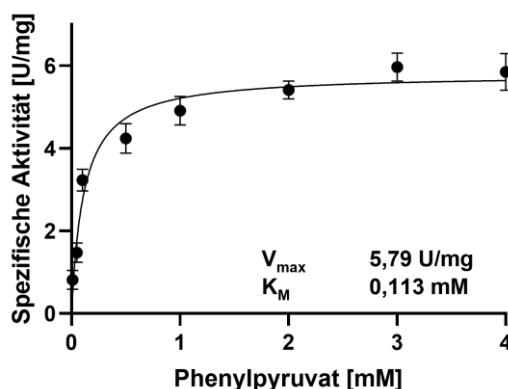


Abbildung 31: Michaelis-Menten-Kinetik zur Ermittlung des K_{M} – und V_{max} -Werts der IOR aus *P. vulgatus* in Abhängigkeit der eingesetzten Phenylpyruvat-Konzentration. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7 durchgeführt. Die Aktivität der IOR wurde über die Absorptionsänderung ΔE_{604} mit verschiedenen Phenylpyruvat-Konzentrationen gemessen. Für jeden Messpunkt wurde die Messung drei Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mithilfe nicht-linearer Regression mithilfe der Software GraphPad Prism 8.

3. Ergebnisse

Für die IOR konnte unter physiologischen Bedingungen eine maximale Umsatzrate von 5,79 U/mg Enzym berechnet werden. Außerdem zeigte das Enzym eine hohe Affinität zum Substrat Phenylpyruvat, da der K_M – Wert im mikromolaren Bereich lag und ein Wert von 113 μM annahm. Aus der maximalen Umsatzrate V_{max} ließ sich über die Stoffmenge an IOR, welche in einem mg vorhanden ist, die Wechselzahl K_{cat} ermitteln. Diese betrug $7,8 \text{ s}^{-1}$ (Substratumsetzungen/Sekunde), welche durch ein Molekül des Enzyms katalysiert werden kann. Unter physiologischen Bedingungen sind Enzyme äußerst selten mit Substrat gesättigt, sodass die Reaktionsgeschwindigkeit nicht nur davon abhängt, wie schnell die Enzymmoleküle ihr Substrat umsetzen, sondern auch davon, mit welcher Effizienz diese Umsetzung geschieht. Diese katalytische Effizienz wird durch den Quotienten aus K_{cat} und K_M ausgedrückt, und betrug in dieser Charakterisierung $69,3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

3.4.2.4 Heterologe Produktion und Aufreinigung der Phenylelessigsäure Coenzym A Ligase BVU_2276 aus *P. vulgatus*

Das nächste Enzym, welches näher charakterisiert werden sollte, war die Phenylacetyl-CoA Ligase BVU_2276 aus *P. vulgatus*. Für die heterologe Produktion und Aufreinigung wurde das Gen *bvu_2276* in den Überexpressionsvektor pASK5 kloniert. Unter Verwendung der Primer pASK5_BVU2276 fw/rev wurde Gen direkt aus dem Genom von *P. vulgatus* amplifiziert und über die Modifizierung der Primersequenzen wurde das Amplifikat stromauf- und abwärts der codierenden Region mit Schnittstellen für das Restriktionsenzym Bsal versehen. Die aufgereinigten Amplifikate sowie der Vektor pASK5 wurden mit den Restriktionsenzymen Bsal verdaut und anschließend zur Erzeugung des Konstrukts pASK5_BVU_2276 ligiert (Abb. 32 A). Das ligierte Konstrukt wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *E. coli* NEB® DH5 α eingebracht und die korrekte Klonierung wurde über eine Kolonie-PCR geprüft. Die Verwendung der Primer pASK_for und pASK_rev (Kap. 2.2.2) führte zur Erzeugung eines Fragments mit einer erwartungsgemäßen Größe von 1528 bp (Abb. 32 B). Die Fusion eines N-terminalen Strep-Tags, welches auf dem pASK5 Vektor stromaufwärts vor dem inserierten gen *bvu_2276* codiert, ermöglichte die affinitätschromatographische Aufreinigung des heterolog produzierten Proteins. Anhand der Proteinquantifizierung nach Bradford (Bradford, 1976) wurde eine Poteinausbeute von 27 mg/l Kultur ermittelt. Um die Größe und Reinheit des Enzyms zu bestätigen, wurden die aufgereinigten Proteine mittels SDS-Page und Silberfärbung analysiert (Abb. 32 C). Es konnte eine einzelne Bande mit einer Größe von etwa 48 kDa detektiert werden, was der berechneten Größe der Phenylacetyl-CoA Ligase in Kombination mit dem Strep-Tag entsprach. Neben der erwarteten Protein-Bande konnten keine weiteren Verunreinigungen festgestellt werden.

3. Ergebnisse

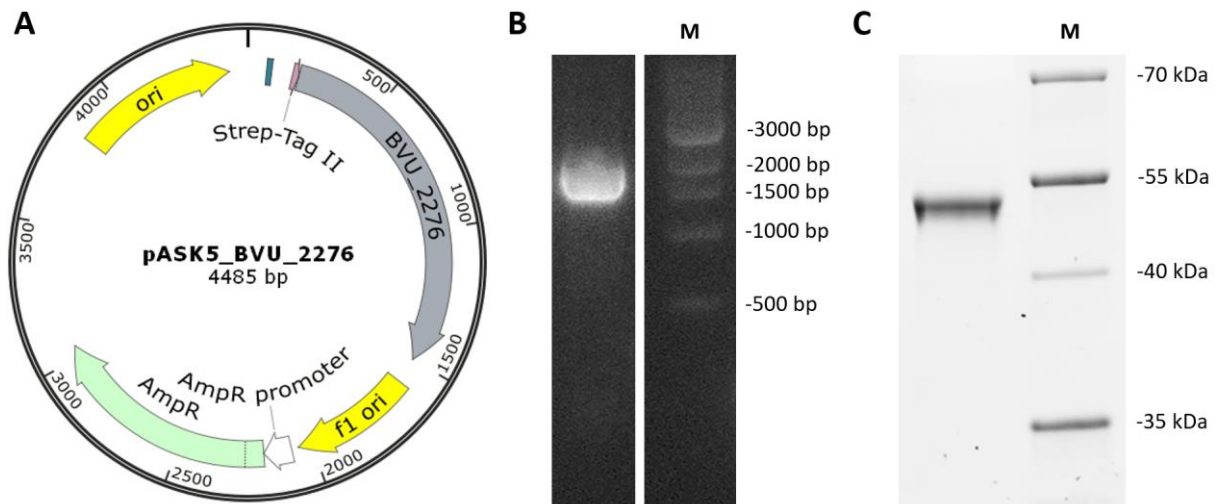


Abbildung 32: Konstruktion des Vektors pASK5_BVU_2276 und SDS-Page Analyse von BVU_2276. [A] Plasmidkarte des Konstrukts pASK5_BVU_2276 für die heterologe Überproduktion in *E. coli* DH5α. [B] Kolonie-PCR zum Nachweis des Konstrukts pASK5_BVU_2276 in *E. coli* DH5α. Amplifizierung führte zu einem Fragment mit der erwarteten Größe von 1528 bp. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). [C] Silberfärbung des aufgereinigten Protein BVU_2276. Die detektierte Bande entsprach der berechneten Größe von 48,7 kDa. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

3.4.2.5 Charakterisierung der Phenylacetyl-Coenzym A Ligase aus *P. vulgaris* (BVU_2276)

Gemäß Literatur katalysiert die Phenylacetyl-CoA Ligase unter natürlichen Bedingungen die Bildung von Phenylacetyl-CoA aus Phenylelessigsäure durch den Verbrauch von ATP (Martínez *et al.*, 1990; Luengo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007). Für den hier hypothetisierten Stoffwechselweg bedarf es jedoch der Rückreaktion, der Bildung von ATP sowie Phenylelessigsäure, ausgehend von Phenylacetyl-CoA (Abb. 33 A). Zur Überprüfung der Funktionalität des Enzyms wurde demnach zunächst die natürliche Reaktion untersucht, wobei die Aktivität durch einen diskontinuierlichen Nachweis von Pyrophosphat (PPi) nach einer modifizierten Methode von Kuang *et al.* (2007) ermittelt wurde. Nach Start der Enzym-Reaktion wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Proben für den PPi-Nachweis entnommen und aufbereitet. Die Detektion der PPi-Bildung erfolgte über die Absorption eines farbigen Molybdat-PPi-Komplexes bei einer Wellenlänge von 580 nm. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurden Reaktionsansätze in HEPES-Puffer (pH7) mit 25 µg des Enzyms bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Als Substrate wurden 0,25 mM ATP, 0,1 mM Coenzym A sowie 2 mM Phenylelessigsäure verwendet, wobei sowohl der K_M - als auch der V_{Max} -Wert für die Substrate ATP und Phenylelessigsäure ermittelt wurden (Abb. 33 B & C).

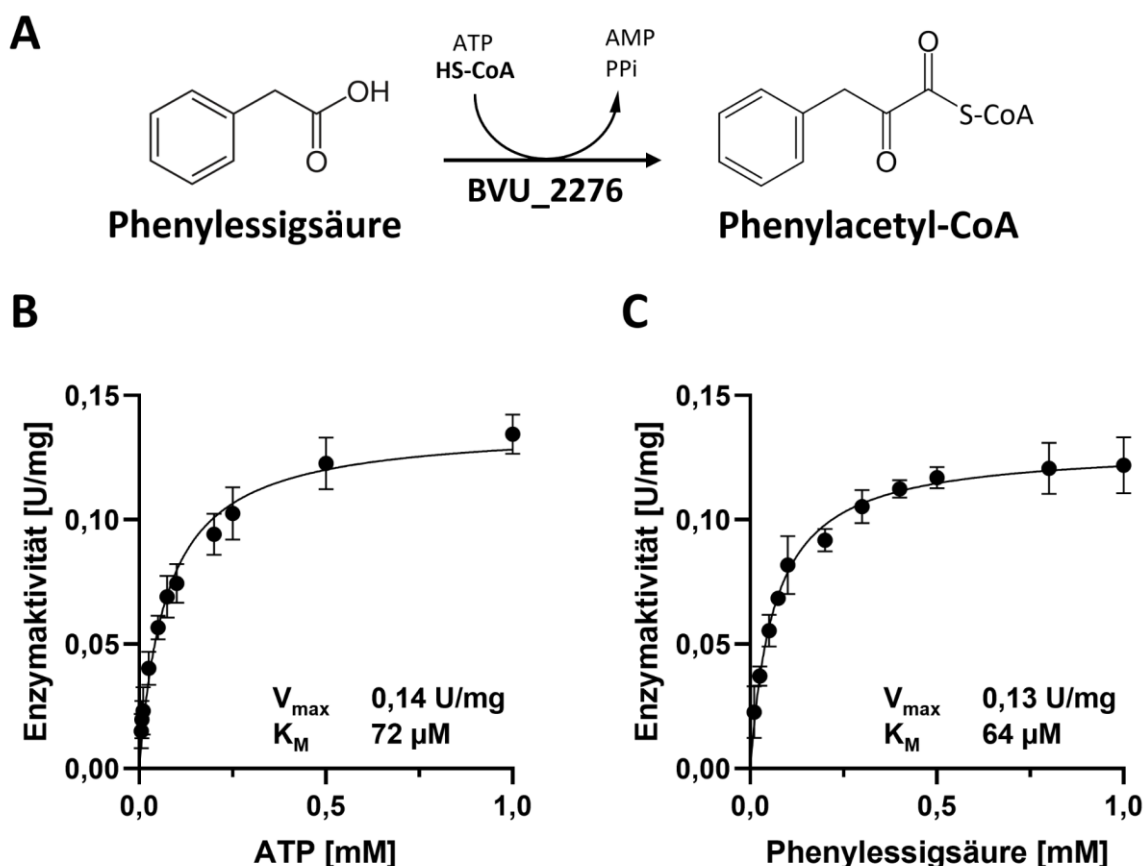


Abbildung 33: Reaktionsgleichung der Phenylacetyl-CoA Ligase aus *P. vulgatus* sowie Bestimmung des K_M - und $V_{\max}$ -Wertes für die Substrate ATP und Phenylelessigsäure. Die Messungen wurden unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 37 °C und einem pH-Wert von 7 durchgeführt. Die Aktivität der Phenylacetyl-CoA Ligase wurde diskontinuierlich über die Messung von freigesetztem PPi bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen. Durch die daraus resultierende Absorptionsänderung ΔE_{580} wurde die Enzym-Aktivität berechnet. [A] Reaktionsgleichung der katalysierten Reaktion der Phenylacetyl-CoA Ligase aus *P. vulgatus*. [B] Michaelis-Menten Kinetik für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und $V_{\max}$ für das Substrat ATP. [C] Michaelis-Menten Kinetik für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und $V_{\max}$ für das Substrat Phenylelessigsäure. Für jeden Messpunkt wurde die Messung drei Mal durchgeführt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mithilfe nicht-linearer Regression unter Verwendung der Software GraphPad Prism 8.

Die Maximale Umsatzrate $V_{\max}$ von BVU_2276 betrug für ATP 0,14 U/mg und der entsprechende K_M -Wert belief sich auf 73 μM . Zwar sprach der ermittelte K_M -Wert für eine hohe Affinität der Phenylacetyl-CoA Ligase zu dem Substrat ATP, jedoch bewegt sich die berechnete Geschwindigkeit auf einem sehr niedrigen Niveau. Für das Substrat Phenylelessigsäure konnten mit einem K_M -Wert von 64 μM und einem $V_{\max}$ -Wert von 0,13 U/mg ähnliche Werte ermittelt werden. Die Wechselzahl K_{cat} des Enzyms betrug für ATP 0,11 s^{-1} , und für Phenylelessigsäure 0,105 s^{-1} . Die daraus resultierenden katalytischen Effizienzen beliefen sich auf 1,55 $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ für ATP, und auf 1,63 $\text{s}^{-1} \text{mM}^{-1}$ für Phenylelessigsäure. Die Phenylacetyl-CoA-Ligase zeigte zwar in absoluten Werten eine effizientere Umsetzung von Phenylelessigsäure zu Phenylacetyl-CoA, jedoch lag die katalytische Effizienz auf einem sehr geringen Niveau. Grundsätzlich bestätigte dieses Experiment die Funktionalität des Enzyms sowie die Fähigkeit zur Katalyse der in der Literatur aufgeführte Reaktion.

3.4.2.6 Nachweis der Phenyllessigsäure-Bildung durch die Indolpyruvat-Oxidoreduktase in Kombination mit der Phenyllessigsäure-CoA-Ligase aus *P. vulgatus*.

Im nächsten Experiment sollte der kritische Reaktionsschritt des postulierten Stoffwechselweges zur Bildung von Phenyllessigsäure nachgewiesen werden. Dazu wurde ein Kombinationsassay durchgeführt, bei dem sowohl die IOR als auch die Phenylacetyl-CoA Ligase gleichzeitig eingesetzt wurden. Da das benötigte Substrat Phenylacetyl-CoA zum Zeitpunkt der Untersuchungen nicht kommerziell erhältlich war, musste es mithilfe der IOR als Hilfsenzym bereitgestellt werden. Für dieses Kombinationsassay wurde das Messverfahren für die Aktivität der IOR angepasst. Es wurde Coenzym A (50 μM) als limitierender Faktor im Assay eingesetzt, sodass die Reduktion von Methylviologen durch die IOR nach kurzer Zeit abbrach. Anschließend wurden dem Assay 0,2 mM AMP, 0,2 mM PPi sowie 25 μg der Phenylacetyl-CoA Ligase zugefügt. Nach dem Erliegen der Reaktion benötigt die IOR weiteres Coenzym A, um aus Phenylpyruvat Phenylacetyl-CoA zu synthetisieren. Im Laufe der Reaktion durch die Phenylacetyl-CoA Ligase wurde Phenylacetyl-CoA zu Phenyllessigsäure umgesetzt, und das freigesetzte CoA steht für den ersten Reaktionsschritt der IOR wieder zu Verfügung (Abb. 34 A).

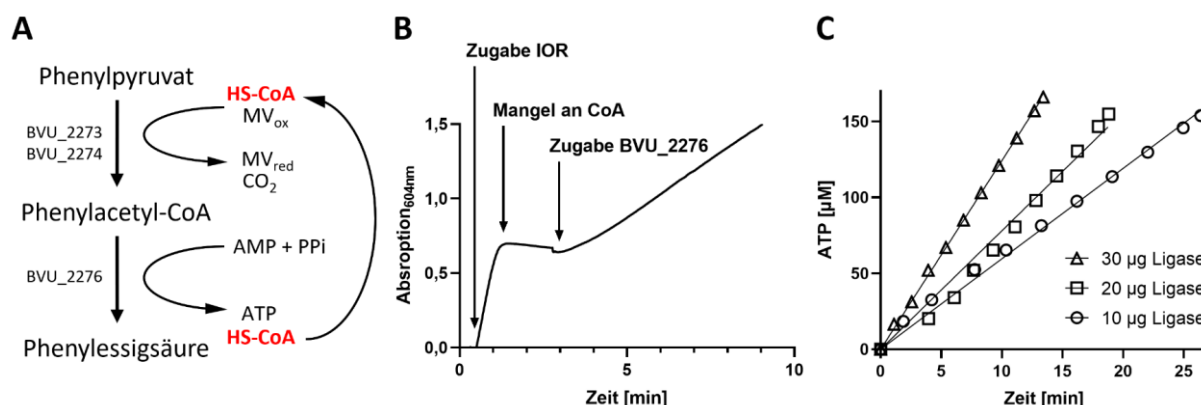


Abbildung 34: Kombinationsassay der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) mit der Indolpyruvat-Oxidoreduktase (BVU_2273/2274) aus *P. vulgatus*. [A] Schematische Darstellung der Reaktion im Kombinationsassay mit der IOR (BVU_2273/2274) und der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) aus *P. vulgatus*. [B] Qualitative Messung der Enzymaktivität der Phenylacetyl-CoA Ligase für die Produktion von Phenyllessigsäure, messbar durch die Reduktion von Methylviologen. Zunächst wurde dem Assay Coenzym A in limitierter Konzentration (50 μM) zugeführt. Nach der vollständigen Umsetzung von Coenzym A zu Phenylacetyl-CoA stoppte die Reaktion. Durch die Zugabe der Phenylacetyl-CoA Ligase konnte erneut eine Reduktion von Methylviologen gemessen werden. [C] Nachweis der ATP-Bildung im Kombinationsassay mit verschiedenen Konzentrationen der Phenylacetyl-CoA Ligase.

In einer qualitativen Aktivitätsmessung konnte tatsächlich gezeigt werden, dass die Phenylacetyl-CoA Ligase aus *P. vulgatus* zu der Rückreaktion von Phenylacetyl-CoA zu Phenyllessigsäure befähigt ist (Abb. 34 B). Somit konnte die Phenyllessigsäure-Bildung in *P. vulgatus* anhand dieses Kombinationsassays in vitro bestätigt werden. Weiterhin war über die Bildung von ATP eine Aktivitätscharakterisierung möglich (Abb. 34 C). Für die Phenylacetyl-CoA Ligase konnte über die Freisetzung von ATP eine Aktivität von $2,5 \pm 0,6$ U/mg unter den hier getesteten Bedingungen ermittelt werden. Somit war die Aktivität

3. Ergebnisse

von BVU_2276 für die Reaktion in Richtung Phenylelessigsäure um den Faktor 18 höher als es bei der Reaktion in Richtung Phenylacetyl-Coenzym A der Fall war. Zusammenfassend ließ sich feststellen, dass nicht nur die Reaktion von Phenylacetyl-CoA zu Phenylelessigsäure möglich war, sondern dass diese vermutlich auch die primäre Reaktion darstellt, die BVU_2276 katalysiert.

3.4.2.7 In Vivo Nachweis der Phenylelessigsäure-Bildung in *P. vulgatus*.

Nachdem *in vitro* die Stoffwechselwege von Phenylpyruvat zu Phenylelessigsäure nachgewiesen wurden, fehlte letztlich die Bestätigung der Phenylpyruvat-Bildung ausgehend von Phenylalanin in *P. vulgatus*. Für diesen Schritt bedarf es einer Aminotransferase, welche die Reaktion von Phenylalanin zu Phenylpyruvat katalysiert. Eine solche Aminotransferase (BVU_2276) ist zwar im gleichen Operon wie der IOR (BVU_2273/2274) sowie der Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) codiert, jedoch konnte der Funktionsnachweis für die Aminotransferase trotz aller Bemühungen nicht erbracht werden. Das Enzym ließ sich in kleinen Mengen durch eine Affinitätschromatographie aufreinigen, zeigte aber keinerlei Aktivität. Somit wurde die Rekonstruktion des Stoffwechsel-Wegs *in vitro* als nicht mehr zielführend erachtet. Stattdessen wurden weitere Bemühungen darauf gerichtet, den Stoffwechsel-Weg direkt in *P. vulgatus* nachzuweisen. Für die Evaluation dieser Theorie wurde die Aminotransferase BVU_2275 in den Shuttle-Vektor pG106 kloniert, um das Enzym unter Verwendung des *ldh*-Promotors in größeren Mengen homolog in *P. vulgatus* zu produzieren (Abb. 35 A, B).

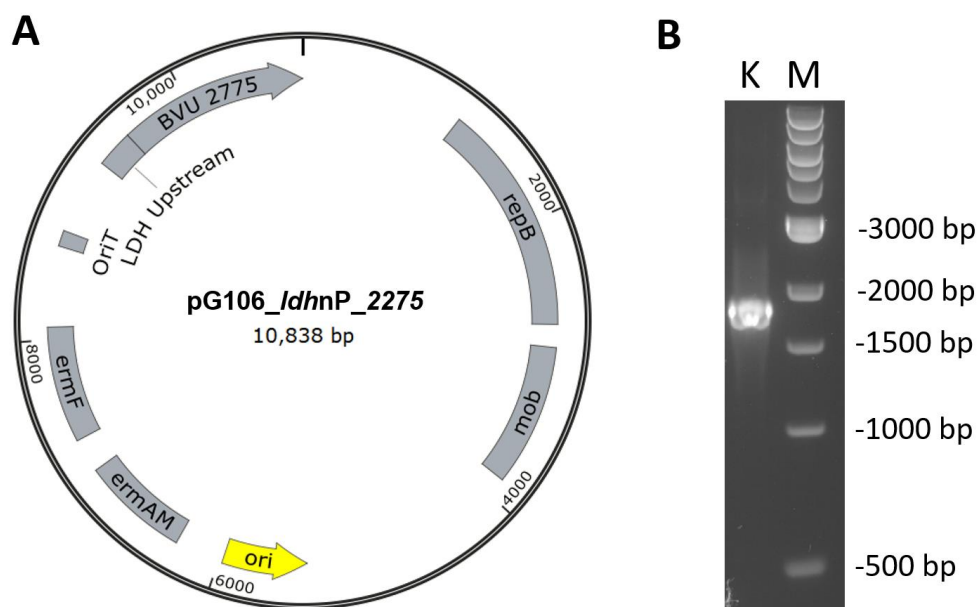


Abbildung 35: Konstruktion des Vektors pG106_ldhnP_2275 für die homologe Überproduktion der Aminotransferase BVU_2275 aus *P. vulgatus*. [A] Plasmidkarte von pG106_ldhnP_2275 für die homologe Überproduktion der Aminotransferase BVU_2275 aus *P. vulgatus*. [B] Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Aufnahme von pG106_ldhnP_2275 durch *P. vulgatus*. Unter Verwendung der Primer pG106 Screening fw/rev konnte ein Amplifikat der erwartungsgemäßen Größe von 1858 bp detektiert werden. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

3. Ergebnisse

Zunächst wurden Wachstumsexperimente durchgeführt um zu überprüfen, ob der *P. vulgaris* Wildtyp bereits ohne genetische Modifikation zur Bildung von Phenylelessigsäure befähigt ist. Zu diesem Zweck wurde der Organismus bis zur späten exponentiellen Phase in DMMG-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Phenylalanin (0-25 mM) kultiviert. Die anschließende HPLC-Analyse zeigte, dass Phenylelessigsäure in kleinen Mengen vom *P. vulgaris* Wildtyp gebildet werden kann (Abb. 36). Aufgrund dieser Beobachtung in Kombination der Charakterisierungsergebnisse der IOR und der Phenylacetyl-Coenzym A Ligase wurde angenommen, dass die Aminotransferase bei der Bildung von Phenylelessigsäure den limitierenden Faktor darstellen könnte.

Nach Klonierung und Transformation des Konstrukts pG106_*IdhnP*_2275 in *P. vulgaris* wurden die Wachstumsexperimente auf DMMG-Medium mit Phenylalanin-Supplementation wiederholt, um den Einfluss der BVU_2275-Überproduktion zu untersuchen. Abbildung 36 A zeigt schematisch den Stoffwechselweg für die Bildung von Phenylelessigsäure. Für die Analyse der Phenylelessigsäure-Bildung wurden mehrere Kulturen des *P. vulgaris* Wildtyps und des Plasmid-tragenden Stamms in 50 ml DMMG-Medium mit verschiedenen Konzentrationen an Phenylalanin (0 bis 25 mM) bis zum Erreichen der späten exponentiellen Phase bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden aus den Kulturen Proben entnommen und mithilfe von HPLC-Analysen hinsichtlich der Bildung von Phenylelessigsäure untersucht (Abb. 36 B).

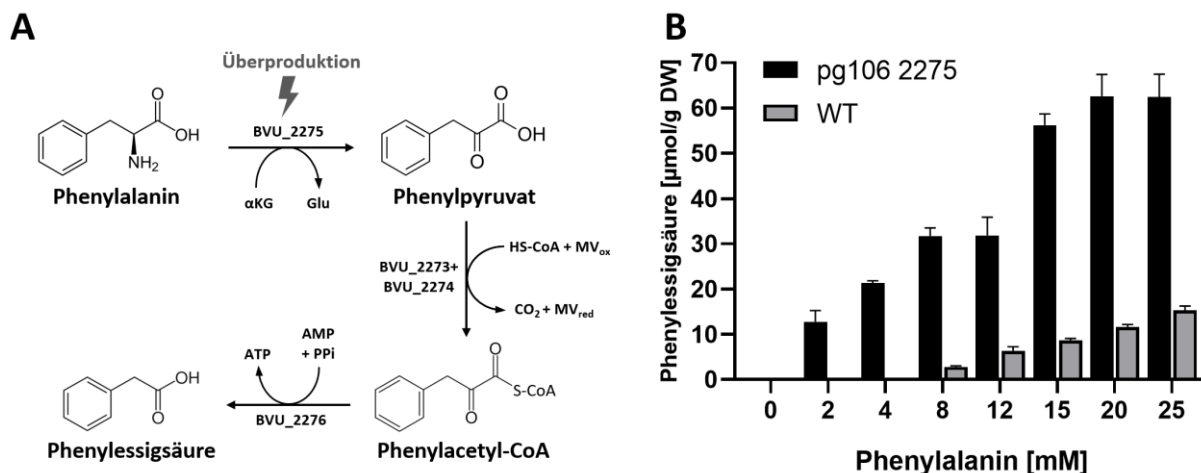


Abbildung 36: Synthese von Phenylelessigsäure in *P. vulgaris*. [A] Schematische Darstellung des Phenylalanin-Stoffwechsels mit Hinblick auf die Bildung von Phenylelessigsäure. [B] Vergleich der gebildeten Menge an Phenylelessigsäure zwischen *P. vulgaris* Wildtyp und der Plasmid-tragenden Variante *P. vulgaris* pG106 2275. Analyse der Phenylelessigsäure-Konzentrationen erfolgte über HPLC. Als Probenmaterial wurde Überstand von Kulturen aus der späten exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Die Kultivierung erfolgte in 50 ml DMMG-Medium mit zusätzlicher Supplementation von Phenylalanin in verschiedenen Konzentrationen.

Diese Wachstumsexperimente führten zu zwei wichtigen Erkenntnissen: Zum einen konnte beobachtet werden, dass die Supplementation von Phenylalanin essenziell für die Bildung von Phenylelessigsäure war. Weder im Wildtyp, noch in der Plasmid-tragenden Variante konnte eine Bildung

3. Ergebnisse

von Phenylelessigsäure ohne Zusatz von Phenylalanin nachgewiesen werden. Zum anderen wurde die Funktion der Aminotransferase BVU_2275 bestätigt. Während der Wildtyp erst bei 8 mM supplementiertem Phenylalanin eine geringe Konzentration an Phenylelessigsäure bildete ($2,7 \pm 0,4$ $\mu\text{mol/g TG}$), so konnte bei der Mutante bereits bei 2 mM zugesetztem Phenylalanin eine Produktion von $14,6 \pm 3,5$ $\mu\text{mol Phenylelessigsäure/g TG}$ ermittelt werden. Um die maximale Produktionsrate unter diesen Bedingungen festzustellen, wurde die Menge an Phenylalanin sukzessive auf bis zu 25 mM erhöht. Es zeigte sich, dass der Plasmid-tragende Stamm eine maximale Produktion von 60 ± 6 $\mu\text{mol/g TG}$ erreichen konnte. Der Wildtyp-Stamm hingegen erreichte eine maximale Produktion von $14,7 \pm 1,3$ $\mu\text{mol/g TG}$. Somit konnte die Produktion von Phenylelessigsäure mit der homologen Überproduktion der Aminotransferase BVU_2275 um das Vierfache gesteigert werden. Außerdem ließ sich die natürliche Fähigkeit der Phenylelessigsäure-Produktion von *P. vulgaris* nachweisen. Problematisch für eine biotechnologische Produktion sind jedoch die geringen Ausbeuten. Zwar konnte gezeigt werden, dass die Bildung von Phenylelessigsäure in *P. vulgaris* möglich ist, jedoch bewegt sich die Produktausbeute im mikromolaren Bereich.

3.4.3 Bildung von Zimtsäure und Cumarsäure

Neben der Bildung von Phenylelessigsäure besitzt *P. vulgaris* das Potenzial für die Bildung von zwei weiteren biotechnologisch interessanten Substanzen: Zimtsäure und Cumarsäure. Beide dieser Substanzen finden in industriellen Produktionen Anwendungen, z.B. bei der Herstellung von thermostabilen Kunststoffen (Kaneko *et al.*, 2006, Sariaslani, 2007) oder für die Verwendung als Vorläufer-Moleküle im Rahmen pharmakologischer Synthesen sowie Nahrungszusätze (Chemler and Koffas, 2008). Zwar können Zimt- und Cumarsäure bereits aus nachhaltigen Ressourcen wie Pflanzenresten gewonnen werden, jedoch benötigen die Extraktionsprozesse sehr viel Aufwand und sind nicht sehr gewinnbringend (Vitaly *et al.*, 2020). Daher existiert ein großes Interesse an der biotechnologischen Herstellung dieser beiden Substanzen. Grundsätzlich basieren aktuelle Bestrebungen für die Produktion von Zimtsäure und Cumarsäure darauf, Pflanzenproteine aus dem Phenylpropanoid-Metabolismus heterolog in anderen Organismus zu produzieren (Vargas-Tah *et al.*, 2015). In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob und in welchem Ausmaß sich *P. vulgaris* sich für diese biotechnologische Anwendung eignet.

3.4.3.1 Bioinformatische Analysen zu Ammoniak Lyasen in *P. vulgaris*

Die prominenteste Enzymklasse für die Bildung von Zimt- und Cumarsäure wird als Ammoniak Lyase bezeichnet [EC 4.3.1.X]. Diese Enzymklasse ist in der Lage die Aminogruppe aus Histidin, Phenylalanin oder Tyrosin zu eliminieren (Abb. 37). Primär existiert diese Proteinfamilie in Pflanzen und ist dort verantwortlich für den ersten Schritt der Synthese von Polyphenolen (Fritz *et al.*, 1976). Die Produkte dieser Enzymklasse hängen vom eingesetzten Substrat ab, und für jedes Substrat existiert in der Regel

3. Ergebnisse

ein respektives Enzym. So entsteht aus Histidin Urocaninsäure durch eine Histidin Ammoniak Lyase (HAL [EC 4.3.1.3]), aus Phenylalanin entsteht Zimtsäure durch eine Phenylalanin Ammoniak Lyase (PAL [EC 4.3.1.25]), und aus Tyrosin wird Cumarsäure durch eine Tyrosin Ammoniak Lyase (TAL [EC 4.3.1.23]) gebildet.

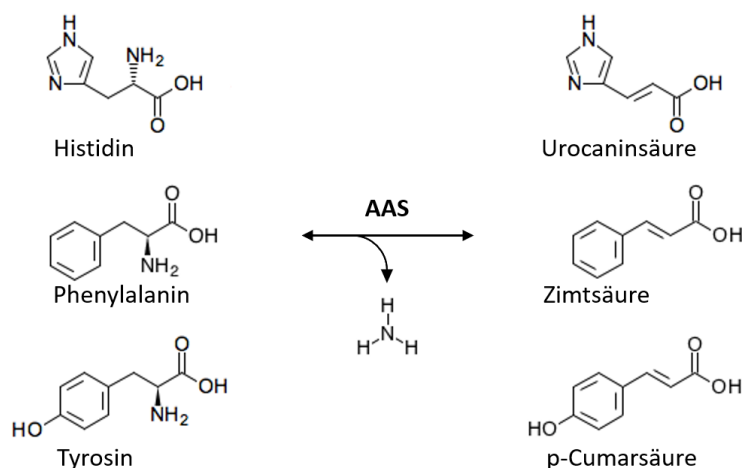


Abbildung 37: Eliminierung der Aminogruppe aus Histidin, Phenylalanin und Tyrosin durch eine aromatische Aminosäuren Ammoniak Lyase (AAL). Je nach Ausgangssubstrat entsteht durch die Eliminierung der Aminogruppe aus Histidin Urocaninsäure, aus Phenylalanin Zimtsäure und aus Tyrosin p-Cumarsäure.

Eine Besonderheit dieser Enzymklasse ist die prosthetische Gruppe 3,5-dihydro-5-methyldiene-4H-imidazol-4-one (MIO). MIO bildet sich autokatalytisch aus einem Alanin-Serin-Glycin Motif im Protein und ist bereits in der primären Aminosäuresequenz des Enzyms erkennbar. Daher eignete sich der Cofaktor MIO als Anhaltspunkt für die Identifizierung einer Ammoniak Lyase in *P. vulgatus*. Zum Zweck der Identifizierung wurden blastp-Alignments mit den Primärsequenzen bekannter Ammoniak Lyasen aus verschiedenen Organismen durchgeführt und mit dem Genom von *P. vulgatus* verglichen (Abb. 38).

		MIO	
HsaHAL	ETLKQVIEMFNASCLPYVPEKGTVG	ASGDLAPLSHLALGLVGEKMWSPKSG--WADAKY	285
FjTAL	SVINLMSELINKDITPLIFEHGGVG	ASGDLVQLSHLALVLIGEGEVFKGE---RRPTPE	170
BcAAL	ELVELLVKFINDIFPYIPEHGSVG	ASGDLVQLAHIALTLIGEGEVFGGQ---LQPTAQ	169
PvHAL	ELALLITEFINRGITPYVPEHGSVG	ASGDLVQLAHIALTLIGEGEVFGGK---KRDTS	107
NpHAL	ELIQRIETFLNAGVTPHVYEFSGIS	ASGDLVPLSYITGALIGLDPSTVDFDGKEMDAVT	201
ZmPAL	EILEAITKLLNTGVSPCLPLRGTT	ASGDLVPLSYIAGLITGRPNAQAVTVDGRKVDAAE	223
PcPAL	EILEAITKFLNQNITPCLPLRGTT	ASGDLVPLSYIAGLLTGRPNSKAVGPTGVILSPEE	236
AtPAL	EILEAITSFLNNITPSLPLRGTT	ASGDLVPLSYIAGLLTGRPNSKATGPNGEALTAE	245
	.	: : * . * : * : * * * . * : : : : : *	

Abbildung 38: Multisequenzvergleich verschiedener aromatischer Aminosäuren Ammoniak Lyasen (AAL). Gezeigt ist ein Ausschnitt des Alignments mit Markierung des charakteristischen Motifs für die Bildung der prosthetischen Gruppe MIO. HsaHAL: Histidin Ammoniak Lyase aus *Homo sapiens* (hsa:3034); FjTAL: Tyrosin Ammoniak Lyase aus *Flavobacterium johnsoniae* (fjoh_1109); BcAAL: Aromatische Ammoniak Lyase aus *Bacteroides cellulosilyticus* (BcellWH2_03919); PvHAL: Histidine Ammoniak Lyase aus *P. vulgatus* (bvu_1010); NpHAL: Histidin Ammoniak Lyase aus *Nostoc punctiforme* (npun_R2068); ZmPAL: Phenylalanin Ammoniak Lyase aus *Zea mays* (zma:542258); PcPAL: Phenylalanin Ammoniak Lyase aus *Petroselinum crispum* (ag:CAA68938); AtPAL: Phenylalanin Ammoniak Lyase aus *Arabidopsis thaliana* (at2g37040).

3. Ergebnisse

Anhand dieser Analyse konnte ein Gen in *P. vulgatus* identifiziert werden, welches das charakteristische MIO-Motif aufwies und als Histidin Ammoniak Lyase annotiert war (*bvu_1010*). Für die Produktion von Zimt- und Cumarsäure wird jedoch eine PAL, bzw. eine TAL benötigt. Die HAL BVU_1010 wurde bisher nur bioinformatisch annotiert, daher wurde in den folgenden Experimenten das Substratspektrum, das Produktspektrum und die kinetischen Parameter von BVU_1010 untersucht.

3.4.3.2 Heterologe Produktion und Aufreinigung von BVU_1010

Für eine nähere Charakterisierung des Enzyms BVU_1010 wurde das Gen *bvu_1010* in den Überexpressionsvektor pASK IBA 3 (IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland) kloniert. Das Gen *bvu_1010* wurde mit den Primern pASK3_1010_fw/rev aus dem Genom von *P. vulgatus* amplifiziert, und über die Primersequenzen wurde dem Amplifikat eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym BsaI stromaufwärts und stromabwärts der codierenden Region angefügt. Durch den Verdau der aufgereinigten Amplifikate und des pASK3 Vektors mit dem Restriktionsenzym BsaI und anschließender Ligation wurde das Konstrukt pASK3_BVU_1010 generiert (Abb. 39 A). Zum Zweck der Proteinproduktion wurde das Plasmids über Hitzeschock-Transformation in *E. coli* DH5α eingebracht. Die Verwendung der Primer pASK_for/rev (Kap. 2.2.2) führte zur Erzeugung eines Fragments mit einer erwarteten Größe von 1607 bp, und bestätigte somit die korrekte Klonierung des Konstrukts (Abb. 39 B).

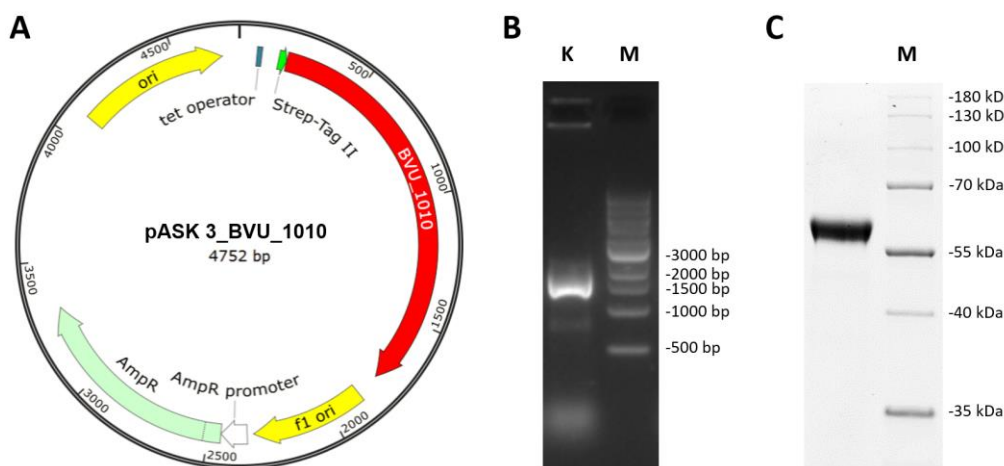


Abbildung 39: Konstruktion des Vektors pASK_BVU_1010 und SDS-Page Analyse von BVU_1010. [A] Plasmidkarte des Konstrukts pASK_BVU_1010 für die heterologe Überproduktion in *E. coli* DH5α. [B] Kolonie-PCR zum Nachweis des Konstrukts pASK_BVU_1010 in *E. coli* DH5α. Die Amplifizierung unter Verwendung der Primer pASK_for/rev führte zu einem Fragment mit der erwarteten Größe von 1607 bp. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). [C] Silberfärbung des aufgereinigten Protein BVU_1010. Die SDS-PAGE Analyse ergab eine einzige Bande mit der erwarteten Größe von 58 kDa. M: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland).

Die Aufreinigung von BVU_1010 erfolgte mittels Affinitätschromatographie anhand des C-terminalen Strep-Tags, welcher auf dem pASK 3 Vektor stromabwärts vor dem inserierten Gen *bvu_1010* codiert.

3. Ergebnisse

Die Proteinausbeute betrug nach Bradford (Bradford, 1976) 51 mg/l Kultur. Für die Bestätigung der Größe und Reinheit des Proteins wurde das aufgereinigte Enzym mittels SDS-Page und Silberfärbung analysiert (Abb. 39 C). Es konnte eine einzelne Bande mit einer Größe von etwa 58 kDa detektiert werden, was der berechneten Größe der Histidin Ammoniak Lyase BVU_1010 in Kombination mit dem Strep-Tag entsprach.

3.4.3.3 Untersuchung der möglichen Substrate und Produkte von BVU_1010

Nach Aufreinigung des Proteins BVU_1010 aus *P. vulgatus* wurde zunächst das Substrat- und Produktspektrum des Enzyms untersucht. Obwohl BVU_1010 als Histidin-Ammoniak-Lyase annotiert wurde, ist dies bisher nicht durch genauere Untersuchungen bestätigt worden. Daher wurde die Aktivität des Enzyms qualitativ mit den drei möglichen Substraten Phenylalanin, Tyrosin und Histidin getestet (Abb. 40 A). Für diese Analysen wurden 10 µg Protein in 50 mM HEPES-Puffer (pH 7) mit 20 mM des jeweiligen Substrats verwendet. Die Enzymaktivität konnte in Echtzeit über das Absorptionsmaximum des entsprechenden Produkts gemessen werden. Dabei beträgt das Absorptionsmaximum von Cumarsäure 310 nm, das Maximum von Zimtsäure 295 nm und das Maximum von Urocaninsäure 277 nm. Es konnte beobachtet werden, dass BVU_1010 entgegen der Annotation keinerlei Aktivität mit Histidin als Substrat zeigte. Dafür wurde die Umsetzung von Phenylalanin und Tyrosin bestätigt, wobei das Enzym eine deutlich höhere Aktivität mit Tyrosin als mit Phenylalanin aufwies.

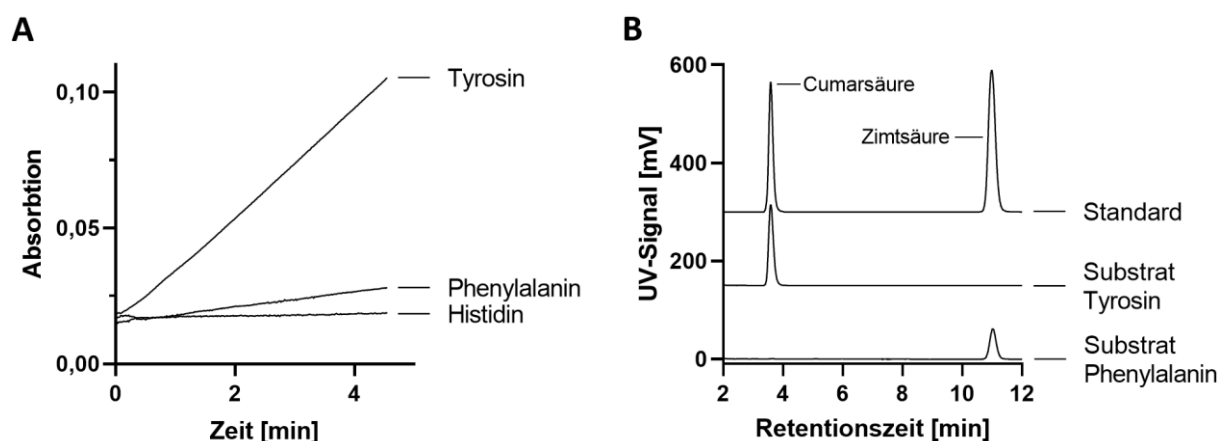


Abbildung 40: Analyse der möglichen Substrate und Produkte der Histidin Ammoniak Lyase BVU_1010 aus *P. vulgatus*. [A] Identifizierung des primären Substrats von BVU_1010. Der Ansatz beinhaltete 50 mM HEPES Puffer (pH 7), 20 mM Tyrosin/Phenylalanin/Histidin als Substrat und 10 µg BVU_1010. Die Bildung der Produkte erfolgte bei den Wellenlängen der respektiven Absorptionsmaxima: 310 nm bei Cumarsäure, 295 nm bei Zimtsäure und 277 nm bei Urocaninsäure. [B] Bestätigung des Produktspektrums von BVU_1010 mittels HPLC-Analyse. Es wurden 2 mM Zimtsäure und Cumarsäure als Standard-Vergleich eingesetzt. Als Proben diente Material aus dem Enzym-Assay mit Phenylalanin und mit Tyrosin als verwendetes Substrat.

Die Bildung von Zimtsäure aus Phenylalanin sowie die Bildung von Cumarsäure aus Tyrosin wurde zusätzlich über HPLC-Analysen bestätigt (Abb. 40 B). Es wurde Material aus dem Enzym-Assay mit Standardsubstanzen von Zimt- und Cumarsäure verglichen. So konnte das Produktspektrum von

3. Ergebnisse

BVU_1010 eindeutig bestätigt werden. Der Einsatz von Tyrosin als Substrat führte zu der Bildung von Cumarsäure und die Verwendung von Phenylalanin als Substrat führte zu der Bildung von Zimtsäure. Basierend auf diesem Ergebnis lässt sich das Enzym nicht als Histidin Ammoniak Lyase (HAL) charakterisieren, sondern als Tyrosin Ammoniak Lyase. Aufgrund der Strukturellen Ähnlichkeit von Tyrosin und Phenylalanin ist die Spezifität von TAL sowie PAL oft nicht ausreichend, sodass TAL auch Phenylalanin als Substrat akzeptieren. Im Gegenzug können auch PAL mit Tyrosin Aktivität zeigen, jedoch ist die Aktivität mit dem sekundären Substrat deutlich geringer (Rösler *et al.*, 1997).

3.4.3.4 Bestimmung der kinetischen Parameter von BVU_1010

Die heterolog produzierte TAL aus *P. vulgaris* wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Desaminierung von Tyrosin und Phenylalanin untersucht. Zu diesem Zweck wurden die kinetischen Parameter des Enzyms BVU_1010 für diese beiden Substrate bestimmt. Um die optimalen Reaktionsbedingungen zu ermitteln wurde die Aktivität des rekombinanten Proteins in Assays mit variierender Temperatur oder pH-Werten bestimmt (Abb. 41). Bei diesen Experimenten wurde deutlich, dass das Enzym die höchste Aktivität unter Verwendung von Tyrosin als Substrat erreicht.

Bezüglich des Temperaturoptimum konnte eine leichte Verschiebung in Abhängigkeit des Substrats beobachtet werden. Unter Verwendung von Tyrosin als Substrat wurde eine optimale Aktivität des Enzyms mit $0,49 \pm 0,04$ U/mg bei einer Temperatur von 61 °C ermittelt (Abb. 41 A). Die Verwendung von Phenylalanin als Substrat verschob das Temperaturoptimum auf 67 °C, bei welcher eine Aktivität von $0,03 \pm 0,003$ U/mg berechnet wurde (Abb. 41 B).

3. Ergebnisse

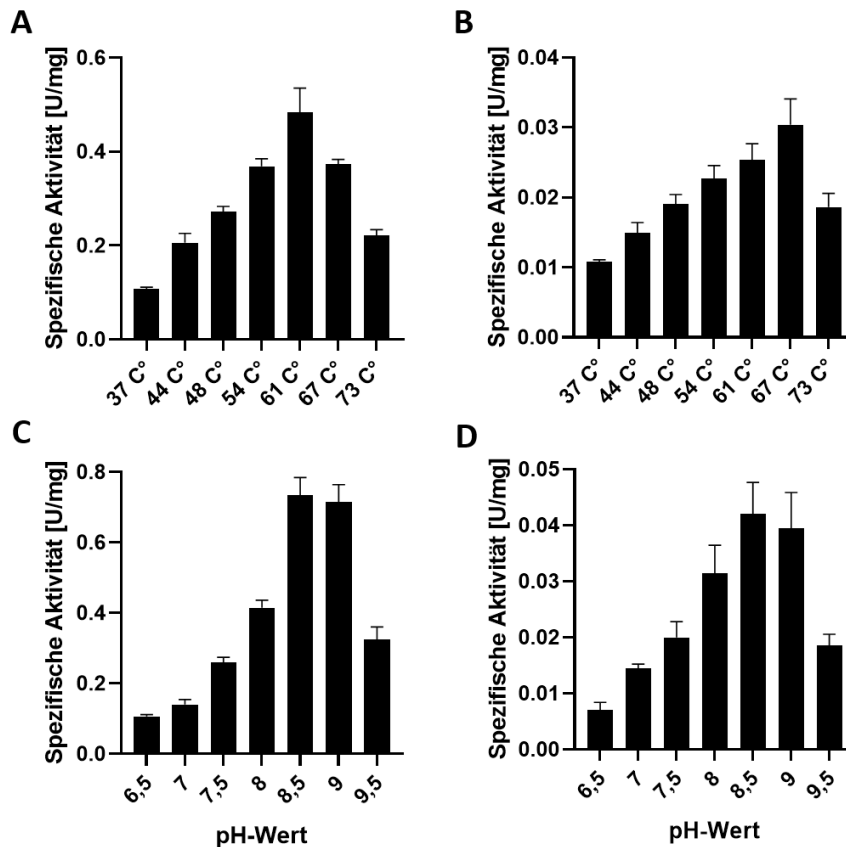


Abbildung 41: Aktivität der TAL BVU_1010 aus *P. vulgatus* in Abhängigkeit von Temperatur, pH-Wert und Substrat. Die Charakterisierung erfolgte mit 10 µg Enzym und 20 mM Substrat. Für die Bestimmung des optimalen pH-Wertes wurden die Ansätze in 40 mM Mcllvaine Puffer mit verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Experimente erfolgten für jeden Messpunkt zweimal. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung. [A] Aktivitätsbestimmung der TAL bei verschiedenen Temperaturen unter Verwendung von Tyrosin als Substrat. [B] Aktivitätsbestimmung der TAL bei verschiedenen Temperaturen mit Phenylalanin als Substrat. [C] Bestimmung des optimalen pH-Wertes unter Verwendung von Tyrosin als Substrat. [D] pH-Optimum von BVU_1010 mit Phenylalanin als Substrat.

Das Aktivitätsprofil bei verschiedenen pH-Wert unterschied sich hingegen kaum zwischen den beiden Substraten. Die höchste Aktivität konnte, unabhängig von Tyrosin oder Phenylalanin als verwendetes Substrat, zwischen einem pH-Wert von 8,5 und 9 nachgewiesen werden. Bei einem pH-Wert von 8,5 unter Verwendung von Tyrosin als Substrat wurde eine Aktivität von $0,74 \pm 0,04$ U/mg ermittelt. Wurde Phenylalanin als Substrat verwendet, so betrug die Aktivität $0,04 \pm 0,004$ U/mg.

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die Substratkonzentrationen für die Aktivitätsberechnungen variiert. Die Bestimmung dieser Parameter erfolgte bei physiologischen Bedingungen von 37 °C und einem pH-Wert von 7, um die natürlichen Begebenheiten des Dickdarms als Lebensraum von *P. vulgatus* widerzuspiegeln. Durch die Auftragung einer nicht-linearen Regression nach Michaelis-Menten konnten die K_M -Werte sowie die V_{max} -Werte für beide Substrate bestimmt werden (Abb. 42)

3. Ergebnisse

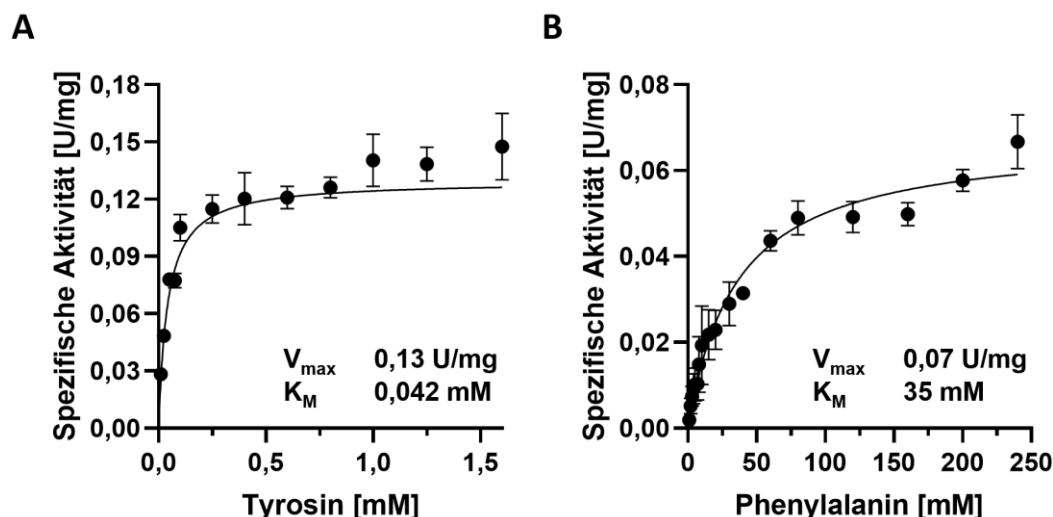


Abbildung 42: Bestimmung des K_M - und V_{max} -Wertes von BVU_1010 für die Substrate Tyrosin und Phenylalanin. Die Messungen erfolgten mit 10 μ g Enzym bei einer Temperatur von 37 °C und in Kalium-Phosphat-Puffer (pH 7). Die TAL-Aktivität von BVU_1010 wurde über die Absorptionsänderung ΔE_{310} gemessen, und die PAL-Aktivität über die Absorptionsänderung ΔE_{295} . Für die Erstellung einer Michaelis-Menten Kinetik wurden die Substrat-Konzentration variiert. Jeder Messpunkt wurde zweimal gemessen und die daraus resultierende Standardabweichung wird durch die Fehlerbalken repräsentiert. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgte mithilfe nicht-linearer Regression mithilfe der Software GraphPad Prism 8. [A] Michaelis-Menten Kinetik für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} für das Substrat Tyrosin. [B] Michaelis-Menten Kinetik für die Bestimmung der kinetischen Parameter K_M und V_{max} für das Substrat Phenylalanin.

Die Maximale Umsatzrate V_{max} betrug für Tyrosin 0,13 U/mg und der ermittelte K_M -Wert belief sich auf 0,042 mM. Zwar entsprach der K_M -Wert einer hohen Affinität von BVU_1010 mit dem Substrat Tyrosin, jedoch bewegte sich die berechnete maximale Geschwindigkeit auf einem sehr niedrigen Niveau. Im Vergleich dazu zeigte das Substrat Phenylalanin einen deutlichen Unterschied mit einem K_M -Wert von 36 mM und einem V_{max} -Wert von 0,05 U/mg. BVU_1010 verfügt somit über eine um den Faktor 100 höhere Affinität und eine 2,6-fache Umsatzrate mit Tyrosin als Substrat im Vergleich zu Phenylalanin. Durch die Bestimmung der Wechselzahl K_{cat} wurde gezeigt, dass BVU_1010 pro Molekül Enzym mit Phenylalanin 0,07, und mit Tyrosin 0,13 Substrat-Umsetzungen/Sekunde katalysiert. Somit setzt das Enzym fast doppelt so viele Moleküle Tyrosin wie Phenylalanin in einer Sekunde um. Die daraus resultierende katalytische Effizienz verdeutlichen noch einmal, dass es sich bei Tyrosin um das primäre Substrat von BVU_1010 handeln muss: für Phenylalanin betrug die Effizienz $0,002 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$, und für Tyrosin $3 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Diese kinetischen Parameter charakterisieren das Enzym BVU_1010 eindeutig als Tyrosin-Ammoniak-Lyase mit geringer Phenylalanin-Ammoniak-Lyase-Aktivität. Jedoch stellt die geringe maximale Aktivität für eine biotechnologische Anwendung dieses Enzyms ein Problem dar. Obwohl BVU_1010 eine eindeutige TAL-Aktivität mit hoher Affinität zu Tyrosin aufwies, ist das Enzym aufgrund der niedrigen Umsatzrate ungeeignet für die Anwendung in der Cumarsäure-Produktion. Die Bedingungen für kinetische Analysen unterscheiden sich jedoch häufig von *in vivo* Bedingungen, daher könnte die Leistungsfähigkeit von BVU_1010 im Organismus vorteilhaftere Dimensionen annehmen.

3. Ergebnisse

(Jendresen *et al.*, 2015). Um zu überprüfen, ob die Aktivität des Enzyms unter in vivo Bedingungen für eine Produktion geeignet ist, sollte BVU_1010 homolog in *P. vulgatus* überproduziert werden.

3.4.3.5 Klonierung des Shuttle-Vektors pG106_*ldh*nP_*bvu*1010

Analog zu der Überproduktion der PFL (*bvu*_2880) in *P. vulgatus*, welche zu einer erhöhten Bildung von Formiat führte, wurde nun versucht die Produktion von Zimt- und/oder Cumarsäure durch die homologe Überexpression von *bvu*_1010 in *P. vulgatus* zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wurde das Gen *bvu*_1010 mittels einer DNA-Assemblierung in den Shuttle Vektor pG106 kloniert. Durch die Verwendung der Primer AssBVU_1010_fw/rev (Kap. 2.2.2) wurde das Gen *bvu*_1010 aus chromosomaler DNA von *P. vulgatus* mit komplementären Enden zum Vektorrückgrat amplifiziert. Die Generierung des Vektorrückgrats erfolgte über die Primer pg106 LDHnp BB_fwd/rev. Unter Anwendung des DNA Assembly Master Mix wurde das Gen *bvu*_1010 mit dem Vektorrückgrat pG106 in korrekter Orientierung verknüpft. Für die Expression des *bvu*_1010-Gens diente der konstitutive Promotor der Lactat Dehydrogenase (*ldh*, *bvu*2499) aus *P. vulgatus* (Lück & Deppenmeier, 2022). Das fertige Konstrukt pG106_*ldh*nP_*bvu*1010 wurde mittels Hitzeschock-Transformation in *E. coli* NEB® 10β transferiert und vervielfältigt. Die korrekte Assemblierung von pG106 konnte durch eine Kolonie-PCR nach Einbringung in *E. coli* 10β bestätigt werden (Abb. 43 B). Für die PCR wurden die Primer pG106 Screening fw/rev verwendet, welche den Integrationsbereich des *bvu*_1010-Gens auf dem Plasmid flankieren. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese wurde ein Fragment mit der erwarteten Größe von 2125 bp detektiert. Zusätzlich wurde die Nukleotid-Sequenz mittels Sequenzierung bestätigt.

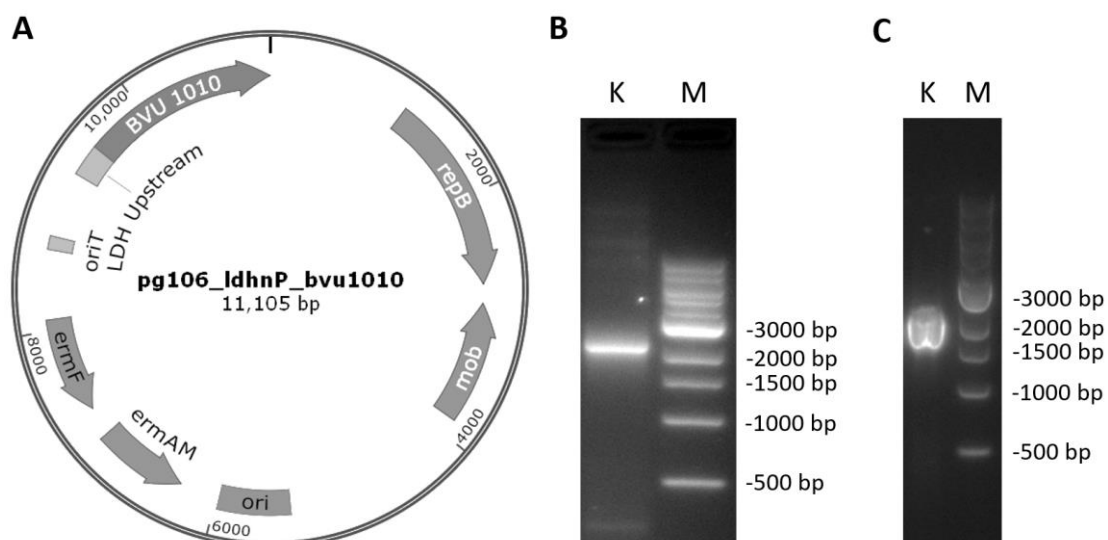


Abbildung 43: Plasmid-Karte des erstellten Plasmids pG106_*ldh*nP_*bvu*1010 und Kolonie-PCR. [A] Plasmidkarte von pG106_*ldh*nP_*bvu*1010. [B] Agarosegel nach Kontroll-PCR zum Nachweis der korrekten Konstruktion des Plasmids pG106_*ldh*nP_*bvu*1010. Die Primer pG106 Screening fw/rev flankieren den Integrationsbereich von *bvu*_1010 und wurden für dieses Screening verwendet. Die PCR führte zu einem Fragment mit einer erwartungsgemäßen Größe von 2125 bp. [C] Agarosegel nach Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer pG106 Screening fw/rev zum Nachweis der Aufnahme von pG106_*ldh*nP_*bvu*1010 durch *P. vulgatus*. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

3. Ergebnisse

P. vulgatus wurde mit dem Konstrukt durch Elektroporation transformiert, wie ebenfalls durch Kolonie-PCR nachgewiesen wurde (Abb. 43 C). Der daraus resultierende Stamm *P. vulgatus* pG106 1010 wurde anschließend mit dem *P. vulgatus* Wildtyp hinsichtlich der Transkript-Abundanz von *bvu_1010* sowie des Stoffwechsel-Endprodukt-Spektrums verglichen.

3.4.3.6 Transkriptabundanz *bvu_1010*

Für eine genauere Analyse der homologen Überproduktion von BVU_1010 in *P. vulgatus* wurde die Kopienzahl des *bvu_1010*-Gens zwischen dem Wildtypen und dem Plasmid-tragenden Stamm verglichen. Zu diesem Zweck wurde eine qPCR durchgeführt. Als Referenzgen wurde das für das ribosomale Protein L23 codierende Gen *bvu0803* aus *P. vulgatus* verwendet, da das entsprechende Protein als Bestandteil der Ribosomen während der exponentiellen Wachstumsphase konstant produziert wird. Zur Bestimmung der relativen Anzahl der *bvu_1010*-Gen-Kopien wurden die Gen-spezifischen Primer qPCR__BVU1010_fw/rev (Kap. 2.2.2) verwendet.

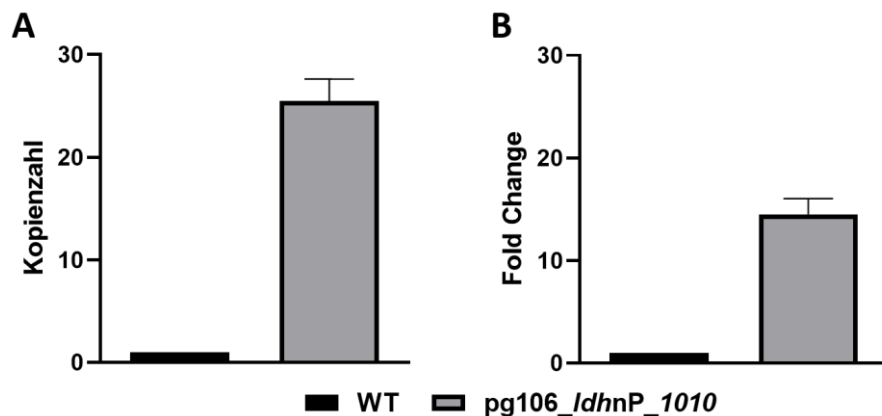


Abbildung 44: Kopienzahl und Transkript-Abundanz von *bvu_1010* in *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106 1010. [A] Um die Kopienzahl des *bvu_1010*-Gens zwischen dem Wildtyp und der Plasmid-tragenden Mutante zu vergleichen wurde eine qPCR durchgeführt. [B] Die relative Transkript-Menge des *bvu_1010*-Gens wurde mittels RT-qPCR analysiert. Δ CT-Werte stellen die Differenz des Ct-Werts des *bvu_1010*-Gens mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L23 (*bvu_0803*) dar. Für die Bestimmung der Verhältnisse an mRNA zum Wildtyp wurden die $\Delta\Delta$ CT-Werte berechnet und die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet. Die in dieser Abbildung gezeigten Ergebnisse wurden in zweifacher Ausführung mit DNA- oder RNA-Präparaten aus drei verschiedenen Kulturen ermittelt. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung.

Im Vergleich zum Wildtyp konnte im Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgatus* 1010 eine deutlich höhere Kopienzahl von *bvu_1010* festgestellt werden (Abb. 44 A). Konkret lag die Kopienzahl in der Mutante um den Faktor $25,5 \pm 1,5$ höher als im Wildtyp. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Präsenz des Plasmids einen signifikanten Einfluss auf das Transkriptionslevel, und somit auch auf die Expression von *bvu_1010* haben sollte. Neben der Quantifizierung der *bvu_1010*-Kopienzahl wurde ebenfalls die mRNA-Transkript-Abundanz von *bvu_1010* im Wildtyp sowie im Plasmid-tragenden Stamms untersucht. Für diese Analyse wurde die Gesamt-RNA aus Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase der jeweiligen Stämme isoliert. Die mRNA-Konzentration wurde mittels RT-qPCR

3. Ergebnisse

unter Verwendung der für *bvu_1010* spezifischen Primer bestimmt. Als Referenz wurde die Transkript-Menge des Gens *bvu_0803* (*ribL23*), welches für das ribosomale Protein L23 codiert, verwendet.

Trotz der erhöhten Kopienzahl des *bvu_1010*-Gens konnte in dem Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgaris* 1010 lediglich eine $15,3 \pm 0,8$ -fach höhere Transkript-Menge an *bvu_1010* mRNA im Vergleich zum Wildtyp ermittelt werden (Abb. 44 B). Diese Daten zeigen zwar, dass *bvu_1010* in der *shuttle*-Vektor basierten Mutante in erheblich größerer Kopienzahl vorlag, dies aber nicht zu einer deutlich erhöhten Transkriptmenge führte, wie es im Vergleich bei der Überexpression von *bvu_2880* zu erwarten war (Kapitel 3.3.2). Im Folgenden wurde untersucht, ob dieser geringe Einfluss, den der Shuttle-Vektor ausübte, dennoch einen Einfluss auf die Produktion von Zimt- oder Cumarsäure nahm.

3.4.3.7 Homologe Überproduktion von BVU_1010 in *P. vulgaris*

Abschließend wurde trotz der geringen Transkriptions-Level des Gens *bvu_1010* und der niedrigen Umsatzraten des Enzyms überprüft, ob sich der Plasmid-tragende Stamm *P. vulgaris* pG106 *bvu1010* für die Produktion von Zimt- oder Cumarsäure eignet. Zu diesem Zweck wurden Wachstumsexperimente in 50 ml DMMG-Medium durchgeführt. Um einen Mangel an Substrat für die Produktion auszuschließen wurde dem Medium für die Bildung von Zimtsäure zusätzlich 10 mM Phenylalanin, und für die Bildung von Cumarsäure 10 mM Tyrosin zugesetzt. Für die Auswertung wurden den Kulturen direkt nach Inokulation und während der späten exponentiellen Phase Proben für HPLC-Analysen entnommen. Als Standard wurde ein Mix aus Zimtsäure und Cumarsäure mit einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt (Abb. 45).

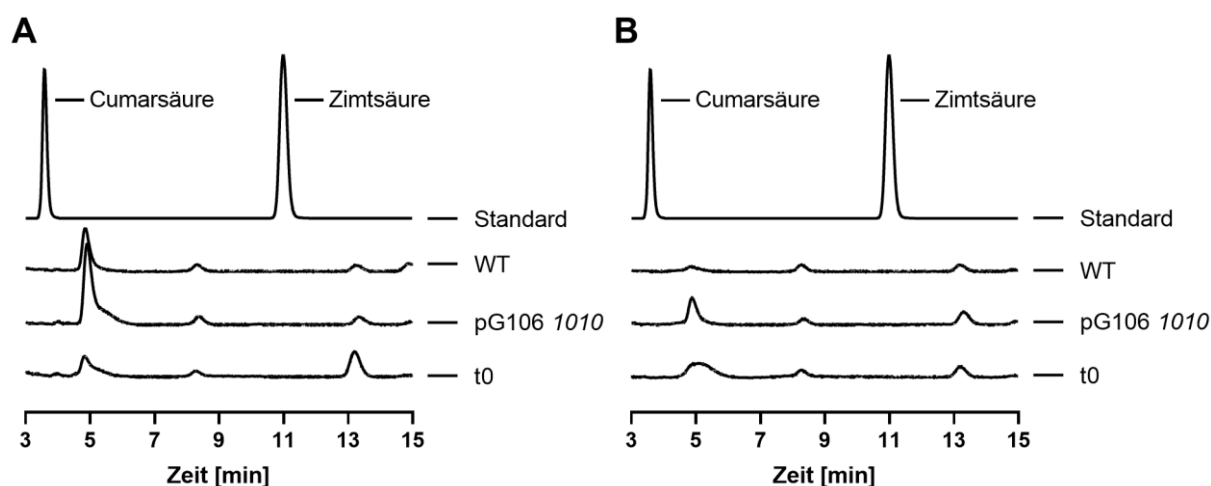


Abbildung 45: HPLC-Analyse von *P. vulgaris* hinsichtlich der Produktion von Cumarsäure und Zimtsäure. Gezeigt wird ein Vergleich zwischen dem Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgaris* pG106 1010 und *P. vulgaris* Wildtyp nach Wachstum auf DMMG + 10 mM Tyrosin [A] und 10 mM Phenylalanin [B]. Als Standard-Vergleich wurde ein Mix aus Cumarsäure und Zimtsäure in einer Konzentration von 0,5 mM eingesetzt.

Es konnte weder die Bildung von Cumarsäure (Abb. 45 A), noch die Bildung von Zimtsäure (Abb. 45 B) festgestellt werden. Unabhängig vom eingesetzten *P. vulgaris* Stamm zeigten die HPLC-Analysen

3. Ergebnisse

keinen Peak, welcher mit dem Standard vergleichbar war. Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass *P. vulgatus* pG106 1010 sowohl bei Wachstum auf Phenylalanin, noch deutlicher aber bei Wachstum auf Tyrosin bei einer Retentionszeit von 5 min ein nicht identifizierbares Produkt bildete. Dieses Produkt konnte jedoch nicht über die verfügbaren Standard-Substanzen identifiziert werden.

Es ließ sich aufgrund dieser Ergebnisse zusammenfassen, dass BVU_1010 entgegen der Annotation als Histidin Ammoniak Lyase, primär als Tyrosin Ammoniak Lyase mit geringer Phenylalanin Ammoniak Lyase-Aktivität fungiert, aber sich aufgrund der niedrigen Aktivität nicht als interessanter Hebel für eine Produktion von Cumarsäure in *P. vulgatus* eignete. In vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass sich der Shuttle-Vector pG106 in Kombination mit dem *ldh*-Promotor sehr gut für die Überexpression von Genen in *P. vulgatus* eignet. Die Anwendung von pG106 für die Überexpression von *bvu_1010* führte jedoch nur zu einer moderaten Erhöhung des Transkript-Levels, wodurch sich der gescheiterte Versuch für die Bildung von Cumarsäure und Zimtsäure erklären ließe.

3.5 Evaluierung von Fluoreszenz-Tags für die anaerobe Visualisierung von Proteinen in *P. vulgatus*

Die Generierung von rekombinanten Proteinen ist in der Molekularbiologie und Biochemie wichtiger Bestandteil vieler Methoden. Neben der gängigen Praxis, Proteine mit einem Affinitäts-Tag (z. B. Histidin oder Strep-Tactin) zu fusionieren um diese anschließend chromatographisch aufzureinigen, können bestimmte Tags auch für die Fluoreszenz-Markierung von Proteinen eingesetzt werden. Besonders in der Mikrobiologie ist diese Art der Visualisierung nützlich, um die Produktion und Lokalisation von Proteinen zu analysieren, oder ganze Dynamiken von mikrobiellen Mischkulturen zu beobachten. Das bekannteste Fluoreszenz-Tag ist GFP, das Green Fluorescent Protein, welches erstmals im Jahre 1962 in *Aequorea victoria* beschrieben wurde (Tsien; 1998). Heute gibt es viele Alternativen zu GFP, welche auch das Fluoreszenz-Spektrum erweitern. Durch die autokatalytische Bildung des Chromophors, welches die Fluoreszenz letztendlich ermöglicht, gelten diese Proteine als intrinsisch fluoreszent. Jedoch benötigen alle bisher etablierten Fluoreszenz-Tags für die Reifung des Chromophors Sauerstoff, daher können diese Systeme nicht für strikt anaerob-wachsende Mikroorganismen verwendet werden. Für anaerobe Organismen werden deswegen Fluoreszenz-Tags untersucht, welche ihren fluoreszenten Charakter extrinsisch bilden. Durch die Zugabe eines Fluorochroms sind geeignete Fluoreszenz-Tags zu einer extrinsischen Fluoreszenz befähigt. In den folgenden Experimenten wurden zwei potenzielle Fluoreszenz-Tags, UnaG und IFP 2.0, auf die Anwendbarkeit in *P. vulgatus* untersucht.

3.5.1 Konstruktion der Vektoren für die N-terminale Fusion von Fluoreszenz-Tags mit der Lactat-Dehydrogenase (*bvu_2499*) von *P. vulgatus*

In einer Studie von Hannah *et al.* (2020) wurden zwei Bilin-bindende Proteine, UnaG und IFP 2.0, für die Fluoreszenz-Markierung von Proteinen im lebenden Organismus vorgestellt und in *B. thetaiotaomicron* angewendet. UnaG stammt ursprünglich aus dem Muskelgewebe des japanischen Aals *Anguilla japonica* und erzeugt mit der Bindung des Substrats Bilirubin eine grüne Fluoreszenz, welche mit gängigen GFP-Mikroskopiefiltern abgebildet werden kann (Chia *et al.*, 2020). IFP (Infrared Fluorescent Protein) ist ein Bakteriophytochrom, wurde erstmals aus dem Organismus *Deinococcus radiodurans* isoliert und für die Anwendung als Fluoreszenz-Tag sukzessive optimiert (Shu *et al.*, 2009). Die hier verwendete Variante IFP 2.0 erzeugt eine stärkere Fluoreszenz und benötigt den Cofaktor Biliverdin. Die Anregungswellenlänge liegt mit 638 nm bereits nahe dem Infrarot-Bereich und für die Detektion wird ein entsprechender Infrarot-Filter eingesetzt. Als Zielprotein für die Fluoreszenz-Markierung wurde die Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) gewählt, da es sich um ein cytoplasmatisches Protein handelt und sich dieses zuverlässig durch den Shuttle-Vektor pG106 homolog mit einer hohen Translationsrate in *P. vulgatus* überproduziert werden lässt (Lück & Deppenmeier, 2022).

Für die N-terminale Fluoreszenz-Markierung und Expression des LDH-Fusionsproteins in *P. vulgatus* wurden die codierenden Sequenzen der Fluoreszenz-Tags stromaufwärts in den Shuttle-Vektor pG106_*ldhNP* (Lück & Deppenmeier, 2022) kloniert und in den Organismus eingebracht. Die Klonierung erfolgte mittels DNA Assembly Master Mix. Durch die Verwendung der Primer pG106_UnaG Nterm_fw/rev wurde das *unaG*-Gen aus dem Plasmid pMAL-c5x_UnaG mit komplementären Enden zum Vektorrückgrat amplifiziert. Analog dazu wurde das *ifp* 2.0-Gen aus dem Plasmid pBAD_IFP2.0 mit den Primern pG106_IFP2.0_Nterm_fw/rev amplifiziert. Für die Generierung des Vektorrückgrats wurden die Primer pg106_2499_BB_fwd/rev verwendet. Die fertigen Konstrukte pG106_UnaGN_2499 und pG106_IFP2.0N_2499 wurden in *E. coli* NEB® 10β transferiert und vervielfältigt. Abschließend wurde das aufgereinigte Konstrukt über Elektroporation in *P. vulgatus* eingebracht (Abb. 46).

3. Ergebnisse

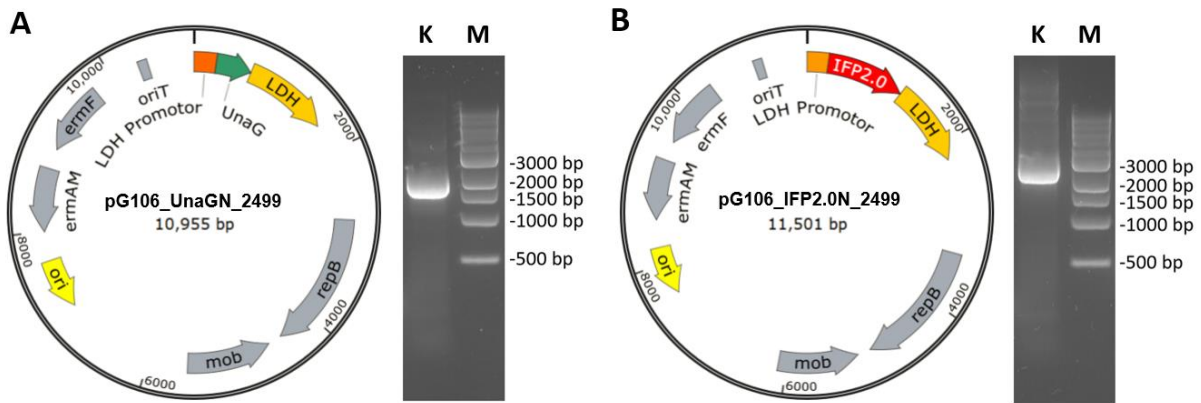


Abbildung 46: Konstruktion der Plasmide pG106_UnaGN_2499 und pG106_IFP2.0N_2499 mit anschließender Transformation in *P. vulgatus*. [A] Plasmidkarte von pG106_UnaGN_2499 mit Nachweis der Einbringung in *P. vulgatus* mittels Kolonie-PCR. Die Transformation sowie die korrekte Klonierung wurde durch die Größe des Amplifikats mit 1974 bp bestätigt. [B] Plasmidkarte von pG106_IFP2.0N_2499 mit Nachweis der Einbringung in *P. vulgatus* mittels Kolonie-PCR. Die Transformation sowie die korrekte Klonierung wurde durch die Größe des Amplifikats mit 2520 bp bestätigt. K: Koloniematerial; M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

3.5.2 Detektion der Fusionsproteine in *P. vulgatus* mittels Fluoreszenz-Mikroskopie

Für die Detektion des IFP2.0-LDH-Fusionsproteins in *P. vulgatus* wurden der pG106_IFP2.0N_2499 Plasmid-tragende Stamm sowie der Wildtyp in DMMG-Medium bis zum Erreichen der späten exponentiellen Phase kultiviert. Die Induktion der Fluoreszenz des IFP2.0-Tags erfolgte über die Zugabe von 2,5 μ M Biliverdin im Medium. Um die Zellen für die Mikroskopie zu immobilisieren, wurde Zellmaterial unter anaeroben Bedingungen auf einen Objektträger mit DMM-Medium, versetzt mit 1% Agarose, vermischt. Zum weiteren Ausschluss von Sauerstoff wurde die Agarose im flüssigen Zustand mit einem Deckglas versiegelt, und nach Erhärtung der Agarose wurden die Ränder des Deckglases mit Nagellack verschlossen. Anschließend wurde der Plasmid-tragende Stamm *P. vulgatus* pG106_IFP2.0N_2499 über Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie mit einer Anregungswellenlänge von 638 nm und einem 689/23 Emissionsfilter mit dem Wildtyp verglichen (Abb. 47).

3. Ergebnisse

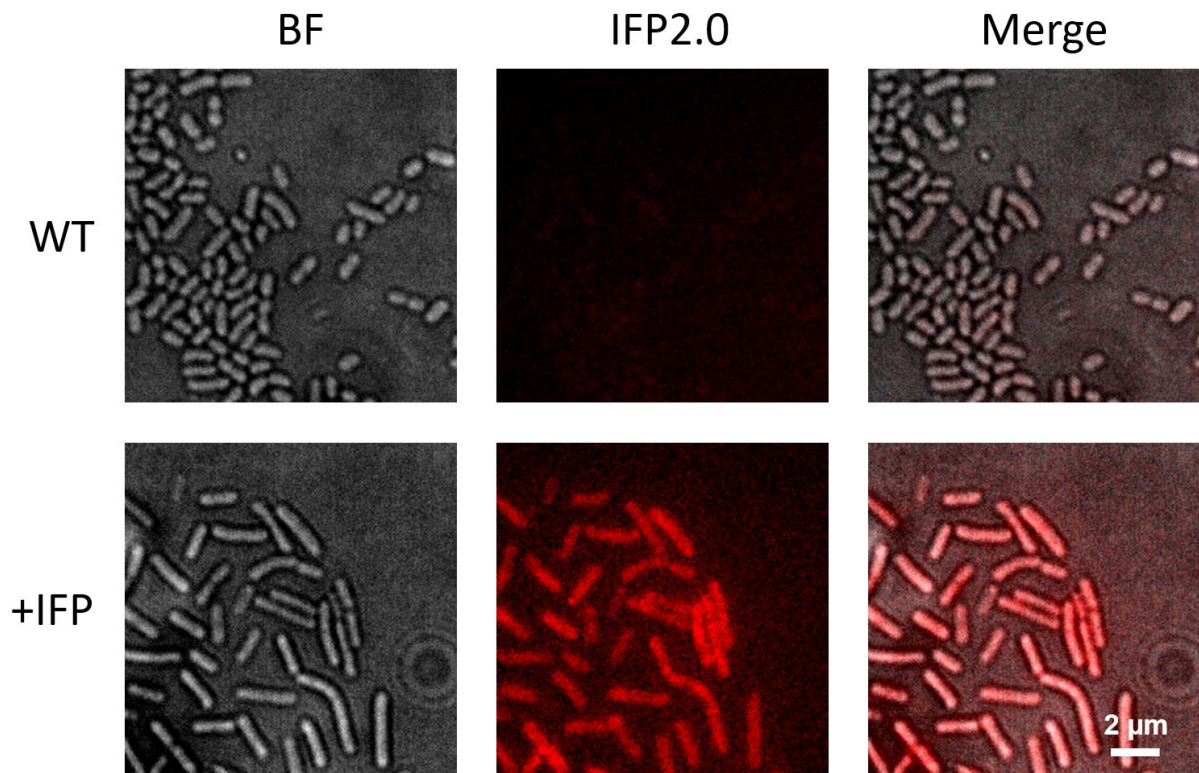


Abbildung 47: Fluoreszenz-Mikroskopie von *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_IFP2.0N_2499. Gezeigt sind Aufnahmen im Hellfeld (Bright Field, BF), im Emissionsfilter 689/23 (IFP 2.0) und als überlagertes Bild (Merge). Die Laser-Intensität betrug 200 mW und die Anregungswellenlänge 638 nm.

Die Fluoreszenz-Intensität bei der Laser-Fluoreszenz-Mikroskopie ist abhängig von der Leistung des Lasers. Ab einer Leistung des Lasers von 200 mW zeigten alle untersuchten Zellen des Plasmid-tragenden Stamms *P. vulgatus* pG106_IFP2.0_2499 im Vergleich zum Wildtyp eine gleichmäßige Fluoreszenz. Da keine Fluoreszenz in *P. vulgatus* Wildtyp-Zellen detektiert wurde, konnte eine Fluoreszenz durch Biliverdin ohne IFP2.0 ausgeschlossen werden.

Um die Fluoreszenz der UnaG-LDH-Fusionsproteine in *P. vulgatus* zu verifizieren, wurden der pG106_UnaGN_2499 Plasmid-tragende Stamm sowie der Wildtyp in DMMG-Medium bis zum Erreichen der späten exponentiellen Phase kultiviert. Für die Induktion der Fluoreszenz des UnaG-Tags wurde dem Medium 25 µM Bilirubin zugesetzt. Die Immobilisierung der Zellen erfolgte wie oben beschrieben. Anschließend wurden der *P. vulgatus* Wildtyp und *P. vulgatus* pG106_UnaGN_2499 mittels des Laser-Fluoreszenz-Mikroskops mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und einem 510/85 Emissionsfilter untersucht (Abb. 48).

3. Ergebnisse

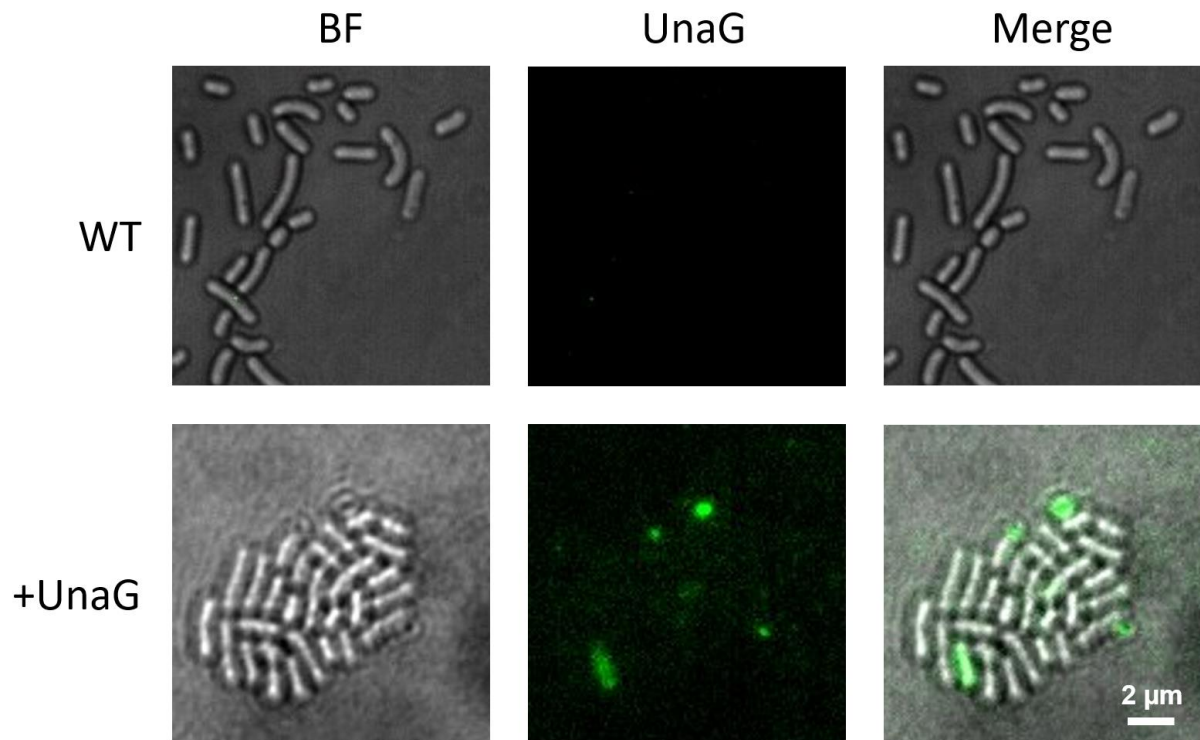


Abbildung 48: Fluoreszenz-Mikroskopie von *P. vulgaris* Wildtyp und *P. vulgaris* pG106_UnaGN_2499. Gezeigt sind Aufnahmen im Hellfeld (Bright Field, BF), im Emissionsfilter 510/85 (UnaG) und als überlagertes Bild (Merge). Die Laser-Intensität betrug 50 mW und die Anregungswellenlänge 488 nm.

Anders als bei IFP2.0 war eine Detektion der Fluoreszenz des UnaG-Tags erst bei einer Leistung des Lasers von 50 mW möglich. Der Plasmid-tragende Stamm *P. vulgaris* pG106_UnaGN_2499 zeigte im Fluoreszenz-Filter eine klar erkennbare Emission, während im Wildtyp keine Fluoreszenz detektiert wurde. Somit wurde auch bestätigt, dass Bilirubin nur in Kombination mit dem UnaG-Tag fluoresziert. Im Vergleich zu dem IFP2.0-Tag wurden jedoch anstatt einer gleichmäßigen Fluoreszenz nur bewegliche, fluoreszierende Spots innerhalb des Zellkompartiments detektiert. So ließen sich die Bewegungen der einzelnen *ldh*-Moleküle in der Zelle nachvollziehen. Im Videomaterial dieser Aufnahmen konnte dieses Phänomen gut beobachtet werden. Neben der deutlich geringeren Fluoreszenz-Intensität zeigten darüber hinaus nur wenige Zellen des Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgaris* pG106_UnaGN_2499 eine detektierbare Fluoreszenz. Eventuell kam es bei der korrekten Faltung des UnaG-Tags zu Problemen, sodass ein kleiner Anteil an UnaG-Tags zu Fluoreszenz befähigt war. Dennoch könnte die Fluoreszenz unter den hier getesteten Bedingungen bereits für Single-Molecule-Tracking Analysen geeignet sein, da eine Differenzierung einzelner LDH-Moleküle möglich war.

Zusammenfassend konnte bestätigt werden, dass sich sowohl UnaG als auch IFP2.0 als Fluoreszenzmarker in *P. vulgaris* eignen. Während es bei der Verwendung des IFP2.0-Markers zu einer gleichmäßigen Fluoreszenz auch zwischen verschiedenen Zellen kam, führte die Verwendung von UnaG zu einer diffusen Fluoreszenz innerhalb einer Zelle, und zu einer heterogenen Fluoreszenz-

3. Ergebnisse

Intensität zwischen verschiedenen Zellen. Da beide Marker ein sehr distinktes Anregungs- und Emissionsspektrum aufweisen eignen sie sich in der Theorie gut für eine simultane Markierung verschiedener Ziele im selben Organismus. Jedoch muss zunächst validiert werden, ob sich die eher diffuse Fluoreszenz-Intensität von UnaG mit der gleichmäßigen Fluoreszenz-Intensität von IFP2.0 für die gleichzeitige Anwendung in einem Organismus eignet.

4. Diskussion

Der menschliche Intestinaltrakt ist einer der komplexesten Lebensräume für Mikroorganismen mit einer extrem hohen Besiedlungsdichte (Savage, 1977). Die Entwicklung des Menschen und der im Verdauungssystem angesiedelten Bakterien hat ein komplexes Stoffwechselnetzwerk hervorgebracht, welches die Physiologie und Gesundheit des menschlichen Körpers beeinflusst. Der Wirt liefert den Mikroorganismen im Darm Nährstoffe und eine feuchte Umgebung mit stabilen 37 °C, während die Mikroorganismen den Wirt mit einer Vielzahl an physiologischen Vorteilen unterstützen. Dazu gehören die Entwicklung und Modulation des Immunsystems (Gensollen *et al.*, 2016), der Schutz vor Krankheitserregern (Pickard *et al.*, 2017) sowie die Verdauung von komplexen Kohlenhydraten aus der Nahrung zur Energieversorgung (Gorkiewicz und Moschen, 2018). Die Zusammensetzung der Darmmikrobiota ist hochindividuell und hängt von Faktoren wie der Ernährung (David *et al.*, 2014), der geografischen Lage (Rehman *et al.*, 2016) und der genetischen Ausstattung des Wirts (Ley *et al.*, 2008) ab. Dennoch dominieren in den meisten Fällen besonders die beiden Phyla Bacteroidota und Bacillota das Ökosystem des menschlichen Dickdarms (Turnbaugh *et al.*, 2008; Hamady und Knight, 2009). Bezogen auf das Phylum der Bacteroidota kann die Gattung *Bacteroides* einen Anteil von über 40% aller Mikroorganismen ausmachen (King *et al.*, 2019). Aufgrund dieser Abundanz und der langfristig stabilen Besiedlung der Darmumgebung ist die Gattung *Bacteroides* von erheblichem wissenschaftlichem Interesse (Bjursell *et al.*, 2006).

Der Großteil aller Untersuchungen, welche das Phylum Bacteroidota betreffen, konzentrieren sich bisher auf die mikrobielle Zusammensetzung des Intestinaltrakts, sowie die damit verbundene Wechselwirkung zwischen Wirt und Mikroorganismen. Der zentrale Fokus dieser Forschungsarbeiten ist meist der Einfluss auf die menschliche Gesundheit. Die effiziente Nutzung dieser Organismen und ihrer Stoffwechselwege könnte jedoch auch zur Herstellung von wertvollen Produkten, zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit von Nährstoffen und zur Entwicklung nachhaltiger industrieller Anwendungen beitragen. Besonders das biotechnologische Potenzial dieser Organismengruppe steht bisher noch im Hintergrund, wird aber in Zukunft, mit der Verfügbarkeit genetischer Manipulationstechniken und der Fähigkeit dieser Organismen zur Metabolisierung nachhaltiger komplexer Rohstoffe wie z. B. Hemicellulosen, nicht zu unterschätzen sein. Die Entwicklung neuer Anwendungen und Strategien, die auf den Fähigkeiten und Eigenschaften der Gattung *Bacteroides* aufbauen, könnte zu neuen, nachhaltigeren biotechnologischen Produktionsprozessen in der Industrie führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vorhandenen genetischen Werkzeuge für die Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* anhand des Modellorganismus *P. vulgatus* analysiert und erweitert. Diese Untersuchungen dienten der Bewertung des biotechnologischen Potenzials von *P. vulgatus*, sowie der

Entwicklung neuartiger genetischer Modifikationsmethoden, darunter auch die markerlose Deletion von Genen.

4.1 Genetische Tools für Arten der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola*

Die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften kommensaler Darmbakterien und deren Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit erfordert funktionelle Studien in Bezug auf Stoffwechsel, Interaktionen mit dem Wirt und damit verbundene Pathologien. Die Forschung an Darmbakterien wird allerdings häufig durch die hoch spezifischen Kultivierungsbedingungen und den Mangel an genetischen Werkzeugen erschwert (García-Bayona *et al.*, 2019; Bencivenga-Barry *et al.*, 2020). Der Darm von Säugetieren beherbergt eine der größten und dichtesten bisher in der Natur bekannten mikrobiellen Gemeinschaften, welche sich hauptsächlich aus den beiden Phyla Bacteroidota und Bacillota zusammensetzt (Human Microbiome Project Konsortium 2012; Faith *et al.*, 2013). Auf Gattungsebene besteht diese Gemeinschaft primär aus Arten der Gattungen *Bacteroides*, *Alistipes*, *Parabacteroides*, *Phocaeicola*, und *Prevotella* (Wexler & Goodman, 2017). Obwohl das Phylum der Bacteroidota einen bedeutenden Anteil der menschlichen Darmmikrobiota ausmacht, sind die verfügbaren genetischen Modifikationstechniken, insbesondere für Gendeletionen, begrenzt (Arumugam *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2017). Um das Verständnis für die in dieser Arbeit verwendeten Systeme zu erleichtern wird im folgenden Kapitel die historische Entwicklung der genetischen Werkzeuge für *Bacteroides* und *Phocaeicola* Spezies dargestellt. Grundsätzlich lassen sich die genetischen Werkzeuge, die bisher für die Vertreter der beschriebenen Spezies eingesetzt wurden, in drei Klassen unterteilen. Zum ersten gibt es Shuttle-Vektoren, welche stabil in *Bacteroides* und *Phocaeicola* eingebracht werden, um die homologe oder heterologe Überproduktion von Genen zu ermöglichen. Zum zweiten wurden genomintegrative Vektoren entwickelt, die eine Integrase kodieren, wodurch eine Rekombination zwischen dem Vektor und einer spezifischen Stelle im Genom die Integration des Vektors erfolgt. Zum dritten wurde an Selektionsmarkern geforscht, die für die Etablierung von Deletionssystemen mittels homologer Rekombination essenziell sind.

4.1.1 Die genetische Zugänglichkeit von Arten der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola*

Die größte Herausforderung für die Entwicklung von genetischen Systemen für *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies ist die Inkompatibilität mit etablierten Plasmid-Systemen. Die Strukturen von Promotorsequenzen sowie der Replikationsursprung von häufig eingesetzten biotechnologischen Vektoren sind hauptsächlich für Proteobakterien optimiert und werden aufgrund der phylogenetischen Entfernung von einem Großteil der Bacteroidota-Spezies nicht erkannt (Salyers *et al.*, 1977, Jones *et al.*, 2020). Aus diesem Grund wurde der Forschungsschwerpunkt auf die Identifizierung von *Bacteroidota*-nativen genetischen Elementen gelegt, um eine Grundlage für die Entwicklung von genetischen Tools zu finden. In der Vergangenheit wurden zwei Ansätze verfolgt, um

4. Diskussion

die genetische Erschließung von *Bacteroides*-Stämmen voranzutreiben. Ein Ansatz verfolgt die Entwicklung einer Schnittstelle zwischen *Bacteroides* und *E. coli*. Dazu wurde an der Generierung von Shuttle-Vektoren geforscht, welche sich in *E. coli* und *Bacteroides/Phocaeicola*-Spezies übertragen und replizieren lassen (Guiney *et al.*, 1984a; Gardner *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2020). Der andere Ansatz nutzt das Potenzial von *Bacteroides*-eigenen Transposons, um genomintegrative Vektoren zu entwickeln (Wang *et al.*, 2000; Mimee *et al.*, 2015).

4.1.1.1 Shuttle-Vektoren

Historisch gesehen begann die Forschung an genetischen Werkzeugen für *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies mit einer Publikation von Salaki *et al.* (1976), welche sich mit klinischen *Bacteroides*-Isolaten beschäftigte. In dieser Studie wurden Clindamycin-resistente *B. fragilis*-Stämme identifiziert, wobei das korrespondierende Gen für die Resistenzvermittlung auf einem unbekannten Plasmid kodiert war. Drei Jahre später konnte aus *B. fragilis* ein ~15kb großes Plasmid mit einer Clindamycin-Resistenz isoliert und charakterisiert werden (Tally *et al.*, 1979; Welch *et al.*, 1979). Dieses Plasmid legte den Grundstein für den ersten Shuttle-Vektor für *B. fragilis*. Guiney *et al.* (1984b) fusionierten dieses Clindamycin-Resistenz-Plasmid mit einem Teil des Vektors pBR322, und generierten ein Plasmid, das sowohl von *E. coli* als auch von *B. fragilis* repliziert werden konnte. Das pBR322-Rückgrat dieses neu entwickelten *B. fragilis* Shuttle-Vektors kodiert Gene, welche für einen konjugativen Transfer des Plasmids von *E. coli* in *B. fragilis* entscheidend sind: Einen Replikationsursprung zur Konjugation (*oriT*), eine Relaxase (*rlx*) zur Entwindung des Plasmids für die Initiierung des Transferprozesses sowie die Gene *tra1*, *tra2* und *tra3*, welche den horizontalen Transfer des Plasmids in die Rezipienten-Zelle vermitteln (Guiney, 1984c). Neben dem interspezifischen Transfer von *E. coli* zu *Bacteroides* konnten diese Plasmide auch für interspezifische Konjugationen zwischen zwei Arten der Ordnung *Bacteroidales* eingesetzt werden. Die Arbeitsgruppe von Gardner *et al.* (1996) entwickelten eine Strategie, um den Transfer von Plasmiden zwischen *B. uniformis* und *Prevotella ruminicola* zu etablieren. Im Rahmen dieser Studie wurde ein Plasmid mit dem Gen für eine modifizierte Cellulase generiert und von *B. uniformis* in *Prevotella ruminicola* mittels Konjugation transferiert (Gardner *et al.*, 1996). Dabei wurde gezeigt, dass sich *Bacteroides*-Spezies als Ausgangsstämme für die Übertragung von genetischem Material in verwandte Arten eignen.

Erst kürzlich wurde ein zuverlässiger Shuttle-Vektor mit einer hohen Kopienzahl für die homologe sowie heterologe Produktion von Proteinen in den Gattung *Phocaeicola* und *Bacteroides* entwickelt. Jones *et al.* (2020) identifizierten ein genetisches Element für die Replikation von Plasmiden in Organismen des Phylums der Bacteroidota, welches besonders vielversprechend für Arten der Gattungen *Porphyromonas*, *Bacteroides* und *Phocaeicola* erschien. Durch die Kombination eines MobA-Proteins und einer DNA Primase (RepB) aus *Porphyromonas asaccharolytica* wurde der Vektor

4. Diskussion

pG106 entwickelt, welcher stabil in *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies eingebracht werden kann (Jones *et al.*, 2020). Eine Studie von Lück & Deppenmeier (2022) hat gezeigt, dass durch die homologe Überproduktion der Lactat-Dehydrogenase (LDH, BVU_2499) mithilfe von pG106 in *P. vulgatus* eine signifikante Steigerung der Lactatsynthese erreicht werden kann. Darüber hinaus wurde in derselben Studie festgestellt, dass die 250 bp große Upstream-Region des Gens *bvu_2499* (*ldh*-Promotor) einen sehr potenten konstitutiven Promotor enthält, der sich für die homologe und heterologe Überexpression von Genen in *Phocaeicola*-Spezies eignet.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurde in dieser Arbeit das Plasmidsystem pG106 für weitere Untersuchungen des Stoffwechsels von *P. vulgatus* eingesetzt. Durch die Kombination des *ldh*-Promotors mit dem Gen *bvu_2880* (Pyruvat:Formiat Lyase, PFL) wurde ein Vektor generiert, welcher die homologe Überproduktion der PFL in *P. vulgatus* ermöglicht (s. Kap. 3.2). Nach Einbringung dieses Überexpressions-Vektors pG106_*ldh*P_*bvu2880* konnte mittels qPCR eine im Vergleich zum Wildtyp 32-fach höhere Abundanz des *pfl*-Gens nachgewiesen werden (Kap. 3.2.2). Die Erhöhung der Kopienzahl hatte ebenfalls einen bedeutenden Einfluss auf das Transkriptions-Level des *pfl*-Gens. Im Vergleich zum Wildtyp von *P. vulgatus* wurde in dem Plasmid-tragenden Stamm eine Erhöhung der mRNA-Transkriptmenge des *pfl*-Gens um den Faktor 1537 ermittelt (Kap. 3.2.2). Diese Ergebnisse weichen kaum von den Erkenntnissen aus der Studie von Lück & Deppenmeier (2022) ab. Dort wurde ebenfalls gezeigt, dass die Kopienzahl des Gens *bvu_2499* durch den Einsatz des pG106-Systems um das 32-fache erhöht wird. Als Folge ließ sich die mRNA-Transkriptmenge des Gens *bvu_2499* ebenfalls um den Faktor 1521 steigern. Durch die Erhöhung der mRNA-Transkriptmenge des *pfl*-Gens verschoben sich die Konzentrationen der Stoffwechsel-Endprodukte von *P. vulgatus* zu Gunsten von Formiat. Eine detaillierte Analyse der Veränderungen des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus, welche durch die Überexpression des *pfl*-Gens verursacht wurden, erfolgt in Kapitel 4.3.

Das pG106-Plasmidsystem wurde in dieser Arbeit auch für die Etablierung neuer Selektionsmechanismen für die Entwicklung eines Protokolls zur markerlosen Gen-Deletion in *P. vulgatus* eingesetzt. Die Strategie, welche für die Überproduktion der PFL verfolgt wurde, wurde ebenfalls genutzt um die Funktionalität von SacB als Gegenselektionsmarker in *P. vulgatus* zu validieren (Kap. 3.1). SacB, eine aus *B. subtilis* stammende Levansucrase, induziert in vielen Gram-negativen Bakterien-Spezies einen letalen Effekt, sobald Saccharose als Substrat zur Verfügung steht. Durch die unkontrollierte intrazelluläre/periplasmatische Akkumulation des Fruktan-Polymers Levan, welches aus Saccharose durch SacB synthetisiert wird, kommt der zelluläre Stoffwechsel zum Erliegen (Pelicic *et al.*, 1996). Die heterologe, konstitutive Überexpression des *sacB*-Gens in *P. vulgatus* führte zu einem Phänotyp, welcher in Anwesenheit von Saccharose-Konzentrationen von bereits ≥ 20 mM keine Biomasse mehr bilden konnte (Kap. 3.1.2). Um einen letalen Effekt mittels SacB als

4. Diskussion

Gegenselektionsmarker zu erzielen, sind in der Regel deutlich höhere Saccharose-Konzentrationen von bis zu 300 mM erforderlich (Zheng *et al.*, 2023, Zhang *et al.*, 2023). Die erhöhte Sensibilität gegenüber Saccharose ließ sich im Falle dieser Arbeit durch die hohe Kopienzahl von *sacB* erklären, welche durch pG106 vermittelt wird. *P. vulgaris* Stämme, welche nur eine genomische Kopie von *sacB* trugen, zeigten erst ab Saccharose-Konzentrationen von ≥ 100 mM kein Wachstum mehr (Kap. 3.1.3).

4.1.1.2 Genom-integrative Vektoren

Im Rahmen der Forschung an Shuttle-Vektoren für die Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* boten primär *Bacteroides*-eigene genetische Elemente die Grundlage für die Entwicklung genetischer Werkzeuge. Neben Plasmiden wurden in *B. fragilis* zusätzlich weitere mobile genetische Elemente identifiziert, die auch als Transposons bezeichnet werden. Diese Transposons ermöglichen die konjugative Übertragung von genetischem Material sowohl innerhalb der gleichen Art (intraspezifisch) als teilweise auch zwischen verschiedenen Arten (interspezifisch) (Shoemaker *et al.*, 1993; Salyers *et al.*, 1995; Li *et al.*, 1995). In *Bacteroides* wurden diese Transposons zunächst als Tc^R-Elemente bezeichnet, da diese in der Regel eine Tetracyclin-Resistenz codieren (Cooper *et al.*, 1996). Diese Tc^R-Elemente befinden sich im Genom verschiedener *Bacteroides*-Spezies und codieren Gene für die Synthese von Proteinen, welche an dem Mechanismus für den konjugativen Transfer von genetischem Material beteiligt sind (*tra*-Gene). Tc^R-Elemente können durch den Organismus selbst mobilisiert und in eine Rezipienten-Zelle transferiert werden (Abb. 49 A). Durch die Anwesenheit der *tra*-Gene wird auch die Mobilisierung von anderen Plasmiden im Organismus ermöglicht (Abb. 49 B). Außerdem ermöglichen Gene, welche in Tc^R-Elementen codiert sind, die Mobilisierung von sogenannten Nonreplicant Bacteroides Units (NBUs) (Abb. 49 C) (Salyers *et al.*, 1995). Diese NBU's sind spezifische Abschnitte auf dem Chromosom in verschiedenen *Bacteroides*-Spezies und können durch ein Tc^R-Element aus dem Genom entfernt, zirkularisiert und konjugativ in andere Organismen übertragen werden (Salyers *et al.*, 1995). Die Bezeichnung „Nonreplicant *Bacteroides* Units“ basiert auf der Tatsache, dass NBU's durch ihre zirkuläre Form an ein Plasmid erinnern, aber aufgrund des fehlenden Replikationsmechanismus nicht in *Bacteroides* vervielfältigt werden können. Der genaue Mechanismus der Exzision einer NBU durch ein Tc^R-Element ist jedoch bis heute nicht aufgeklärt (Shoemaker *et al.*, 1993). Die Aktivität von Tc^R-Elementen wird durch die Anwesenheit von Antibiotika reguliert. Daher wird vermutet, dass die Verbreitung von genetischem Material unter biotischem/abiotischem Stress die ursprüngliche Funktion dieser Elemente darstellt (Shoemaker *et al.*, 1993).

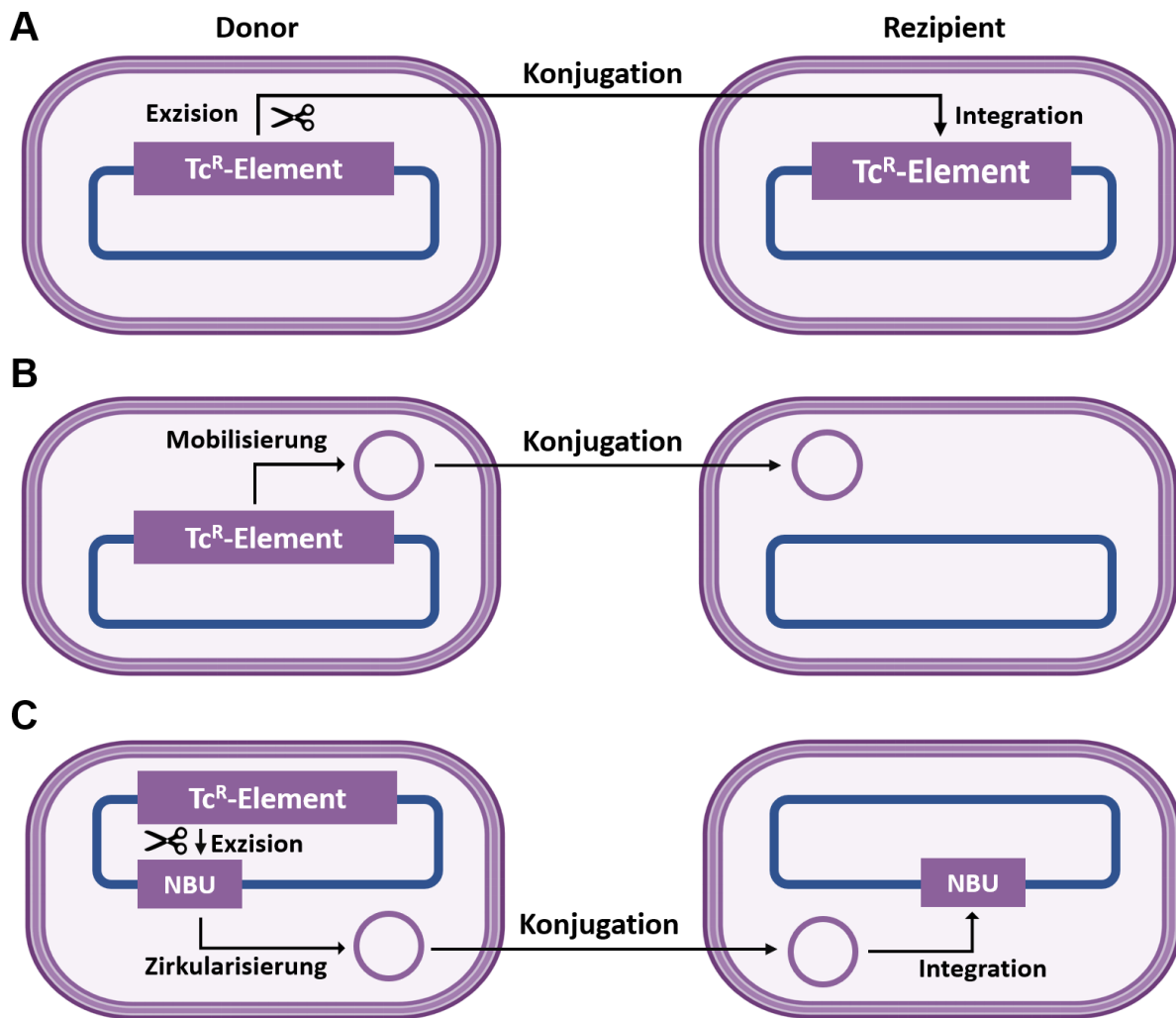


Abb. 49: Schematische Darstellung der Funktion von TC^R-Elementen. [A] Selbst-Mobilisierung: Das konjugative Transposon schneidet sich selbst aus dem Genom aus und transferiert sich über Konjugation in die Rezipienten-Zelle, wo es im Genom integriert. [B] Vermutlich ermöglichen die im TC^R-Element codierten *tra*-Gene auch die Mobilisierung von im Organismus befindlichen Plasmiden für den konjugativen Transfer in eine Rezipienten-Zelle. [C] Über einen bisher unbekannten Mechanismus bieten Tc^R-Elemente die Kapazitäten für die Exzision und Mobilisierung von NBU's in eine Rezipienten-Zelle. NBU's codieren eine Integrase und besitzen homologe Sequenzen zu einer spezifischen Stelle im Genom der Rezipienten-Zelle, wodurch eine genomische Integration vermittelt wird.

Eine NBU codiert in der Regel eine Integrase, welche die Insertion in das Ziel-Genom vermittelt. Da NBU's im Genom integriert sind, besitzen diese an den 5' und 3' Sequenzenden kurze Sequenzen (*attN*-Region, ~14 bp), welche identisch zu der ursprünglichen Stelle im Chromosom (*attB*-Region) sind. Das Vorhandensein einer solchen *attB*-Region im Genom des Rezipienten-Organismus ist somit für eine Integration der NBU notwendig (Shoemaker *et al.*, 1993). Aus der Forschung an NBU's resultierte ein Genom-integrativer Vektor, mit dem rekombinante DNA in das Genom von *Bacteroides*-Spezies integriert und exprimiert werden kann. Eine Studie von Wang *et al.* (2000) machte sich die NBU2 aus *B. fragilis* zunutze, um ein Plasmid zu generieren, welches durch die NBU2-codierte Integrase in das Genom von *B. thetaiotaomicron* inseriert wird. Diese NBU2-Integrase katalysiert eine sequenzspezifische Rekombination zwischen der *attN2*-Site der NBU2 und einer der beiden *attB*-

4. Diskussion

Regionen, welche sich am 3'-Ende der beiden tRNA^{Ser} kodierenden Gene auf dem Chromosom von *B. thetaiotaomicron* befinden. Diese *attB*-Region ist konserviert und daher in vielen verschiedenen Vertretern der Familie *Bacteroidaceae* vorhanden. Basierend auf dieser NBU2 generierten Mimee *et al.* (2015) das Plasmid pMM656 für Anwendungen in *B. thetaiotaomicron*, welches einen Rhamnose-induzierbaren Promotor sowie ein NanoLuc-Reportersystem codiert. Genetische Werkzeuge, welche auf NBU's basieren, bringen jedoch Limitierungen mit sich. Beispielsweise erfordert die genomische Inserierung einer NBU eine homologe Sequenz im Ziel-Genom des Organismus, um überhaupt eine Integration zu ermöglichen (Wang *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde das pMM656-Plasmidsystem für die Evaluierung von *SacB* in *P. vulgatus* eingesetzt. Um *SacB* als Gegenselektionsmarker einzusetzen, musste im Vorarbeiten festgestellt werden, ob eine einzelne genomische Kopie des Marker-Gens ausreicht, um in Anwesenheit von Saccharose einen letalen Effekt in *P. vulgatus* zu vermitteln. Für diese Untersuchung wurde das *sacB*-Gen zusammen mit dem *ldh*-Promotor in das Plasmid pMM656 kloniert. Das resultierende Konstrukt wurde anschließend in das Genom von *P. vulgatus* DSM 1447 integriert. Die Ergebnisse von Wachstumsexperimenten zeigten, dass eine einzelne Kopie von *sacB* tatsächlich ausreicht, um in *P. vulgatus* einen letalen Effekt zu vermitteln. Die erforderlichen Saccharose-Konzentrationen für eine Inhibierung des Wachstums beliefen sich dabei auf ≥ 100 mM (Kap. 3.1.3).

Neben der Anwendung als Genom-integrativer Vektor eignete sich pMM656 als vielversprechender Ausgangspunkt für die Entwicklung eines modularen Deletionsvektors: pMM656 kann in *P. vulgatus* nicht repliziert werden und erfüllt somit die Anforderungen an ein Suizid-Plasmid. Nach der Einbringung von pMM656 sind nur Zellen lebensfähig, welche das Plasmid genomisch integrieren konnten (Mimee *et al.*, 2015). Zudem zeichnet sich pMM656 durch eine hohe und zuverlässige Transformationseffizienz aus. Um pMM656 in dieser Arbeit als Deletionsvektor zu nutzen waren drei Modifikationen notwendig: (1.) wurde die Integrase, die die genomische Integration zwischen der *attn*- und *attB*-Region am 3'-Ende des tRNA^{Ser}-Gens vermittelt, entfernt. (2.) wurde das *sacB*-Gen als Gegenselektionsmarker zusammen mit dem *ldh*-Promotor in das Plasmid kloniert. (3.) wurden homologe Bereiche mit einer Größe von 1000 bp, welche sich im Up- und Downstream-Bereich des zu deletierenden Gens befinden, hinzugefügt (Kap. 3.1.4). Aus diesen Arbeiten resultierte der pMM656_ *sacB* Deletionsvektor. Sowohl die Up- und Downstream-Regionen als auch die Antibiotika-Resistenzkassetten dieses Vektors lassen sich, je nach Bedarf, beliebig austauschen.

4.1.2 Markerlose Deletion von Genen in Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* mittels homologer Rekombination und *SacB*-Gegenselektion

Unter natürlichen Bedingungen dient die homologe Rekombination der Reparatur von DNA-Material, welche durch den Austausch von DNA-Sequenzen mit einem einzel- oder Doppelstrangbruch durch

4. Diskussion

eine nahezu identische, unbeschädigte DNA-Sequenz erfolgt (Thomason *et al.*, 2014). Dieser Mechanismus ist fast ubiquitär in Pro- und Eukaryoten vorhanden, jedoch spielt dieser besonders in Prokaryoten für den horizontalen Gentransfer eine wichtige Rolle (Colegrave *et al.*, 2005). Durch den konjugativen Transfer von DNA-Sequenzen mit homologen Bereichen aus einer Donor- in eine Rezipienten-Zelle können genetische Informationen (z.B. Antibiotika-Resistenzen) schnell und gezielt intra- und teilweise auch interspezifisch ausgetauscht werden. Im Falle der Gattung *Bacteroides* sind die bereits erwähnten Tc^R-Elemente ein passendes Beispiel (s. Kap. 4.1.1) (Salysers *et al.*, 1995). Allerdings muss ein homologes Rekombinationsereignis nicht zwangsläufig zum Zweck der Reparatur von DNA initiiert werden. Bereits während der Transkription oder Replikation wird durch eine Endonuklease ein Einzelstrangbruch erzeugt, welcher als Einstieg für Rekombinationsereignisse dienen kann (Vos, 2009). Am Beispiel von *P. vulgatus* wird der intakte DNA-Einzelstrang durch eine Exonuklease (BVU_2071) freigelegt und wird durch DNA-Binde-Proteine (BVU_2859) stabilisiert. Die Rekombinase RecA (BVU_2377) verdrängt die DNA-Bindeproteine und vermittelt, im Komplex mit weiteren Reparatur-Proteinen, die Hybridisierung zwischen der freigelegten Sequenz des Genoms und der rekombinanten DNA (Roca *et al.*, 1990). Durch das Einbringen von DNA-Material mit einer Sequenz, welche im Genom der Rezipienten-Zelle existiert, kann über homologe Rekombination eine Integration der rekombinanten DNA in das Genom erfolgen. Dieser Mechanismus bildet unter anderem die Grundlage der markerlosen Deletion von Genen in Bakterien (Datsenko *et al.*, 2000).

Durch die Entdeckung des CRISPR/Cas9-Systems im Jahre 2012 wurde die zielgerichtete Induktion von Doppelstrangbrüchen ermöglicht, wodurch das Potenzial der homologen Rekombination für genetische Modifikationen in Mikroorganismen extrem gesteigert wurde (Jinek *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2014). Das System fußt auf der Endonuklease Cas9, welche in Assoziation mit einem kurzen RNA-Molekül (Guide RNA) präzise an eine Stelle im Ziel-Genom geführt wird und dort einen Doppelstrangbruch induziert. (Jinek *et al.*, 2012). Dieser Doppelstrangbruch erhöht immens die Wahrscheinlichkeit für eine homologe Rekombination. Durch die Einbringung einer rekombinanten Template-DNA, welche die gewünschte genetische Modifikation und homologe Bereiche zu den flankierenden Regionen des Doppelstrangsbruchs trägt, erfolgt ein Rekombinationsereignis zur Wiederherstellung der DNA-Integrität mit gleichzeitiger Integration der genetischen Modifikation (Hsu *et al.*, 2014; Bassalo *et al.*, 2016; Zheng *et al.*, 2022). Die Anwendung von CRISPR/Cas erfordert allerdings einen Organismus mit guter genetischer Zugänglichkeit, da sowohl eine regulierte Produktion des Cas9 Proteins sowie der gRNA wichtig ist (Bassalo *et al.*, 2016). Für Bakterien der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* müssen daher noch mehr zuverlässige genetische Elemente wie z.B. regulierbare Promotorstrukturen und Antibiotikaresistenzkassetten identifiziert werden, um das volle Potenzial von CRISPR/Cas9 nutzen zu können. Aus diesem Grund bietet sich für Vertreter der

Gattungen *Bacteroides/Phocaeicola*, trotz der Vorteile von CRISPR/Cas9, noch immer die markerlose Deletion mittels homologer Rekombination an.

Die Durchführung einer „klassischen“ markerlosen Deletion in Bakterien erfordert ein Plasmid mit drei Eigenschaften: Zum einen muss es homologe Sequenzen besitzen, welche sich stromauf- und abwärts der zu deletierenden Region befinden. Des Weiteren darf das Plasmid keinen Startpunkt für die Replikation (Origin of Replication, Ori) codieren welcher von dem Zielorganismus erkannt wird, sodass die Replikation des Plasmids im Zielorganismus nicht möglich ist. So können nach der ersten Selektion nur Organismen überleben, die nach Aufnahme der rekombinanten DNA durch ein initiales homologes Rekombinationsereignis dieses sogenannte Suizid-Plasmid in das Genom integrieren konnten. Zuletzt benötigt das Plasmid, neben einer Antibiotikaresistenz-Kassette, einen Gegenselektionsmarker, welcher im Laufe der Deletion zusätzlichen Selektionsdruck für die Entfernung des Plasmids aus dem Genom ausüben kann. Im Gegensatz zu einer Antibiotikaresistenz vermittelt der Gegenselektionsmarker eine Sensibilität gegenüber einer Chemikalie anstatt einer weiteren Resistenz. Im Rahmen der Gegenselektion wird so der Organismus auf die Abwesenheit des Markers getestet, um festzustellen, ob der Deletionsvektor nach einer 2. Homologen Rekombination das Genom des Organismus wieder verlassen hat (Abb. 50).

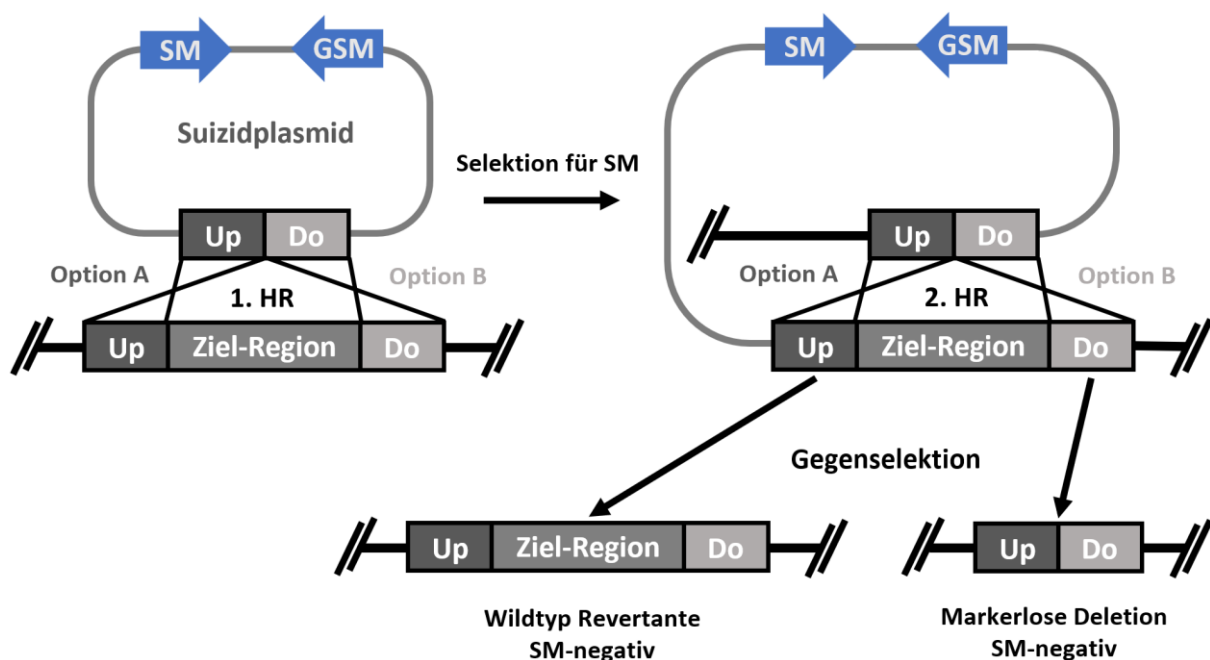


Abbildung 50: Schematische Darstellung einer markerlosen Deletion basierend auf homologer Rekombination. Durch die Einbringung eines Suizidplasmids mit homologen Sequenzen stromauf- und abwärts der Zielsequenz kann das Plasmid über eine dieser Sequenzen mittels homologer Rekombination im Genom integriert werden. Durch die Anwesenheit von zwei homologen Sequenzen, eine auf dem Plasmid und eine im Genom, kommt es zu einem zweiten Rekombinationsereignis. Je nachdem, über welche Sequenz die Rekombination erfolgt, wird das Plasmid entweder mit oder ohne der Zielregion aus dem Genom entfernt. HR: Homologe Rekombination; SM: Selektionsmarker; GSM: Gegenselektionsmarker; Up: Sequenz stromaufwärts der Ziel-Region; Do: Sequenz stromabwärts der Ziel-Region.

4. Diskussion

SacB ist einer der am weitesten verbreitete Gegenselektionsmarker für rekombinationsbasierte Gendelektionen in gram-negativen Bakterien. Das korrespondierende Gen *sacB* stammt ursprünglich aus *B. subtilis* und codiert eine Levansucrase, welche durch die Freisetzung von Fruktose-Monomeren aus Saccharose die Bildung des Fruktan-Polymers Levan katalysiert (Pelicic *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus, den SacB bei der Vermittlung des letalen Effekts auslöst, ist bisher nicht konkret erforscht. Vermutlich führt die intrazelluläre oder periplasmatische Akkumulation von Levan durch die unregulierte Synthese über SacB zum Zelltod.

In der Literatur wird von den meisten *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Arten pauschal behauptet, dass in diesen beiden Gattungen aufgrund der Fähigkeit zur Verwertung von Fruktan-Polymeren eine SacB-Gegenselektion nicht funktioniert (Sonnenburg *et al.*, 2010; Kino *et al.*, 2016; Bencivenga-Barry *et al.*, 2020). Entgegen dieser Annahmen wurde in der vorliegenden Arbeit demonstriert, dass sich SacB als äußerst potenter Gegenselektionsmarker für die markerlose Deletion von Genen in *P. vulgatus* eignet (Kap. 3.1.1-3.1.3). Auf der Basis von pMM656 wurde ein modulares Deletionsplasmid entwickelt werden, welches sich zuverlässig von *E. coli* β -2155 konjugativ in *P. vulgatus* einbringen ließ (Kap. 3.1.4). Um die Funktionalität dieses Systems zu testen wurde das Gen *bvu_1663*, welches für eine Exo- β -Fructosidase codiert, als initiales Deletion-Ziel gewählt. Zu diesem Zweck wurden 1000 bp der Up- und Downstream-region des *bvu_1663* Gens in den pMM656_SacB Deletionsvektor kloniert. Das Konstrukt wurde in *P. vulgatus* DSM 1447 eingebracht und über homologe Rekombination im Genom integriert (Kap. 3.1.5). Nach einer zweiten homologen Rekombination wurde der Deletionsvektor wieder entfernt und unter den resultierenden Stämmen konnten schließlich *P. vulgatus* $\Delta 1663$ Deletionsmutanten nachgewiesen werden (Kap. 3.1.6). Die Deletion des Gens *bvu_1663* führte zu einem *P. vulgatus* Phänotyp, welcher Fructooligosaccharide nicht mehr als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen kann (Kap. 3.1.7). Das Potenzial des in dieser Arbeit etablierten Deletionssystem für *P. vulgatus* wurde weiterhin durch die Deletion mehrerer Gene des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus, darunter diejenigen, die für die Lactat-Dehydrogenase (*bvu_2499*), die Pyruvat:Formiat Lyase *bvu_2880*, sowie die Methylmalonyl-CoA-Mutase (*bvu_0309/0310*) codieren, demonstriert (Lück, 2023). Jedoch lässt sich dieses System nicht für jeden Vertreter der Gattungen *Bacteroides* oder *Phocaeicola* einsetzen. Da SacB die Polymerisierung von Levan katalysiert muss angenommen werden, dass SacB in allen *Bacteroides* und *Phocaeicola* Spezies, welche zum Abbau von Levan befähigt sind, keinen letalen Effekt vermittelt.

Eine Studie von Ernits *et al.* (2019) beschäftigte sich näher mit der Verwertung von Levan durch *B. thetaiotaomicron* und konnte die Endo- β -Fructofuranosidase (BT_1760), welche für die Hydrolyse von Levan verantwortlich ist, kristallographisch charakterisieren. Weiterführende Experimente mit einer Mutante von *B. thetaiotaomicron*, welcher das Gen *bt_1760* fehlt, zeigten den Verlust der

4. Diskussion

Fähigkeit Levan als Substrat für das Wachstum zu verwenden (Ernits *et al.*, 2019; Bolam & Sonnenburg, 2011). Aus diesem Grund diene das entsprechende Protein BT_1760 in dieser Arbeit als Ausgangspunkt für eine bioinformatische Analyse homologer Proteine in verschiedenen *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies (s. Kap. 3.1.1). Es wurde die These aufgestellt, dass alle Organismen ohne ein BT_1760-Homolog Levan nicht verstoffwechseln können. Anhand der Ergebnisse aus einer Studie von Colnet *et al.* (2021) wurde diese These zusätzlich unterstützt: Die besagte Studie sammelte Ergebnisse aus Wachstumsexperimenten mit verschiedenen *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies, um zu überprüfen, ob diese zur Verwertung von Levan befähigt sind. Die Ergebnisse einer Studie von Colnet *et al.* (2021) lassen die Vermutung zu, dass alle Organismen mit einem zu BT_1760 homologen Protein in der Lage sind, Levan oder Inulin als Substrat zu nutzen. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit die These aufgestellt, dass SacB in Vertretern der Bacteroidota, die über kein BT_1760-Homolog verfügen, zur Gegenselektion genutzt werden kann (Kap. 3.1.1). Sonnenburg *et al.* (2010) konnten durch weitere Wachstumsexperimente mit *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae*, *B. ovatus*, *B. fragilis*, *B. uniformis* und *P. vulgatus* zeigen, dass nur *B. thetaiotaomicron* dazu in der Lage ist, Levan als Substrat zu verwenden. Mit Ausnahme von *P. vulgatus* konnten die verbliebenen getesteten Organismen lediglich Inulin verwerten. Dieser Umstand lässt sich auf die Tatsache zurückführen, dass Inulin im Vergleich zu Levan über einen deutlich geringeren Polymerisierungsgrad verfügt und somit über spezifische Import-Systeme (SusD/SusC) oder Porine in das Periplasma gelangen kann, wo das Substrat durch geeignete Exo-Fructosidasen hydrolysiert wird (Flamm *et al.*, 2001). Die Ergebnisse aus der Studie von Sonnenburg *et al.* (2010) legen nahe, dass SacB zumindest in *B. caccae*, *B. ovatus*, *B. fragilis* und *B. uniformis* als Gegenselektionsmarker eingesetzt werden kann. (Sonnenburg *et al.*, 2010).

Letztendlich lässt sich nur durch gezielte Experimente feststellen, ob SacB als Selektionsmarker in den aufgeführten *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies funktioniert. Aus den oben genannten Gründen sollte sich SacB für eine Gegenselektion in *B. fragilis* eignen, doch bisher erbrachten entsprechende Versuche mit *B. fragilis* keinen Erfolg (Kino *et al.*, 2016). Als Gegenbeispiel konnte SacB in *Segatella (S.) copri* angewendet werden. Dieser Organismus gehört ebenfalls der Ordnung *Bacteroidales* an und gilt als extrem effizienter Spezialist für den Abbau von komplexen Kohlenhydraten, darunter auch Inulin und Levan (Hayashi *et al.*, 2007). Und trotz dieser metabolischen Fähigkeiten wurde ein Deletionsprotokoll basierend auf der Gegenselektion mit SacB etabliert (Li *et al.*, 2021). Demnach ist eine detaillierte Aufklärung der Levan-Verwertung in einem Organismus notwendig, um eine Vorhersage zu treffen, ob SacB einen letalen Effekt vermittelt.

4.1.3 Weitere Gegenselektionsmarker für die markerlose Gen-Deletion in *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies

Der limitierende Faktor für Deletionen mittels homologer Rekombination in Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* bezieht sich auf die Verfügbarkeit von zuverlässigen Gegenselektionsmarkern, weshalb sich viele Studien auf die Etablierung bestehender und neuartiger Selektionsmarker für diese beiden Gattungen fokussieren. Im folgenden Kapitel werden, abseits von SacB (Kap. 3.1.3), weitere Selektionsmarker für *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Vertreter bezüglich ihrer Zuverlässigkeit sowie Vor- und Nachteile diskutiert.

Speziell für Vertreter der Gattung *Bacteroides* wurde kürzlich ein System für Gegenselektionen entwickelt, welches auf einer Kombination der toxischen Effektoren Bfe1 und Bte1 basiert (Bencivenga-Barry *et al.*, 2020). Diese beiden Effektoren stammen aus dem Typ VI-Sekretionssystem von *B. fragilis* und üben einen bakteriziden Effekt auf andere *Bacteroides* Spezies aus (Chatzidaki-Livanis *et al.*, 2016; Wexler *et al.*, 2016). Die Expression der Effektoren wird durch einen Anhydrotetracyklin (aHT) induzierbaren Promotor reguliert, sodass die Integration des Plasmids in das Genom zunächst keinen letalen Effekt vermittelt. Nach der zweiten homologen Rekombination wird, durch die Zugabe von aHT die Synthese der Effektoren induziert, um zu überprüfen, ob das Deletionsplasmid aus dem Genom entfernt wurde. Dieses System wurde bisher erfolgreich für die Deletion von Genen in *B. thetaiotaomicron* sowie Wildtyp-Isolaten von *P. vulgatus* und *Parabacteroides*-Spezies aus dem menschlichen Darm eingesetzt (García-Bayona *et al.*, 2019). In Vorarbeiten für diese Arbeit wurde ebenfalls der Versuch unternommen, dieses Selektionssystem auf *P. vulgatus* zu übertragen. Obwohl das Plasmid für dieses System auf dem Rückgrat des pMM656 Integrationsvektor basiert, blieben alle Transformationsversuche erfolglos. Eine mögliche Erklärung wäre, dass *P. vulgatus* trotz der Abwesenheit des Induktors aHT die Expression der toxischen Effektoren in geringen Mengen zulässt und so bereits einen toxischen Effekt vermittelt (Persönliche Mitteilung Rebecca Lück).

Ein alternativer Gegenselektionsmarker basiert auf einer modifizierten Variante des Gens *pheS*, welches für eine Phenylalanyl-tRNA-Synthetase (PheS) kodiert (Kino *et al.*, 2016). Aufgrund einer Mutation wird die Substratspezifität von PheS reduziert, wodurch ebenfalls das toxische Phenylalanin-Analogon p-Chloro-Phenylalanin in Proteine inkorporiert werden kann. Durch die Anwesenheit von p-Chloro-Phenylalanin im Gegenselektionsmedium nach einer zweiten homologen Rekombination kann festgestellt werden, ob der Deletionsvektor aus dem Genom entfernt wurde. Dieses System hat gegenüber der Gegenselektion mit den toxischen Effektoren bte1 und bfe1 den Vorteil, dass der Gegenselektionsmarker nicht von einer Induktion abhängt. Erst die Zugabe von p-Chloro-Phenylalanin im Selektionsmedium erzeugt einen Selektionsdruck. Problematisch ist jedoch die

4. Diskussion

geringe Toxizität des Systems in Komplexmedium: Durch die Verfügbarkeit von alternativen Phenylalanin-Quellen wird p-Chloro-Phenylalanin nur in geringen Mengen von Organismen aufgenommen, was eine massive Beeinträchtigung der Selektionseffizienz zur Folge hat. Die Gegenselektion des PheS-Systems muss daher auf Minimal-Medium durchgeführt werden, wodurch die Regeneration potenzieller Mutanten erschwert wird. Und selbst auf Minimal-Medium ist die Effizienz nicht besonders hoch, da es häufig zu einem Hintergrund-Wachstum von falsch-positiven Mutanten kommt (Kino *et al.*, 2016; García-Bayona & Comstock, 2019).

Fluorierte Nukleotid-Derivate wie z.B. 5-Fluorocytosin (5-FC) und 5-Fluoro-2'Desoxyuridin (FUdr) eignen sich ebenfalls als Substanzen für eine Gegenselektion und wurden in der Vergangenheit für die markerlose Deletion in verschiedenen Proteobakterien angewandt (Kostner *et al.*, 2013, Sakanaka *et al.*, 2018). Der Gegenselektions-Mechanismus basiert auf Enzymen, welche fluorierte Nukleotid-Derivate in den Nukleotid-Stoffwechsel einschleusen, was in der Synthese von 5-Fluorodesoxyuridin-monophosphat (5F-dUMP) mündet. 5F-dUMP führt letztendlich zu einer letalen irreversiblen Hemmung der essenziellen Thymidilat-Synthase, welche dUMP zu desoxy-Thymidinmonophosphat (dTMP) umsetzt. dTMP ist notwendig für die DNA-Synthese, Reparatur und Replikation. Daher ist ein Mangel an dTMP letal für jeden Organismus (Goh *et al.*, 2009). Der eigentliche Gegenselektionsmarker ist das Protein für die Metabolisierung besagter Nukleotid-Derivate. Für die Anwendung sind demnach Stämme notwendig, welche die entsprechenden Enzyme für die Einschleusung der toxischen Derivate in den Nukleotid-Stoffwechsel nicht besitzen und folglich in Anwesenheit der toxischen Nukleotid-Derivate wachsen können. Beispielsweise wurde 5-FC als Gegenselektionsmarker für die Deletion von Genen in *Gluconobacter oxydans* Mutanten eingesetzt, in denen in vorangegangenen Experimenten das Gen für eine Phosphoribosyl-Transferase (*upp*) deletiert wurde. Das *upp*-Gen ist für die Umsetzung von 5-FC zu 5-Fluorouridin-monophosphat (5F-UMP) verantwortlich. 5F-UMP wird im weiteren Verlauf des Stoffwechsels zu 5F-dUMP umgesetzt, wodurch letztendlich die Thymidilat-Synthase gehemmt wird (Kostner *et al.*, 2013). Ein ähnliches System konnte bereits in *P. dorei* und *B. thetaiotaomicron* angewendet werden und stützt sich auf die Anwendung von FUdr. In diesem Ansatz vermittelt das Enzym Thymidin-Kinase den letalen Effekt aufgrund der Umsetzung von FUdr zu 5F-dUMP, wodurch, analog zu dem System in *G. oxydans*, die Thymidilat Synthase gehemmt wird (Sakanaka *et al.*, 2018). Auch für dieses System ist die Deletion der Thymidin-Kinase in dem Ausgangsstamm erforderlich, daher musste zunächst eine entsprechende Mutante erzeugt werden, welche keine Sensibilität gegenüber FUdr besitzt.

Teile dieser Arbeit fokussierten sich ebenfalls auf die Entwicklung eines Gegenselektionssystems für *P. vulgaris*, welches auf der Anwendung des fluorierten Nukleotid-Derivats 5-Fluorouracil (5-FU) basiert (Kap. 3.1.8). *P. vulgaris* codiert in seinem Genom zwei Enzyme (Phosphoribosyl-Transferase

4. Diskussion

(BVU_0984) und Purin-Nukleosid-Phosphorylase (BVU_3649)) welche 5-FU in den Nukleotid-Stoffwechsel einschleusen können. Die Deletion dieser beiden Gene erfolgte mit dem in dieser Arbeit entwickelten SacB-Gegenselektionssystem und führte zu der Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0984\Delta 3649$, auf die 5-FU keinen toxischen Effekt mehr ausübt (Lück, 2023). Um die Funktionalität dieses neu entwickelten 5-FU-Selektionssystem zu demonstrieren, wurde in dieser Arbeit erneut das Gen für die Exo- β -Fructosidase BVU_1663 deletiert (Kap. 3.1.8). Auf dem modularen pMM656-Deletionsvektor, welcher für die Deletion von *bvu_1663* eingesetzt wurde, wurde das *sacB*-Gen durch die beiden Gene *bvu_0984* und *bvu_3649* ausgetauscht (Kap. 3.1.8). Das resultierende Deletionsplasmid pMM656 $\Delta 1663$ upp wurde anschließend in *P. vulgatus* $\Delta 0984\Delta 3649$ eingebracht und führte, nach Durchführung des Deletionsprotokolls (s. Kap. 2.1.14), zu der *P. vulgatus* $\Delta 3649\Delta 0984\Delta 1663$ Deletionsmutante. Somit wurde in dieser Arbeit ein zusätzliches Gegenselektionssystem für eine markerlose Deletion in Spezies der Gattungen *Bacteroides*- und *Phocaeicola* etabliert.

Neben der klassischen Methode der markerlosen Deletion über homologe Rekombinationen wird auch an der Erschließung von *Bacteroides*/*Phocaeicola*-Arten für aktuellere Methoden wie CRISPR/Cas geforscht (Zheng *et al.*, 2022). In der Studie von Zheng *et al.* (2022) wurde ein pMM656-Derivat generiert, welches das Cas9 Protein und eine entsprechende Guide-RNA (gRNA) unter Kontrolle eines aHT-induzierbaren Promotors codiert. Das Cas9 Protein rekrutiert die gRNA und induziert einen spezifischen Doppelstrangbruch im Genom des Ziel-Organismus. Durch ein Repair Template, welches ebenfalls auf dem Vektor codiert, erfolgt eine homologe Rekombination an der Stelle des Doppelstrangbruchs. Dieses Repair Template kann frei modifiziert werden, wodurch Modifikationen, Insertionen und Deletionen möglich sind. Zu Demonstrationszwecken wurde dieses System in *B. thetaiotaomicron*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. uniformis* und *P. vulgatus* zur Deletion von DNA-Regionen mit einer Größe von bis zu 50 kb angewandt (Zheng *et al.*, 2022). Dieses System weist jedoch die grundsätzlichen Limitationen des pMM656-Plasmids auf: Dieser Vektor kann nur in Organismen integrieren, welche eine *attN*-Region im Genom besitzen. Bei einer homologen Rekombination, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde (Kap. 3.1.5), funktioniert die genomische Integration der rekombinanten DNA über frei wählbare homologe Bereiche. Dementsprechend bietet dieses System, im Vergleich zur markerlosen Deletion durch homologe Rekombination, deutlich weniger Flexibilität. Durch die Verwendung des pG106 Shuttle-Vektors könnte dieses System, unabhängig von den beschriebenen Einschränkungen, in allen kompatiblen *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies angewendet werden.

In dieser Arbeit resultierte die Forschung an einer Deletionsmethode für *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies in der Generierung eines modularen Suizid-Plasmids, welches sich effizient von *E. coli* $\beta 2155$ mittels Konjugation in *P. vulgatus* übertragen lässt (Kap. 3.1). Es wurde gezeigt, dass sich SacB als

potenter Gegenselektionsmarker in *P. vulgatus* eignet (Kap. 3.1.1-3.1.3). Durch die Deletion des Gens *bvu_1663*, welches für die Exo- β -Fructosidase BVU_1663 codiert, wurde erstmals das Potenzial und die Zuverlässigkeit des Systems demonstriert (Kap. 3.1.7). Darauf aufbauend wurde das SacB-System für die markerlose Deletion von mehreren Genen des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus und des Nukleotid-Stoffwechsels eingesetzt (Lück, 2023). Weiterhin wurde das SacB-Deletionsprotokoll für die Entwicklung eines weiteren Gegenselektionsmarker für *P. vulgatus* angewandt. Durch die Deletion der beiden Gene *bvu_0984* und *bvu_3649* entstand eine 5-FU resistente *P. vulgatus* Deletionsmutante, welche sich für die Gegenselektion mittels 5-FU eignet (Lück, 2023). Die Zuverlässigkeit dieses neu etablierten Gegenselektionsmarkers für eine markerlose Deletion wurde in dieser Arbeit, durch die erneute Deletion der Exo- β -Fructosidase BVU_1663, bestätigt (Kap. 3.1.8).

4.2 Der Fruktan-Metabolismus von *P. vulgatus*

Zur Demonstration der Funktionalität der beiden Gegenselektionssysteme, welche in dieser Arbeit entwickelt worden waren, wurde die Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 1663$ erzeugt. Das deletierte Gen *bvu_1663* kodiert für die Exo- β -Fructosidase BVU_1663 und spielt eine zentrale Rolle im Fruktan-Metabolismus von *P. vulgatus*. Die Deletion von *bvu_1663* führte zu einem *P. vulgatus* Phänotyp, welcher Inulin- und Levan-FOS nicht mehr als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnte (Kap. 3.1.7). Dieser Phänotyp eignete sich für die Untersuchung des Fruktan-Stoffwechsels von *P. vulgatus* und der damit verbundenen Implikationen für den Stoffwechsel weiterer Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola*. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die Exo- β -Fructosidase BVU_1663 heterolog produziert und aufgereinigt. Durch anschließende Charakterisierung wurden Levan-FOS und Inulin-FOS als Substrat für die Exo- β -Fructosidase BVU_1663 bestätigt (Kap. 3.1.9.2). Bei diesen beiden Substanzen handelt es sich um gängige Präbiotika, welche nach dem Verzehr den Dickdarm erreichen und dort selektiv das Wachstum von gesundheitsfördernden Bakterien unterstützen (Van De Wiele *et al.*, 2007; Porras-Domínguez *et al.*, 2014). Dementsprechend besitzt die Aufklärung der Metabolisierung dieser Präbiotika durch die Darmmikrobiota eine hohe Relevanz für die Bewertung des präbiotischen Potenzials von Inulin-FOS und Levan-FOS. Aus diesem Grund werden im folgenden Kapitel die Analysen zum Phänotyp der Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 1663$ zur Modellierung des Fruktan-Stoffwechsels von *P. vulgatus* aufgearbeitet und in den Kontext der Fruktan-Verwertung von *Bacteroides/Phocaeicola*-Vertretern gesetzt.

4.2.1 Bedeutung von *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies für die Verwertung von Fruktan-Polymeren

Pflanzliche Nahrungsmittel besitzen einen hohen Gehalt an Ballaststoffen. Dabei handelt es sich primär um eine Mischung verschiedener Heteropolysaccharide, welche von Säugetieren selbst nicht verstoffwechselt werden. Aufgrund des Fehlens entsprechender Enzyme, welche für den Abbau dieser

4. Diskussion

komplexen Substrate notwendig sind, passieren pflanzliche Heteropolysaccharide zum Großteil den oberen Teil des Gastrointestinaltrakts und erreichen unverändert den Dickdarm. Somit bietet das Darmlumen eine Nische für eine Vielfalt an Mikroorganismen, welche auf den Abbau solcher komplexen Substrate spezialisiert sind (Flint *et al.*, 2012). Nur wenige Polysaccharide, wie z.B. Amylose, können bereits im Dünndarm hydrolysiert werden. Bestimmte Formen der Amylose, die über lange Amylopektin-Seitenketten verfügen, erreichen jedoch zum Großteil den distalen Verdauungstrakt. Trivial werden diese Polymere auch als resistente Stärke bezeichnet und stellen den größten Anteil an Polysacchariden dar, welche den Dickdarm erreichen (Englyst & Liu, 2007). Resistente Stärke wird im Dickdarm primär von *Ruminococcus bromii* (Walker *et al.*, 2011), aber auch von *Agathobacter rectalis* sowie Arten der Gattungen *Bifidobacterium*, *Bacteroides* und *Parabacteroides* verwertet (Wang *et al.*, 1999; Wang *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2010). Neben Stärke machen sogenannte Non Starch Polysaccharides (NSP) den nächst-größten Anteil an Polysacchariden im Darm aus (Choct, 1997). Bei diesen Polymeren handelt es sich um Cellulose, Pektin, Hemicellulosen (Xylane) und Inulin. Diese pflanzlichen Fasermoleküle weisen eine große Heterogenität bezüglich ihrer Monomere, Verknüpfungsarten sowie Seitenketten auf und benötigen daher einen erheblichen Stoffwechselaufwand, um als Kohlenstoff- und Energiequelle zu dienen. Gemessen an der Vielfalt von Darmbakterien im Dickdarm herrscht eine dementsprechend große interspezifische Konkurrenz um diese Substrate. Besonders Arten der Familie *Bacteroidaceae*, darunter auch der in dieser Arbeit verwendete Modell-Organismus *P. vulgatus*, gelten als äußerst potente Spezialisten für den Abbau eines großen Spektrums an pflanzlichen Heteropolysacchariden (Salysers *et al.* 1977). Mittels der Genomsequenzierung von Mikroorganismen konnten die genetischen Strukturen identifiziert werden, welche die nötigen Enzyme für den Abbau von Polysacchariden codieren (Grondin *et al.*, 2017). Die Sammlung der entsprechenden Gene werden als Polysaccharide Utilization Loci (PUL) bezeichnet. Alleine in *B. thetaiotaomicron* wurden über 170 Gene solchen PUL zugeordnet (Xu *et al.*, 2003).

Demnach liegt es nahe, dass Vertreter der Familie *Bacteroidaceae* auch in der Lage sind, die Fruktanpolymere Inulin und Levan zu verstoffwechseln (Sonnenburg *et al.*, 2010; Ernits *et al.*, 2019; Colnet *et al.*, 2021). Bei diesen Verbindungen handelt es sich um präbiotisch wirksame Polysaccharide, bestehend aus β -(2,1) (Inulin) und β -(2,6) (Levan) verknüpften Fruktose-Monomeren (Di Bartolomeo *et al.*, 2013). Im Rahmen der Entwicklung eines Deletionssystems für *P. vulgatus* wurde in dieser Arbeit als „Proof of Concept“ das Gen *bvu_1663* deletiert, welches laut Annotation für eine Exo- β -Fructosidase codiert (Kap. 3.1.6; 3.1.8). Dieses Enzym ist für die Hydrolysierung von Fruktan-Oligomeren (FOS) verantwortlich und ermöglicht es *P. vulgatus* Levan-FOS sowie Inulin-FOS als Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen (Kap. 3.1.9). Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, resultierte die Deletion von *bvu_1663* in einem *P. vulgatus* Phänotyp, welcher FOS nicht mehr als Substrat für die Biomassebildung verwertete (Kap. 3.1.7). Die weitere *in vitro*- und *in*

vivo-Charakterisierung des Enzyms BVU_1663 führte zu Ergebnissen, welche die bisherigen Erkenntnisse über die Fruktan-Verwertung durch *Phocaeicola* und *Bacteroides*-Spezies ergänzen.

4.2.2 Modellierung der Fruktan-Verwertung in *P. vulgatus*

Eine Studie von Sonnenburg *et al.* (2010) beschäftigte sich mit dem Abbau von Inulin und Levan durch verschiedene intestinale *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies, darunter auch *P. vulgatus*. Durch Wachstumsexperimente mit *B. thetaiotaomicron*, *B. caccae*, *B. ovatus*, *B. fragilis*, *B. uniformis* und *P. vulgatus* auf Levan bzw. Inulin wurde gezeigt, dass nur *B. thetaiotaomicron* in der Lage ist, Levan als Substrat zu verwenden. Außer *P. vulgatus* konnten die verbliebenen getesteten Organismen lediglich Inulin metabolisieren. Daher lässt sich aus dieser Studie ableiten, dass die Fähigkeit zum Abbau von Levan scheinbar die Fähigkeit zur Verwertung von Inulin ausschließt, und umgekehrt (Sonnenburg *et al.*, 2010). Eine ähnliche Beobachtung konnte erst kürzlich im Rahmen eines Forschungsprojekts in der Arbeitsgruppe von Prof. Deppenmeier (IfMB, Universität Bonn) dokumentiert werden. Durch Wachstumsexperimente mit Levan und Inulin als Substrat wurde nachgewiesen, dass *B. intestinalis* Levan, jedoch kein Inulin verwertet. *B. xylanisolvens* hingegen metabolisierte Inulin, zeigte aber kein Wachstum auf Levan (Persönliche Mitteilung Franziska Wienberg). In *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies, welche zur Metabolisierung von polymerem Levan und Inulin befähigt sind, erfolgt der Abbau der Polymere durch eine in der äußeren Zellmembran lokalisierte Endo- β -Fructosidase. Dieses Enzym spaltet die glykosidischen Bindungen innerhalb des Fruktan-Polymers, wodurch sukzessive Fruktan-Oligomere freigesetzt werden (Sonnenburg *et al.*, 2010; Bolam & Sonnenburg, 2011; Joglekar *et al.*, 2018; Ernits *et al.*, 2019). Diese Endo- β -Fructosidase ist in *Bacteroides*-Spezies jedoch spezifisch für entweder β -(2,1) - oder β -(2,6) -Verknüpfungen, womit die selektive Verwertung von Inulin oder Levan begründet wird (Joglekar *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2019).

Darüber hinaus existieren in *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies Enzyme, welche unabhängig von der Verknüpfungsart kurzkettige Inulin- oder Levan-FOS hydrolysieren. Am Beispiel von *B. thetaiotaomicron* setzt die Endo- β -Fructosidase BT1760 ausschließlich langkettiges Levan zu Levan-FOS um. Die Exo- β -Fructosidase BT1759 hingegen hydrolysiert sowohl L-FOS als auch I-FOS zu Fruktose-Monomeren (Sonnenburg *et al.*, 2010). In *B. thetaiotaomicron* befindet sich das Enzym BT1759 vermutlich im periplasmatischen Raum (Sonnenburg *et al.*, 2010). Der Transport von FOS über die äußere Membran erfolgt durch einen SusD/C Komplex (BT_1762/BT_1763), welcher für die Bindung und den Import von Kohlenhydrat-Oligomeren verantwortlich ist (Joglekar *et al.*, 2018). In dieser Arbeit wurde durch die Aufreinigung und Charakterisierung der Exo- β -Fructosidase BVU_1663 ebenfalls ein Enzym in *P. vulgatus* beschrieben, welche beide FOS-Typen hydrolysiert (Kap. 3.1.9). Die Deletion des korrespondierenden Gens *bvu_1663* führte zum Verlust der Fähigkeit von *P. vulgatus*, L-FOS oder I-FOS als Substrat zu verwerten (Kap. 3.1.7).

4. Diskussion

Um aufzuklären, ob es sich bei BVU_1663 um ein cytoplasmatisches, periplasmatisches oder membrangebundenes Protein handelt wurden in dieser Arbeit Experimente mit Membran- und Cytoplasma-Fractionen von *P. vulgatus* durchgeführt (Kap. 3.1.9.4). Es wurde nachgewiesen, dass lediglich die Membranfraktion eine hydrolytische Aktivität mit FOS aufwies, daher wurde BVU_1663 als membran-assoziiertes Protein eingeordnet (Kap. 3.1.9.4). Es folgten weitere Experimente um festzustellen, ob das Enzym mit der inneren oder äußeren Membran assoziiert ist. Analysen mit aufgereinigtem BVU_1663 zeigten in dieser Arbeit, dass das Enzym in geringem Maße polymeres Levan und Inulin hydrolysiert (Kap. 3.1.9.2). Dennoch konnte *P. vulgatus* nicht mit den respektiven Fruktan-Polymeren als Substrat kultiviert werden (Kap. 3.1.7). Anhand dieser Erkenntnisse wurde ein Experiment durchgeführt um die Verankerung von BVU_1663 in der äußeren Membran von *P. vulgatus* zu überprüfen. Es wurden gewaschene, lebensfähige Zellen mit Levan und Inulin vermischt und für 16h inkubiert (Kap. 3.1.9.3). Dabei konnte keine Freisetzung von Fruktose beobachtet werden. Aus diesem Grund wurde die These aufgestellt, dass es sich bei BVU_1663 mit der inneren Membran verankert ist und das aktive Zentrum des Enzyms in den periplasmatischen Raum ragt.

Anhand der vorhandenen Informationen für *B. thetaiotaomicron* im Hinblick auf die Fruktan-Verwertung und der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lässt sich für *P. vulgatus* ein Modell postulieren, welches den Abbau von Levan-FOS und Inulin-FOS darstellt (Abb. 51 B). Dafür wurden die Gene des Fruktan-Polysaccharide Utilization Locus (PUL) aus *B. thetaiotaomicron* herangezogen, um die entsprechenden Gene in *P. vulgatus* mittels Blast-Analysen und Sequenz-Alignments zu identifizieren (Abb. 51 A) (Sonnenburg *et al.*, 2010; Bolam & Sonnenburg, 2011; Joglekar *et al.*, 2018; Ernits *et al.*, 2019). In diesem Modell werden FOS durch das SusD-homolog BVU_1368 gebunden und anschließend aktiv durch das TonB-abhängige SusC-Porin BVU_1369 in den periplasmatischen Raum importiert. Dort werden die FOS durch die Exo- β -Fructosidase BVU_1663 zu Fruktose-Monomeren hydrolysiert. Freie Fruktose-Moleküle binden an die periplasmatische Sensor-Domäne des zwei-Komponenten Signal-Systems BVU_1666. Als Konsequenz werden regulatorische Proteine im inneren der Zelle aktiviert, welche die Synthese von Fruktose-verwertenden Enzymen beeinflussen. Das periplasmatische Import-Protein BVU_1664 schleust die freigesetzte Fruktose in das Cytosol, wo diese über Phosphorylierung durch eine Fructokinase (BVU_1665) in den zentralen Kohlenstoff-Metabolismus kanalisiert wird.

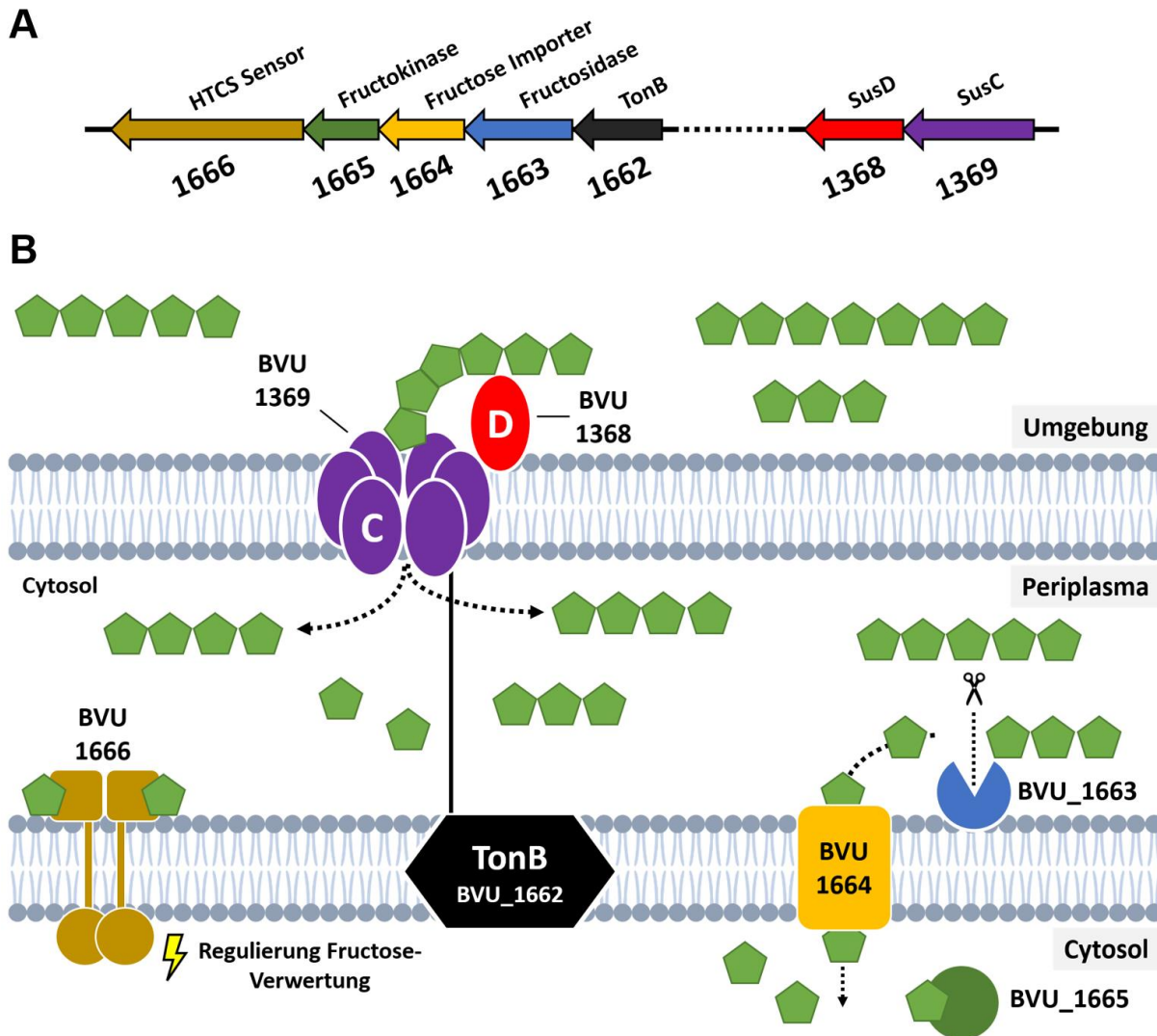


Abbildung 51: Modell der Verwertung von Inulin- FOS und Levan-FOS durch *P. vulgatus*. [A] Genomische Orientierung der Gene, welche für die Enzyme der Fruktan- und Fruktose-Verwertung in *P. vulgatus* codieren. Die Modellierung erfolgte über den Vergleich des Levan-PUL von *B. thetaiotaomicron* mit dem Fruktan-PUL von *P. vulgatus* (Sonnenburg *et al.*, 2010). [B] Modell der Fruktan-Verwertung in *P. vulgatus* auf molekularer Ebene. Fruktose wird durch die grünen Pentagone repräsentiert. Pentagon-Ketten repräsentieren sowohl Inulin- als auch Levan-FOS. HTCS: Hybrid two-component System.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Deletion der Exo- β -Fructosidase der BVU_1663 nicht nur für den Nachweis der SacB-basierten Deletionsmethode eignete, sondern auch zu Erkenntnissen bezüglich der Verwertung von Fruktanen durch *Bacteroides/Phocaeicola* Spezies führte. An dieser Stelle soll noch einmal die potenzielle Anwendung von SacB als Gegenselektionsmarkern in weiteren *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies aufgegriffen werden. Allgemein wird angenommen, dass sich SacB grundsätzlich nicht für die Anwendung in *Phocaeicola* und *Bacteroides*-Spezies eignet (Kino *et al.*, 2016, Bencivenga-Barry *et al.*, 2020). Diese Annahme basiert auf der Tatsache, dass viele *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies in der Lage sind, Levan zu verstoffwechseln (Sonnenburg *et al.*, 2010, Ernits *et al.*, 2019, Colnet *et al.*, 2021). Als Bestätigung für diese Annahme konnte in *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron* und *B. cellulosilyticus* gezeigt werden, dass die heterologe Expression von SacB

keinen letalen Effekt vermittelt (Kino *et al.*, 2016, persönliche Mitteilung Mélanie Gindt, 2023). Jedoch wurde für *B. fragilis* nachgewiesen, dass dieser Organismus nicht zur Metabolisierung von Levan befähigt ist (Sonnenburg *et al.*, 2010; Colnet *et al.*, 2021). Trotzdem scheint *B. fragilis* die Fähigkeiten zu besitzen, eine letale Akkumulation von Levan zu verhindern (Kino *et al.*, 2016). Eine Möglichkeit, dem letalen Effekt einer Expression von *sacB* entgegenzuwirken, wäre die Hydrolyse von Levan durch die 2,6- β -Fructofuranosidase BF3342. Dieser Mechanismus müsste sich jedoch ebenfalls auf *P. vulgaris* übertragen lassen, da die beiden Proteine BF3342 und BVU_1663 bezüglich ihrer Struktur und Sequenz große Homologien zueinander aufweisen. Für *B. thetaiotaomicron* könnte argumentiert werden, dass die Endo- β -Fructosidase BT1760 für eine Negierung des letalen Effekts der Levan-Akkumulation verantwortlich ist. Jedoch wurde von Ernits *et al.* (2019) nachgewiesen, dass das aktive BT1760 in einem Proteinkomplex in der äußeren Membran lokalisiert ist, und somit innerhalb der Zelle keine Funktion erfüllt. Die einzige Möglichkeit, den letalen Effekt einer Levan-Akkumulation im Periplasma zu negieren, wäre der Abbau von Levan im Periplasma während des Transports von BT_1760 zur Oberfläche der äußeren Membran. Trotz der Fähigkeit von *B. thetaiotaomicron* und *B. cellulosilyticus* polymeres Levan zu metabolisieren, besteht weiterhin Klärungsbedarf bezüglich *S. copri*. Dieser Organismus ist in der Lage, sowohl Levan als auch Inulin zu verstoffwechseln. Dennoch wurde SacB als Gegenselektionsmarker für die Deletion von Genen in *S. copri* angewendet (Li *et al.*, 2021). Die Argumentation wird noch komplexer, wenn davon ausgegangen wird, dass sich das durch SacB produzierte Levan im Periplasma von Gram-negativen Organismen akkumuliert (Jäger *et al.*, 1992; Pelicic *et al.*, 1996). Für *B. thetaiotaomicron* konnte gezeigt werden, dass im Periplasma die Exo- β -Fructosidase BT1759 lokalisiert ist, welche sowohl Levan- als auch Inulin-FOS hydrolysiert (Bolam & Sonnenburg, 2011). Angenommen, die Akkumulation von Levan im Periplasma würde über den gleichzeitigen Abbau von Levan durch BT1759 verhindert, so müsste dieser Mechanismus auch auf *P. vulgaris* übertragbar sein. In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass BVU_1663 sowohl im Periplasma aktiv ist, als auch zum Abbau von Levan- sowie Inulin-FOS befähigt ist. Dennoch vermittelte die heterologe Überexpression von *sacB* in *P. vulgaris* eine signifikante Sensibilität gegenüber Saccharose. Somit bleibt die Frage offen, ob eine eindeutige Vorhersage bezüglich der Effektivität von SacB als Gegenselektionsmarker in individuellen *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies abseits von Experimenten und nur anhand der bisher verfügbaren Informationen überhaupt möglich ist.

4.3 Homologe Überproduktion der Pyruvat:Formiat-Lyase (BVU2880) in *P. vulgaris*

Für die biotechnologische Nutzung von Mikroorganismen ist die Kanalisierung des Stoffwechsels zu Gunsten der gewünschten Substanzen von großem Vorteil, und der Einstieg für besagte Modifikationen betrifft meist den zentralen Kohlenstoffwechsel. Da es sich dabei um den Knotenpunkt für die Synthese aller lebensnotwendigen Substanzen in einem Organismus handelt, ist es wichtig

4. Diskussion

festzustellen, in welchem Ausmaß solche Modifikationen durchgeführt werden können. In *P. vulgaris* wurden erste Erkenntnisse über die Manipulation des Kohlenstoff-Metabolismus durch Lück & Deppenmeier (2022) erbracht. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass eine Überproduktion der Lactat-Dehydrogenase BVU_2499 zu einer deutlich erhöhten Bildung von Lactat als metabolisches Endprodukt führte. Um den Einfluss einer Überproduktion von weiteren metabolischen Endprodukten aus dem zentralen Kohlenstoff-Metabolismus zu analysieren wurde in dieser Arbeit, analog zu der Studie von Lück & Deppenmeier (2022), die Pyruvat:Formiat-Lyase (PFL, BVU_2880) [EC 2.3.1.54] in *P. vulgaris* überproduziert,

Bei Wachstum mit Glucose als Substrat bildet *P. vulgaris* im Rahmen des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus die Stoffwechselendprodukte Succinat, Lactat, Formiat, Acetat und Propionat. Formiat entsteht durch die Spaltung von Pyruvat zu Formiat und einem Acetyl-Rest durch die PFL. Der freigesetzte Acetyl-Rest wird anschließend auf Coenzym A übertragen und das verfügbare Acetyl-Coenzym A wird dem Anabolismus bereitgestellt oder weiter zu Acetat als Endprodukt umgewandelt. Die Enzymklasse der PFL ist als essenzieller Bestandteil des anaeroben Stoffwechsels in Mikroorganismen bereits gut untersucht. Die Enzyme der PFL-Klasse gehören zu der Gruppe der Glycyl Radical Enzymes (GRE) und sind abhängig von der Bildung eines Glycyl-Radikals durch ein PFL-aktivierendes Enzym (Buckel & Golding, 2006). In *P. vulgaris* konnte das Gen des PFL-aktivierenden Enzyms (*bvu_2879*) durch die direkte Nachbarschaft auf dem Genom zum *pfl*-Gen (*bvu_2880*), und über die Anwesenheit eines charakteristischen CxxxCxxC Eisen-Schwefel-Cluster-Motifs in der Aminosäure-Primärsequenz identifiziert werden. Da Formiat als metabolisches Endprodukt von *P. vulgaris* nicht weiter verstoffwechselt wird und in Folge im Medium akkumuliert, sollte in dieser Arbeit durch die Überproduktion der PFL der zentrale Kohlenstofffluss in Richtung Formiat gelenkt werden (Kap. 3.2). Auf Basis des Shuttle-Vektors pG106 wurde das Plasmid pG106 2880 generiert, welches die konstitutive homologe Überexpression des Gens *bvu_2880* in *P. vulgaris* ermöglicht. Über den Vergleich der Endprodukt-Konzentrationen des *P. vulgaris* Wildtyps und des Plasmid-tragenden Stamms *P. vulgaris* pG106 2880 ließ sich ein eindeutiger Einfluss auf den Kohlenstoff-Metabolismus erkennen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Überexpression von *bvu_2880* führte zu einer Erhöhung der Formiat-Produktion von $3,5 \pm 0,3$ mmol/g TG auf $11,2 \pm 1,8$ mmol/g TG in der Plasmid-tragenden Mutante *P. vulgaris* pG106 2880 (Kap. 3.2.3). Der genaue Einfluss der PFL-Überproduktion auf den zentralen Stoffwechsel von *P. vulgaris* wird in den folgenden Absätzen näher beleuchtet.

Über die Identifizierung der Enzyme, welche dem zentralen Kohlenstoff-Metabolismus von *P. vulgaris* zugeordnet werden können, lässt sich über den Abbau von Glucose die Erzeugung von Energieträgern und Reduktionsäquivalenten nachvollziehen (Abb. 52). Zunächst wird Glucose über die Glykolyse zu PEP umgesetzt. An dieser Stelle spaltet sich der Stoffwechsel von *P. vulgaris* in zwei Wege: Einen

4. Diskussion

„fermentativen“ Pfad, welcher zur Bildung der Endprodukte Lactat, Formiat und Acetat führt und einen „respiratorischen“ Pfad, in welchem Succinat im Zuge der anaeroben Fumarat-Atmung gebildet wird. Hierbei dient Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor, welcher durch die membrangebundene Fumarat-Reduktase (BVU_1239-1241) zu Succinat reduziert wird. Succinat kann abschließend weiter zu Propionat verstoffwechselt werden. Der fermentative Pfad wird über die Dephosphorylierung von PEP zu Pyruvat durch eine Pyruvat-Kinase (BVU_0876) eingeleitet. Ausgehend von Pyruvat kann über die Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) Pyruvat zu Lactat reduziert werden, oder es entsteht Formiat und Acetyl-CoA durch die katalytische Aktivität der Pyruvat:Formiat Lyase (BVU_2880). Bei Lactat und Formiat handelt es sich um Endprodukte von *P. vulgatus*, welche keinen Zweck mehr im Stoffwechsel erfüllen. Als dritte Möglichkeit kann Pyruvat auch über die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreductase (BVU_3787), unter Freisetzung von CO₂ und Reduktionsäquivalenten in Form von Fd_{red}, zu Acetyl-CoA umgesetzt werden. Acetyl-CoA steht weiteren Stoffwechselprozessen zur Verfügung oder wird, unter Generierung von ATP, zu Acetat metabolisiert.

Der respiratorische Pfad beginnt mit der Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat mittels einer PEP-Carboxykinase. Oxalacetat wird über Malat zu Fumarat reduziert, welches abschließend, im Rahmen der Fumarat Atmung zu Succinat durch eine Fumarat-Reduktase (BVU_1239-1241), unter Verbrauch von Reduktionsäquivalenten, reduziert wird. *P. vulgatus* besitzt keinen geschlossenen Citrat-Zyklus und ist daher in der Lage, Oxalacetat über einen oxidativen Abschnitt zu Succinat zu verstoffwechseln. Dieser oxidative Weg führt zur Bildung von Reduktionsmitteln und Vorstufen für Biosynthesen und wird daher als anaboler Prozess eingeordnet. Ein Teil des gebildeten Succinat kann anschließend weiter zu Propionat umgesetzt werden. Durch eine CoA-Transferase (BVU_1163) wird Succinat mit CoA zu Succinyl-CoA verknüpft. Das Enzym Methylmalonyl-CoA Mutase (BVU_0309/0310) konvertiert dann Succinyl-CoA zu Methylmalonyl-CoA, welches im Anschluss über eine MM-CoA-Decarboxylase (BVU_2941) zu Propionyl-CoA umgewandelt wird. Abschließend wird der Propionyl-Rest als Propionat unter Freisetzung von CoA durch die CoA-Transferase BVU_1163 abgespalten.

4. Diskussion

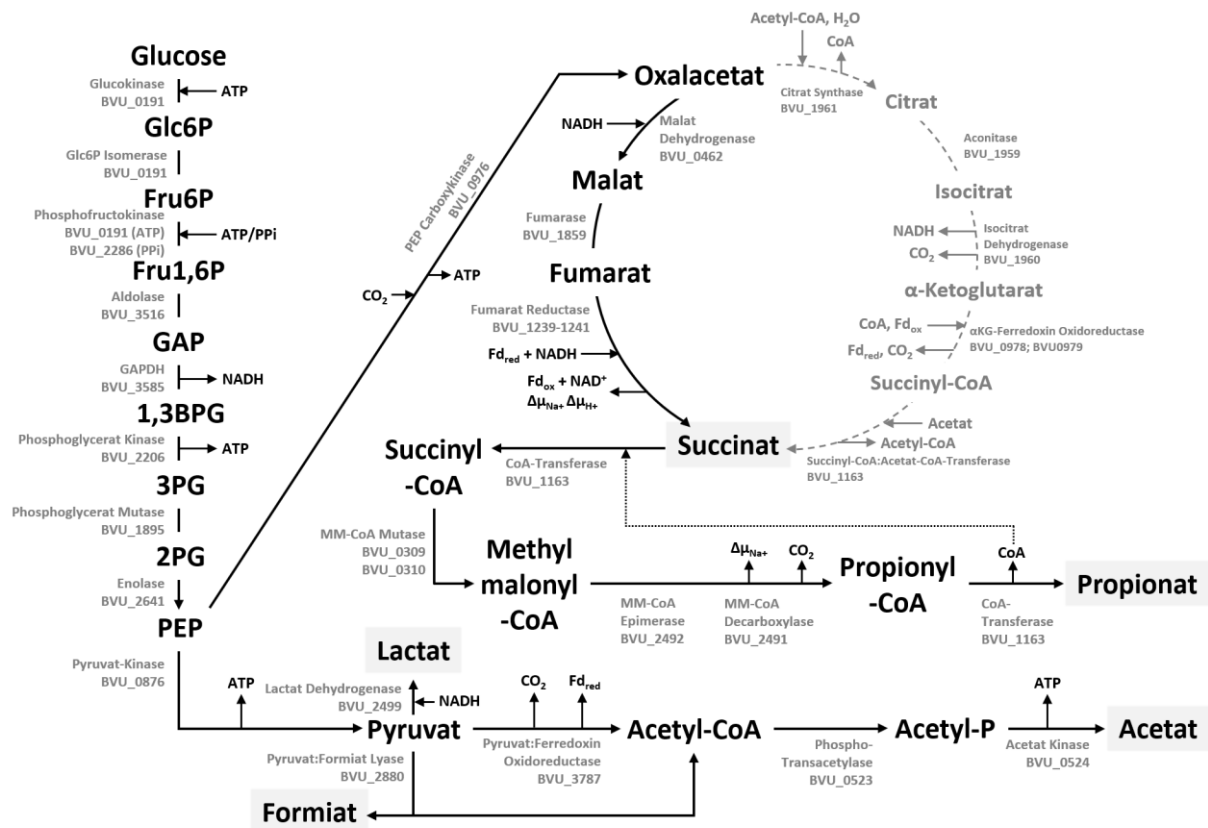


Abbildung 52: Schematische Darstellung des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus in *P. vulgatus* unter Berücksichtigung der Produktion der Stoffwechselendprodukte. Gezeigt wird die Produktion von Formiat, Lactat, Acetat, Succinat und Propionat, ausgehend von Glucose. Die beteiligten Enzyme sind in hellgrau an der jeweiligen Reaktion hinterlegt. Hellgrauer Stoffwechselweg gilt als anaboler Prozess. Glc: Glucose; Fru: Fruktose; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; P: Phosphat; PG: Phosphoglycerat; PEP: Phosphoenolpyruvat; DH: Dehydrogenase; Fd: Ferredoxin; ox: Oxidiert; red: Reduziert; CoA: Coenzym A; MM: Methylmalonyl.

Im Rahmen des Kohlenstoff-Metabolismus erzeugt *P. vulgatus* Reduktionsäquivalente in Form von NADH und Fd_{red}, welche primär als Elektronendonatoren für die Proteinkomplexe der anaeroben Atmungskette dienen. Darüber hinaus werden diese Reduktionsäquivalente auch über weitere Reduktionen im zentralen Metabolismus, wie beispielsweise der Reduktion von Pyruvat zu Lactat, verbraucht.

In dieser Arbeit wurden die Konzentrationen der Stoffwechsel-Endprodukte sowie der Substrat-Verbrauch von *P. vulgatus* Wildtyps und der Plasmid-tragenden Mutante *P. vulgatus* pG106 2880 bestimmt (Kap. 3.2.3). Zu diesem Zweck wurden HPLC-Analysen zu verschiedenen Zeitpunkten der exponentiellen Wachstumsphase durchgeführt um die Konzentrations-Veränderungen von Glucose, Succinat, Lactat, Formiat, Acetat und Propionat zu quantifizieren. Anhand der unterschiedlichen Endproduktkonzentrationen kann der Fluss der Intermediate des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus berechnet werden. Diese Aufarbeitung ermöglicht auch eine Bilanzierung für die aufgewendeten Reduktions- und Oxidationsmittel (Redox-Bilanz) sowie des benötigten Kohlenstoffs für die Bildung von Endprodukten und Biomasse ([C]-Bilanz). Die Rekonstruktion des Stoffwechsels basiert auf einer

4. Diskussion

Analyse der Elementarzusammensetzung von *S. copri*. Im Rahmen einer Studie von Franke & Deppenmeier (2018) wurde gezeigt, dass die kleinste Einheit der Biomasse von *S. copri* im Vergleich zum Substrat Glucose ($C_6H_{12}O_6$) in einem reduzierteren Zustand im Organismus ($C_1H_{1,79}O_{0,44}$) vorliegt. Im Folgenden soll, anhand der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse (Kap. 3.2.3), über eine theoretische Berechnung der Intermediate des *P. vulgatus*-Stoffwechsel die Verschiebung der Endproduktverhältnisse von der *P. vulgatus* pG106 2880 PFL-Überproduktionsmutante mit dem Wildtyp verglichen und diskutiert werden (Abb. 53).

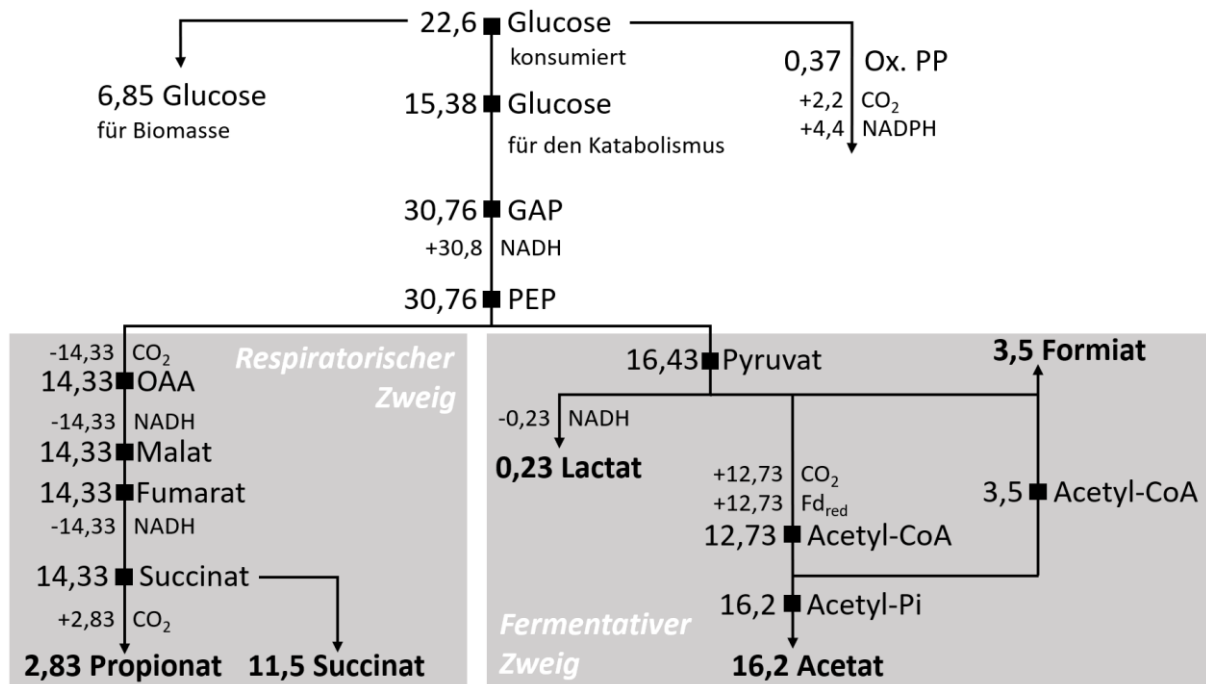


Abbildung 53: Flussschema der Intermediate des zentralen C-Stoffwechsels des *P. vulgatus* Wildtyp mit Glucose als Substrat. Die Werte sind angegeben in mmol pro Gramm Zelltrockenmasse. Die Stoffwechsel-Endprodukte sind durch fette Schrift hervorgehoben. Die Zugehörigkeit der Stoffwechsel-Prozesse zum respiratorischen bzw. fermentativen Zweig sind durch die eine graue Box gekennzeichnet. Ox. PP: Oxidativer Pentosephosphatweg; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; OAA: Oxalacetat; CoA: Coenzym A.

Bei Wachstum auf DMMG-Medium waren die quantifizierbaren Stoffwechselendprodukte von *P. vulgatus* Succinat, Lactat, Formiat, Acetat und Propionat. Im respiratorischen Zweig des Stoffwechsels entstand Succinat, welches zum Teil zu Propionat umgesetzt wurde. Dementsprechend bildet die Summe aus Propionat (2,83 mmol/ g TG) und Succinat (11,5 mmol/ g TG) die ursprüngliche Konzentration an Fumarat, Malat und Oxalacetat (14,33 mmol/g TG). Die Reduktion von Oxalacetat zu Malat, und von Malat zu Succinat verbraucht Reduktionsäquivalente in Form von NADH, daher entsprach die benötigte Menge NADH 2 x 14,33 mmol/g TG. Im fermentativen Zweig ließ die Summe der Konzentrationen von Acetat (16,2 mmol/g TG) und Lactat (0,23 mmol/g TG) den Rückschluss auf 16,43 mmol Pyruvat/ g TG zu. Da die Reduktion von Pyruvat zu Lactat NADH als Elektronen-Donor benötigt, konnte aus der Konzentration von Lactat der Verbrauch von 0,23 mmol NADH/g TG ermittelt

4. Diskussion

werden. Die Differenz zwischen der Formiat-Konzentration (3,5 mmol/g TG) und der detektierten Acetat-Konzentration (16,2 mmol/g TG) gab Aufschluss darüber, dass 12,73 mmol/g TG Pyruvat über die Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreductase decarboxyliert, und somit dieselbe Konzentration an Fd_{red} gebildet wurde. Abschließend ergab die Summe aus den rekonstruierten 14,33 mmol/g TG Oxalacetat des respiratorischen Zweigs und 16,43 mmol/g TG Pyruvat des fermentativen Zweigs eine Konzentration von 30,76 mmol/g TG PEP, welche aus der katabolen Umsetzung von Glucose entstand. Da PEP durch die Oxidation von GAP entsteht, wurden an dieser Stelle 30,76 NADH gebildet. Aus einem Molekül Glucose (C6 Körper) entstehen zwei Moleküle GAP (C3-Körper), demnach entsprach die Konzentration an Glukose, welche in den Katabolismus investiert wurde, 15,38 mmol/g TG.

In den zu Grunde liegenden Wachstumsexperimenten verbrauchte *P. vulgatus* insgesamt 22,6 mmol/g TG Glucose (Abb. 53). Aus den Konzentrationen der Stoffwechsel-Endprodukte ließ sich ableiten, dass 15,38 mmol/g TG Glucose für den Katabolismus aufgewendet wurden. Die verbleibenden 7,22 mmol/g TG Glucose wurden, unter Berücksichtigung der Redox-Bilanz sowie der [C]-Bilanz, zum Teil dem oxidativen Pentosephosphatweg sowie dem Anabolismus von *P. vulgatus* zugeordnet. Die Elementaranalyse für *S. copri*, auf denen die in dieser Arbeit durchgeführten Berechnungen beruht, ergab, dass sich 1 g Trockengewicht aus 48,5% Kohlenstoff zusammensetzt (Franke & Deppenmeier, 2018). Dies entspricht 0,485 g Kohlenstoff oder 40,4 mmol C-Atome, welche in sich 1 g Zelltrockenmasse befinden. Um die [C]-Bilanz des *P. vulgatus* Wildtyps im Rahmen der Rekonstruktion des Stoffwechsels auszugleichen wurden 6,85 mmol Glucose/g TG dem Anabolismus zugeordnet. Daraus resultierten 41,1 mmol C-Atome/g TG ($6 \times 6,85$ mmol Glucose/g TG), welche für anabole Prozesse aufgewendet wurden. Setzt man diesen [C]-Bedarf in ein Verhältnis mit den ermittelten 40,4 mmol C-Atome/g TG von Franke & Deppenmeier (2018), dann ergibt sich daraus eine [C]-Bilanz von 101,7 %.

Für die Aufstellung der Redox-Bilanz mussten, für die Umwandlung von Glucose in Biomasse, demnach 41,1 mmol $\text{C}_1\text{H}_2\text{O}_1$ -Einheiten/g TG in 41,1 mmol $\text{C}_1\text{H}_{1,79}\text{O}_{0,48}$ -Einheiten/g TG reduziert werden (Franke & Deppenmeier, 2018). Die [H]-Äquivalente mussten von 82,2 mmol/g TG auf 73,6 mmol/g TG und die [O]-Äquivalente von 41,1 mmol/g TG auf 17,7 mmol/g TG reduziert werden. Dies entsprach einer [H]-Differenz von 8,6 mmol/g TG und einer [O]-Differenz von 23,4 mmol/g TG, welche entsprechend über Reduktionen entfernt werden mussten. Sauerstoff kann in *P. vulgatus* zellulär nur in Form von Wasser (H_2O) entfernt werden, daher änderte sich der Bedarf an [H]-Äquivalenten, sodass nunmehr 38,2 mmol [H] katabol gebildet werden mussten, um 1 g TG zu erzeugen ($(23,4 \text{ mmol [O]} \times 2) - 8,6 \text{ mmol [H]}$) (s. Tab. 31).

4. Diskussion

Tabelle 31: Berechnung der Redox-Bilanz und [C]-Bilanz von *P. vulgatus* DSM 1447 bei Wachstum auf Glucose

Komponente	mmol/g TG	Berechnung
Glucose für den Anabolismus	6,85	$\text{Glucose}_{\text{Gesamt}} - \text{Glucose}_{\text{Katabolismus}} - \text{Glucose}_{\text{OxPP}}$
$\text{C}_1\text{H}_2\text{O}_1$ -Einheiten	41,1	6,85 mmol Glucose x 6 C-Atome
[H] aus $\text{Glucose}_{\text{Anabolismus}}$	82,2	6,85 mmol Glucose x 12 H-Atome
[H]-Bedarf für Zellmaterial	73,6	40,1 $\text{C}_1\text{H}_2\text{O}_1$ -Einheiten x 1,79
[H]-Überschuss	8,6	$[\text{H}]_{\text{Glucose}} - [\text{H}]_{\text{Bedarf Zellmaterial}}$
[O]-Äquivalente aus $\text{Glucose}_{\text{Anabolismus}}$	41,1	6,85 mmol Glucose x 6 O-Atome
[O]-Bedarf für Zellmaterial	17,7	41,1 $\text{C}_1\text{H}_2\text{O}_1$ -Einheiten x 0,44
[O]-Überschuss	23,4	$[\text{O}]_{\text{Glucose}} - [\text{O}]_{\text{Bedarf Zellmaterial}}$
[H] zur Entfernung von [O] in H_2O	46,9	$[\text{O}]_{\text{Überschuss}} \times 2$
[H] aus dem Katabolismus	29,2	61,52 mmol [H] aus der GAP-Oxidation + 25,46 mmol [H] aus der Pyruvat Oxidation – 57,8 mmol [H] für OAA-Reduktion (Abb. 53).
[H]-Gesamtbedarf	38,2	$[\text{H}]_{\text{Entfernung von [O]}} - [\text{H}]_{\text{Überschuss}}$
Glucose für den oxidativen PPW	0,37	
[H] aus dem oxidativen PPW	8,9	Entsteht aus 0,53 mmol Glucose im OxPP
Summe verfügbares [H]	38,1	$[\text{H}]_{\text{Katabolismus}} + [\text{H}]_{\text{OxPP}}$
[H]-Bilanz	99,6 %	$38,1 \times 100/38,2$
[C]-Bilanz	101,7 %	$41,1 \times 100/40,4$

Um die Redox-Bilanz auszugleichen ergab sich, anhand dieser Berechnungen, ein zusätzlicher Bedarf von 8,9 mmol/g TG [H]-Äquivalenten für die Bildung von $[\text{H}_2\text{O}]$, welcher nicht über den Katabolismus gedeckt wurde. Um diesen Mangel zu kompensieren besteht für *P. vulgatus* die Möglichkeit über den oxidativen Pentosephosphatweg (OxPP) die benötigten Reduktionsäquivalente zu erzeugen (Abb. 54). Im OxPP wird zunächst Glucose-6P zu Gluconolacton-6P umgewandelt. Katalysiert wird diese Reaktion durch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym Glucose-6P-Dehydrogenase (G6PDH; BVU_2796). Somit wird durch dieses Enzym der G6P-Fluss bestimmt, der in den Stoffwechsel geleitet wird (Ge *et al.*, 2020). Nach einer Umwandlung von Gluconolacton-6P zu Gluconat-6P durch eine Phosphogluconolactonase (BVU_2797) katalysiert eine Gluconat-6P-Dehydrogenase (BVU_2975) die Bildung von Ribulose-5P unter Freisetzung von CO_2 . Die beiden Reaktionen von Glucose-6P zu Gluconolacton-6P sowie von Gluconat-6P zu Ribulose-5P sind irreversibel und NAD(P)^+ abhängig, sodass schlussendlich NAD(P)H gebildet wird (Abb. 54). Die beiden zentralen Schlüsselenzyme des nicht-oxidativen Zweiges sind die Transketolase (BVU_2318) und die Transaldolase (BVU_3333). Beide Enzyme sind für die reversible Umformung von C3-, C5- und C6-Körpern essenziell (Horecker *et al.*, 1954). Zunächst katalysieren die Ribose-5P-Isomerase (BVU_2317) und die Ribulose-3P-Epimerase (BVU_0050) die reversible Umwandlung von Ribulose-5P zu Ribose-5P und Xylulose-5P. Die Transketolase nutzt Xylulose-5P als Ketosedonor und Ribose-5P oder Erythrose-4P als Aldoseakzeptor zur Generierung von GAP und Sedoheptulose-7P oder GAP und Fruktose-6P (Stincone *et al.*, 2015). Somit katalysiert die Transketolase den Transfer von C2-Einheiten und leitet den Kohlenstofffluss zwischen dem nicht-oxidativen PPW und der Glykolyse bzw. Gluconeogenese in beide Richtungen

4. Diskussion

(Stincone *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2020). Die Transaldolase katalysiert hingegen den reversiblen Transfer von C3-Einheiten, sodass bei dessen Übertragung von Sedoheptulose-7P auf GAP Erythrose-4P und Fruktose-6P entstehen (Abb. 54). Bei Bedarf werden die glykolytischen Zwischenprodukte GAP und Fruktose-6P in den EMP-Weg eingeschleust. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass Fruktose-6P mittels einer Glucose-6P-Isomerase in Glucose-6P umgewandelt wird, welches in den oxidativen Zweig des PPW zurückgeführt werden kann, um in Folge dessen zusätzliche [H] zu generieren (Abb. 54). Auf diese Weise kann Glucose theoretisch vollständig zu CO₂ und [H] oxidiert werden, wenn der Kreislauf sechs-mal durchlaufen wird. Dabei entstehen 12 Moleküle NAD(P)H.

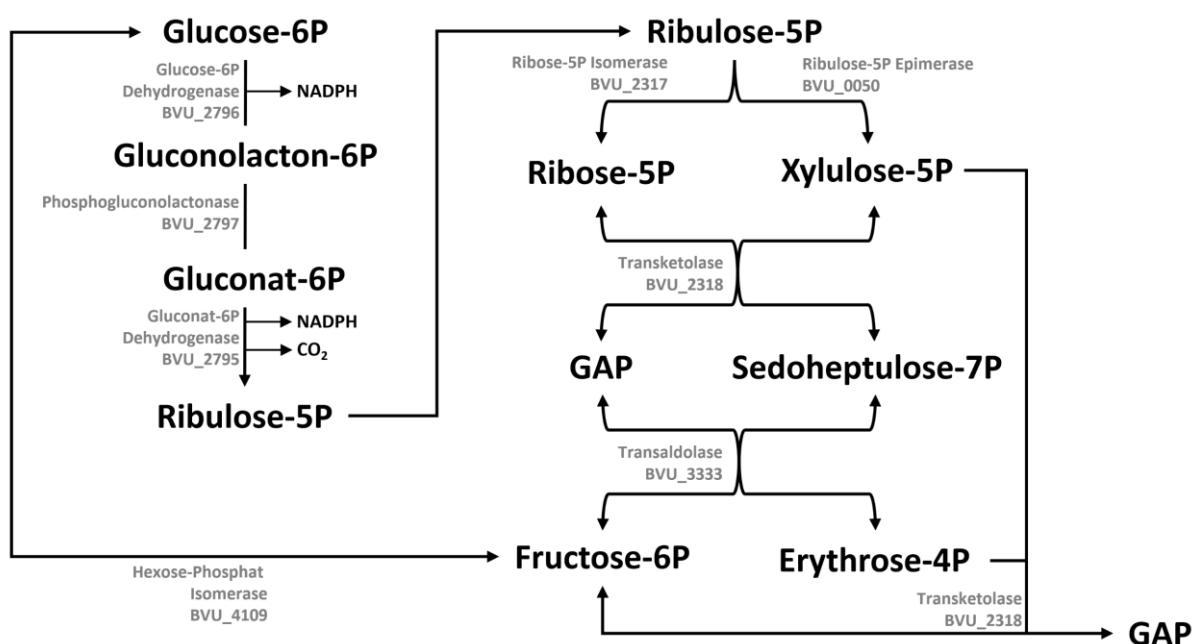


Abbildung 54: Schematische Darstellung des Pentosephosphatwegs in *P. vulgatus*. Die beteiligten Enzyme sind in hellgrau an der jeweiligen Reaktion hinterlegt. DH: Dehydrogenase; P: Phosphat; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat.

Es wurde berechnet, dass 0,167 Moleküle Glucose im oxidativen Pentosephosphatweg zur Bildung von einem Molekül CO₂ und vier Reduktionsäquivalenten in Form von zwei NADPH führen. Basierend auf dieser Annahme würde die Umleitung der restlichen 0,37 mmol/g TG Glucose aus den konsumierten 22,6 mmol/g TG in den OxPP zu der Bildung der fehlenden 8,9 mmol/g TG an Reduktionsäquivalenten führen, die für den Ausgleich der Redox-Bilanz entscheidend sind (s. Abb 53 & Tab. 31). Das Verhältnis zwischen dem [H]-Gesamtbedarf (38,2 mmol/g TG) und der Summe aus den Reduktionsäquivalenten, welche aus dem OxPP sowie dem Katabolismus stammten (38,1 mmol/g TG), entsprach somit einer [H]-Bilanz von 99,6% (s. Tab. 31). Somit konnten sowohl die [C]-Bilanz als auch die Redox-Bilanz nach einer Rekonstruktion des Stoffwechsels für *P. vulgatus* Wildtyp ausgeglichen werden.

4. Diskussion

Analog zu der Rekonstruktion des Stoffwechsels für den *P. vulgatus* Wildtyp wurde diese Rekonstruktion ebenfalls für den Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgatus* pG106 2880 durchgeführt (Abb. 55).

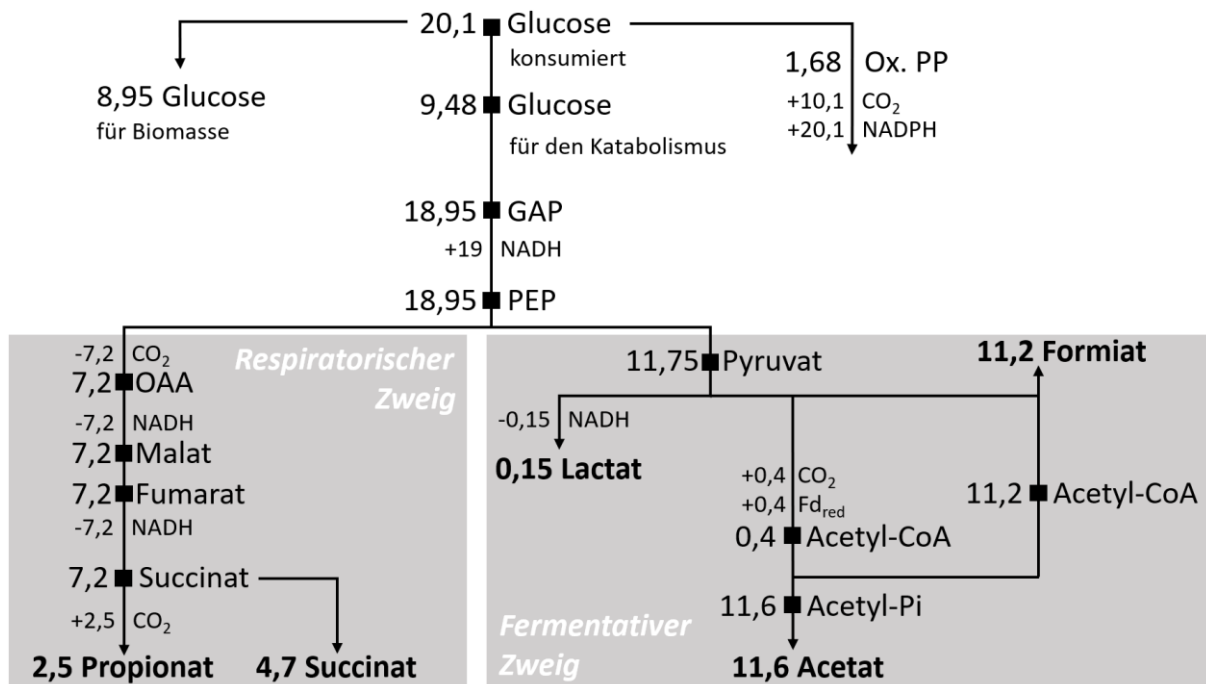


Abbildung 55: Flussschema der Intermediate des zentralen C-Stoffwechsels des Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgatus* pG106 2880 mit Glucose als Substrat. Die Werte sind angegeben in mmol pro Gramm Zelltrockensubstrat. Die Stoffwechsel-Endprodukte sind durch fette Schrift hervorgehoben. Die Zugehörigkeit der Stoffwechsel-Prozesse zum respiratorischen bzw. fermentativen Zweig sind durch die eine graue Box gekennzeichnet. Ox. PP: Oxidativer Pentosephosphatweg; GAP: Glycerinaldehyd-3-Phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; OAA: Oxalacetat; CoA: Coenzym A.

Durch die Überproduktion der PFL wurde erwartungsgemäß, im Vergleich zum Wildtyp, ein deutlich größerer Teil des Pyruvats für die Bildung von Formiat abgezogen. So entstand nach wie vor das zentrale Intermediat Acetyl-Coenzym A, allerdings wurde die Bildung von Reduktionsäquivalenten in Form von Fd_{red} durch die Pyruvat: Ferredoxin Oxidoreductase stark reduziert. Dies hatte indirekt eine Auswirkung auf die Bildung von Succinat im Zuge der anaeroben Fumaratatmung. Im Vergleich zum *P. vulgatus* Wildtyp (11,5 mmol Succinat/g TG) bildete der Plasmid-tragende Stamm weniger als die Hälfte an Succinat (4,7 mmol/g TG) (Kap. 3.2.3). Theoretisch ließe sich dieser Mangel an Reduktionsäquivalenten ausgleichen, indem ein größerer Anteil von Kohlenstoff in Form von Glucose in den oxidativen Pentosephosphatweg geschleust würde. In diesem Zusammenhang wäre knapp die 4,5-Fache Konzentration an Glucose (1,68 mmol/g TG) erforderlich, um genügend Reduktionsäquivalente für den Ausgleich der Redox-Bilanz in *P. vulgatus* pG106 2880 zu bilden. Auf diesem Wege ließe sich die Redox-Bilanz (99,9%) zufriedenstellend ausgleichen. Allerdings hatte dies auch eine Auswirkung auf die [C]-Bilanz, welche unter Berücksichtigung der Menge an Glucose, welche in den OxPP fließt, bei 132,8 % lag (s. Tab. 32).

4. Diskussion

Tabelle 32: Berechnung der Redox-Bilanz und [C]-Bilanz von *P. vulgatus* pG106 2880 bei Wachstum auf Glucose

Komponente	mmol/g TG	Berechnung
Glucose für den Anabolismus	8,95	$\text{Glucose}_{\text{Gesamt}} - \text{Glucose}_{\text{Katabolismus}} - \text{Glucose}_{\text{OxPP}}$
C ₁ H ₂ O ₁ -Einheiten	53,7	6,69 mmol Glucose x 6 C-Atome
[H] aus Glucose _{Anabolismus}	107,3	6,69 mmol Glucose x 12 H-Atome
[H]-Bedarf für Zellmaterial	96,1	40,1 C ₁ H ₂ O ₁ -Einheiten x 1,79
[H]-Überschuss	11,3	$[\text{H}]_{\text{Glucose}} - [\text{H}]_{\text{Bedarf Zellmaterial}}$
[O]-Äquivalente aus Glucose _{Anabolismus}	53,7	6,69 mmol Glucose x 6 O-Atome
[O]-Bedarf für Zellmaterial	23,1	40,1 C ₁ H ₂ O ₁ -Einheiten x 0,44
[O]-Überschuss	30,6	$[\text{O}]_{\text{Glucose}} - [\text{O}]_{\text{Bedarf Zellmaterial}}$
[H] zur Entfernung von [O] in H ₂ O	61,2	$[\text{O}]_{\text{Überschuss}} \times 2$
[H] aus dem Katabolismus	9,6	37,9 mmol [H] aus der GAP-Oxidation + 0,8 mmol [H] aus der Pyruvat Oxidation – 29,1 mmol [H] für OAA-Reduktion (Abb. 55).
[H]-Gesamtbedarf	49,9	$[\text{H}]_{\text{Entfernung von [O]}} - [\text{H}]_{\text{Überschuss}}$
Glucose für den OxPP	1,68	
[H] aus dem OxPP	40,2	Entsteht aus 1,68 mmol Glucose im OxPP
Summe verfügbares [H]	49,8	$[\text{H}]_{\text{Katabolismus}} + [\text{H}]_{\text{OxPP}}$
[H]-Bilanz	99,9 %	$48,6 \times 100/48,8$
[C]-Bilanz	132,8 %	$52,5 \times 100/40,4$

Entsprechend des Bedarfs von 40,4 mmol C/g TG konnten in der hier durchgeführten Berechnung 13,3 mmol C/g TG nicht zugeordnet werden ($53,7 \text{ mmol C/g TG} - 40,4 \text{ mmol C/g TG} = 13,3 \text{ mmol C/g TG}$). Eine mögliche Erklärung wäre die Bildung von weiteren Endprodukten durch *P. vulgatus*, welche nicht im Rahmen der durchgeführten Experimente nachgewiesen werden konnten. Es ist z.B. bekannt, dass Spezies des Phylums Bacteroidota das Polysaccharid Glykogen, bestehend aus Glucose-Einheiten, als Speicherstoff einlagern (Lindner *et al.* 1979; Lou *et al.* 1997; Takahashi und Yamada, 2000). Da die zugrundeliegende Elementaranalyse auf *S. copri* basiert und dieser ebenfalls Glykogen produziert, gilt die Produktion von Speicherstoffen in den Berechnungen theoretisch als berücksichtigt. Durch die Einschränkung der Produktion von Fd_{red} über die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreductase fehlen *P. vulgatus* pG106 2880 Reduktionsäquivalente, welche durch den Pentosephosphatweg ausgeglichen werden könnten. Grundsätzlich muss berücksichtigt werden, dass der Energiehaushalt der Zelle durch die Überproduktion der PFL gestört wird. Im *P. vulgatus* Wildtyp besteht die Möglichkeit, die Redox-Bilanz über die Bildung von Fd_{red} durch die Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreductase zu regulieren, während diese Regulierung in *P. vulgatus* pG106 2880 zum Großteil entfällt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Hypothese jedoch nicht weiter untersucht, sodass dies einen interessanten Ansatzpunkt für künftige Experimente darstellt. Beispielsweise könnte man Stoff-Fluss Analysen mit radioaktiv markiertem Kohlenstoff (¹³C) durchführen, da dieser durch seinen Einbau in die Endprodukte genauere Quantifizierungen ermöglicht (Hollinshead *et al.*, 2019).

4. Diskussion

In zukünftigen Experimenten wäre, für die Ergänzung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse, eine Aufreinigung und Charakterisierung der PFL sinnvoll. Aufgrund der komplexen Reaktionsbedingungen gestaltet sich die Arbeit mit Enzymen der PFL-Klasse jedoch als äußerst herausfordernd. Das Enzym befindet sich nach der Translation in einem inaktiven Zustand und muss zunächst unter anaeroben Bedingungen durch das PFL-aktivierende Enzym (PFL-AE) eine Konformationsänderung erfahren (Frey *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 2010; Crain & Broderick, 2014). Unter natürlichen Bedingungen bildet das PFL-AE über reduzierte Eisen-Schwefel-Cluster ein S-Adenosylmethionin-Radikal. Das dafür benötigte S-Adenosylmethionin wird wiederum von einer S-Adenosylmethionin Synthetase (BVU_1184) bereitgestellt und die Reduktion der Eisen-Schwefel-Cluster des PFL-AE erfolgt durch reduziertes Flavodoxin (BVU_3217). Dieses S-Adenosyl-Radikal katalysiert die Entfernung eines Wasserstoff-Atoms des Glycin-Rests Gly⁷¹⁷ im aktiven Zentrum der PFL, wodurch die PFL nach einer Konformationsänderung den aktiven Zustand erreicht (Broderick *et al.*, 1997). Die Reaktion der PFL läuft dann in zwei Schritten ab. Die aktivierte PFL setzt nach der Spaltung von Pyruvat Formiat frei, wobei der Acetyl-Rest weiterhin mit dem Enzym assoziiert bleibt. Anschließend wird der Acetyl-Rest auf Coenzym A übertragen (Knappe *et al.*, 1974). Die Aktivierung der PFL kann auch *in vitro* erfolgen, benötigt dafür jedoch einen komplexen Reaktionsansatz. Aufgrund der Sauerstoff-sensiblen Eisen-Schwefel-Cluster muss primär das PFL-aktivierende Enzym anaerob aufgereinigt werden. Um eine Reduktion der Eisen-Schwefel Cluster des PFL-AE zu erzwingen wird zunächst das Riboflavin-Derivat 5-Deazariboflavin unter einer leistungsstarken Halogen-Lampe photoreduziert. Die gemeinsame Inkubation von PFL-aktivierendem Enzym, photoreduziertem 5-Deazariboflavin sowie S-Adenosylmethionin sorgt für die Bildung des S-Adenosyl-Radikals in Assoziation mit dem PFL-AE. In diesem Zustand kann die PFL abschließend durch das PFL-AE in den aktiven Zustand versetzt werden (Walsby *et al.*, 2002).

Zusammenfassend führte in dieser Arbeit die homologe Überexpression des *pfl*-Gens (*bvu_2880*) zu einer Steigerung der Formiat-Produktion in *P. vulgaris*. Trotz der hier diskutierten komplexen Begebenheiten, welche für die Aktivität der PFL notwendig sind, reichte eine Erhöhung der Transkriptmenge des *pfl*-Gens *bvu_2880* über den Shuttle-Vektor pG106 bereits aus, um das Spektrum der Stoffwechselendprodukte von *P. vulgaris* zu Gunsten von Formiat zu verschieben. Dies bestätigt, dass sich der zentrale Kohlenstoff-Metabolismus von *P. vulgaris* gezielt zur Produktion gewünschter Substanzen steuern lässt. Die daraus gewonnenen Erkenntnisse erwiesen sich als besonders wertvoll für nachfolgende Experimente, insbesondere in Bezug auf die Produktion von Phenyllessigsäure, Zimt- und Cumarsäure.

4.4 Anreicherung von Bakterien des Phylums Bacteroidota

Mit dem wachsenden Verständnis für den Zusammenhang zwischen der Darmflora und der Gesundheit des Menschen haben die Untersuchungen an der humanen Darmmikrobiota in den letzten zwei Jahrzehnten stark zugenommen. Eine Vielzahl an Studien konnte zeigen, dass die Zusammensetzung und das Gleichgewicht der Darmmikrobiota eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Darmgesundheit, der Verdauung und sogar bei Erkrankungen wie Adipositas, Darmentzündungen und Stoffwechselstörungen spielt (Aziz *et al.*, 2013). Darmbakterien wirken sich allerdings nicht nur auf die menschliche Gesundheit aus, sondern besitzen auch Potenzial für die Entwicklung von industriellen Produktionsverfahren für Plattform-Chemikalien. Besonders bei Mikroorganismen aus dem menschlichen Dickdarm handelt es sich um Stoffwechsel-Spezialisten mit der Fähigkeit, nachwachsende pflanzliche Heteropolysaccharide zu verwerten (Xu *et al.*, 2003; Englyst & Liu, 2007; Flint *et al.*, 2012). Im Vordergrund stehen immer wieder die Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola*, da sie aufgrund der hohen Abundanz zu den wichtigsten Vertretern der Darmmikrobiota gehören (Salysers, 1984; King *et al.*, 2019). Im Rahmen des Forschungsprojekts „Produktion von Succinat und bioaktiven Phenolsäuren durch Bakterien des Phylums Bacteroidota“ fokussierte sich dieser Teil der vorliegenden Arbeit auf die Isolierung von Darm-Kommensalen der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* und deren Potenzialanalyse für die Produktion von Phenolsäuren. Die Arbeitsziele beinhalteten die Identifizierung von Wildtyp-Stämmen aus natürlichen Habitaten, welche bereits vor der Optimierung von Wachstumsparametern sowie der Anwendung von genetischen Modifikationen nachweisbare Mengen an Phenolsäuren produzieren können.

Am besten eigneten sich humane Stuhl-Proben für dieses Vorhaben, da die beiden Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* als ubiquitäre Kommensale im menschlichen Dickdarm einen Anteil von bis zu 40% erreichen können (Sghir *et al.*, 2000; King *et al.*, 2019). Neben der Anreicherung von *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies bestand ebenfalls Interesse an weiteren Mikroorganismen, welche besonders mit Hinblick auf die Bildung von bioaktiven Phenolsäuren eine gute Grundlage bieten sollten. Aus diesem Grund wurde ebenfalls Material aus Biogas-Anlagen für die Anreicherung von geeigneten Mikroorganismen verwendet. Bei der Biogasproduktion wird organisches Material, unter anderem auch Pflanzenreste, in einem anaeroben Fermentationsprozess abgebaut, wobei eine komplexe mikrobielle Gemeinschaft beteiligt ist (Angelidaki *et al.*, 2011). Die Zusammensetzung dieser Gemeinschaft ist primär durch die Phyla Firmicutes und Proteobacteria definiert. Das Phylum Bacteroidota hingegen macht nur einen geringen Anteil von 0,8% aus (Heyer *et al.*, 2019). Da in Biogas-Kraftwerken primär Pflanzenmaterial als Substrat eingesetzt wird, bestand trotz der verhältnismäßig geringen Abundanz an Bacteroidota-Spezies großes Potenzial aus Biogas-Schlamm einen potenten Produzenten für bioaktive Phenolsäuren zu identifizieren (Weiland, 2010).

4. Diskussion

Die wohl größte Herausforderung bei der Anreicherung von anaeroben Mikroorganismen aus humanen Faeces ist das ubiquitäre Vorkommen von Enterobakterien, welche sich unter Laborbedingungen extrem leicht anreichern lassen. Seit Beginn der Forschung mit Mikroorganismen führten Versuche, neue Bakterienarten aus natürlichen Habitaten zu isolieren, immer wieder zu der Anreicherung von *E. coli* (Post *et al.*, 1967). Im Laufe der Jahrzehnte wurden Rezepturen für Medien modifiziert und angepasst, um bestimmte Bakterienarten durch Selektionsmechanismen zu bevorzugen. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Selektions-Komponenten identifiziert, welche der Problematik mit der Anreicherung von Enterobakterien entgegenwirken. Da es sich bei *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies um Gram-negative Organismen handelt, wurden im Rahmen der Anreicherungsversuche das Antibiotikum Vancomycin eingesetzt. Vancomycin ist ein Glykopeptid-Antibiotikum, welches gezielt Gram-positive Bakterien bei der Bildung der Zellwand behindert (Matzke *et al.*, 1986). Die Anwendung führte gemäß den Erwartungen zu einem grundsätzlichen Ausschluss von gram-positiven Arten, jedoch reichte der Selektionsdruck nicht aus um die Anreicherung von *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies zu begünstigen. Da es sich bei *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies um Kommensale des Dickdarms handelt, kann auch über das Substrat ein substanzieller Selektionsdruck ausgeübt werden. Beispielsweise führt der Verzehr von ballaststoffreicher, pflanzlicher Nahrung zu der Verfügbarkeit von pflanzlichen Heteropolysacchariden wie Xylan, Cellulose und Pektin im Dickdarm (Colnet *et al.*, 2021). Die Nische, die sich aus der Fähigkeit des Abbaus dieser Substrate ergibt, wird primär *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Vertretern besetzt. Anreicherungsversuche in dieser Arbeit zeigten jedoch, dass auch dieser Selektionsdruck offenbar nicht ausreichte, um andere, schneller wachsende Organismen auszuschließen. Erst die Anwendung von Fruktan-Polymeren, in diesem speziellen Fall Levan und Inulin, führten nicht nur zu einem Ausschluss von *E. coli*, sondern auch zu der Anreicherung mehrerer *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies, aber auch zu Vertretern der Gattungen *Blautia*, *Dorea* und *Coprococcus*. Fruktane sind als Selektionshürde für Enterobakterien sehr gut geeignet, da Organismen der Familie *Enterobacteriaceae* keine Fruktane verstoffwechseln können (Pohlentz *et al.*, 2022). Bei zusätzlicher Anwendung von Amikacin, einem Aminoglykosid-Antibiotikum welches gegen die Gattungen *Escherichia*, *Pseudomonas* und *Enterobacter* wirkt, wurden ausschließlich Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* angereichert (Ramirez & Tomalsky, 2017). Zwar konnte in dieser Arbeit ein zuverlässiges Anreicherungsprotokoll für Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* etabliert werden, jedoch führte dies nicht zur Identifizierung von Darm-Organismen mit natürlichen Kapazitäten zur Produktion von bioaktiven Phenolsäuren. Aus diesem Grund wurde der Fokus für diesbezügliche Aufklärungsarbeiten auf *P. vulgatus* als Modell-Organismus für *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies verschoben.

4.5 Der Zusammenhang zwischen bioaktiven Phenolsäuren und der Darmmikrobiota

Sowohl Pflanzen- als auch Bakterienzellen besitzen einen natürlichen Stoffwechselweg für die Produktion von verschiedenen aromatischen Verbindungen. Der Synthese-Prozess solcher Metabolite ist bekannt als der Shikimat-Weg (Haslam, 1993). In den meisten Bakterien endet der Shikimat-Weg in einer der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan. In Bezug auf Pflanzen stehen diese Aminosäuren nicht nur der Proteinsynthese zu Verfügung, sondern stellen wichtige Intermediate für die Produktion von sekundären aromatischen Metaboliten wie Flavonoiden, Stilbenoiden oder Anthocyanidinen dar (Vogt, 2010). In Pflanzen erfüllen diese Substanzen, unter dem Schirmbegriff der Polyphenole, eine Vielzahl von Funktionen. Darunter fällt der Schutz gegenüber biotischen und abiotischen Stressfaktoren wie z.B. UV-Schutz, oxidative Belastungen und Pathogen-Befall (Korkina *et al.*, 2011).

Im Zusammenhang mit Nahrungsmitteln hat das umfassende Molekülspektrum der Polyphenole aus pflanzlichen Nahrungsbestandteilen in jüngster Zeit erhebliche wissenschaftliche Aufmerksamkeit erlangt. Aufgrund ihrer komplexen molekularen Zusammensetzung und der daraus resultierenden Vielfalt an potenziellen Abbauprodukten, wird diesen Verbindungen ein breites Spektrum an positiven Effekten zugesprochen, die von der Prävention von Herz-Kreislauf-Erkrankungen über entzündungshemmende Eigenschaften bis zur Bekämpfung verschiedener Krebsarten reichen (Bravo, 1998; Scalbert *et al.*, 2005; Del Rio *et al.*, 2013; Tressera-Rimbau *et al.*, 2017; Murillo & Fernandez, 2017; Lamuela *et al.*, 2016). Trotz dieser positiven Effekte werden Polyphenole zum Großteil aus dem Körper ausgeschieden. Dies impliziert, dass bereits geringe Konzentrationen eine immense Auswirkung auf den Körper haben (Hollman *et al.*, 1995; Graf *et al.*, 2005). Aufgrund ihres komplexen Aufbaus werden die entsprechenden Verbindungen im Dünndarm kaum resorbiert und gelangen daher nahezu unverändert in den Dickdarm, wo sie von der lokalen Mikrobiota in eine Vielzahl von bioaktiven Phenol-Derivaten abgebaut werden können (Scalbert *et al.*, 2002; Parkar *et al.*, 2013; Jiménez *et al.*, 2014). Aufgrund der niedrigen Resorptionsrate wird angenommen, dass die gesundheitsfördernden Effekte dieser Substanzen hauptsächlich auf Veränderungen in der Mikrobiota im Dickdarm und der damit assoziierten Produktion/Freisetzung vorteilhafter bioaktiver Substanzen beruhen. Es gibt Hinweise darauf, dass Polyphenole im Darm das Wachstum einiger pathogener Organismen hemmen und gleichzeitig das Wachstum vorteilhafter Bakterien fördern, was zu einem gesunden Gleichgewicht in der Darmmikrobiota beiträgt (Etxeberria *et al.*, 2013; Dueñas *et al.*, 2015). Aktuelle Bemühungen in der Forschung versuchen über ausgeschiedene Phenol-haltige Moleküle im menschlichen Stuhl Aussagen über deren Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit zu treffen: Beispielsweise verändert sich das Profil an phenolischen Verbindungen von polyphenol-reichen Lebensmitteln wie

Rotwein, Granatapfelsaft oder Himbeeren signifikant, nachdem diese den menschlichen Verdauungstrakt durchlaufen haben (Gill *et al.*, 2010; Muñoz-González *et al.*, 2013; Mosele *et al.*, 2015). Obwohl die genauen Mechanismen dieser positiven Effekte von Polyphenolen noch aufgeklärt werden müssen, diskutiert die ISAPP (International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics) bereits seit 2017 über die Deklaration von pflanzlichen Polyphenolen als offizielles Präbiotikum (Rodríguez-Daza *et al.*, 2017). Allerdings besteht noch ein erheblicher Forschungsbedarf, um die Zusammenhänge zwischen pflanzlichen Polyphenolen, ihrem Einfluss auf die Mikrobiota und den Auswirkungen der bioaktiven Abbauprodukte besser zu verstehen.

4.5.1 *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies als Quelle von Phenyllessigsäure im Darm

Analysen von humanen Faeces ermöglichen einen Einblick in die Phenol-haltigen Metabolite, welche vermutlich aus dem Abbau von Polyphenolen stammen (Jenner *et al.*, 2005). Zu den nachgewiesenen Substanzen zählen häufig Derivate der Benzoesäure, Zimtsäure, Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure. In mehreren unabhängigen Forschungsarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass unter allen im Stuhl nachweisbaren phenolischen Verbindungen Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure mit Abstand den größten Anteil ausmachen (Abb. 56) (Sánchez-Patán *et al.*, 2011; Russell *et al.*, 2011b; Muñoz-González *et al.*, 2013; Gutiérrez-Díaz *et al.*, 2018). Anhand des Vergleichs dieser Quantifizierungen lassen sich drei Besonderheiten feststellen: 1. Die fehlende Standardisierung der Quantifizierungen stellt ein großes Problem dar, weshalb nur ein qualitativer Vergleich mit anderen Literaturstellen möglich ist. Die Dimensionen der ermittelten Konzentrationen einzelner Verbindungen schwanken zwischen Abb. 56 A und B, sowie C und D bereits deutlich. 2. Offenbar spielt das verwendete Material für die Quantifizierung eine wichtige Rolle. Während bei Abb. 56 A und B Stuhlmaterial für die Untersuchungen herangezogen wurde, diente für die Quantifizierung von Abb. 56 C und D nur der flüssige Anteil des Darminhalts. Als Resultat lässt sich beobachten, dass sich die ermittelten Konzentrationen von Phenyllessigsäure und Phenylpropionsäure in Abhängigkeit des eingesetzten Materials erheblich voneinander unterscheiden. Die Quantifizierung von phenolischen Verbindungen aus Stuhlproben führte zu dem Eindruck, dass Phenyllessigsäure die häufigste phenolische Komponente im Dickdarm ist. Die Analysen von Fäkalflüssigkeiten hingegen wiesen Phenylpropionsäure als häufigste Verbindung nach. 3. Eine grundsätzliche Aussage über die Verteilung von phenolischen Verbindungen im Darm lässt sich treffen. In Abb. 56 werden 4 unabhängige Forschungsarbeiten dargestellt, welche sowohl in Bezug auf die Probenaufbereitung als auch im Umgang mit Probanden und deren Ernährungsstil keine Gemeinsamkeiten teilen. Dennoch zeigt das Quantifizierungsprofil der phenolischen Komponenten vergleichbare Charakteristika in Bezug auf Phenyllessigsäure- und Phenylpropionsäure-Konzentrationen auf. Für weitere Interpretationen wäre das Profil der Darmmikrobiota der Probanden interessant, um eine Aussage zwischen den Konzentrationen der phenolischen Verbindungen und der vorherrschenden Gattungen der

4. Diskussion

Darmkommensale zu treffen. Weiterhin zeigt dieser Vergleich, dass für künftige Quantifizierungsanalysen der flüssige Anteil von Stuhlproben eher ungeeignet erscheint, um eine zuverlässige Aussage zu treffen, da sich Phenylelessigsäure dort offenbar nicht in voller Konzentration nachweisen lässt.

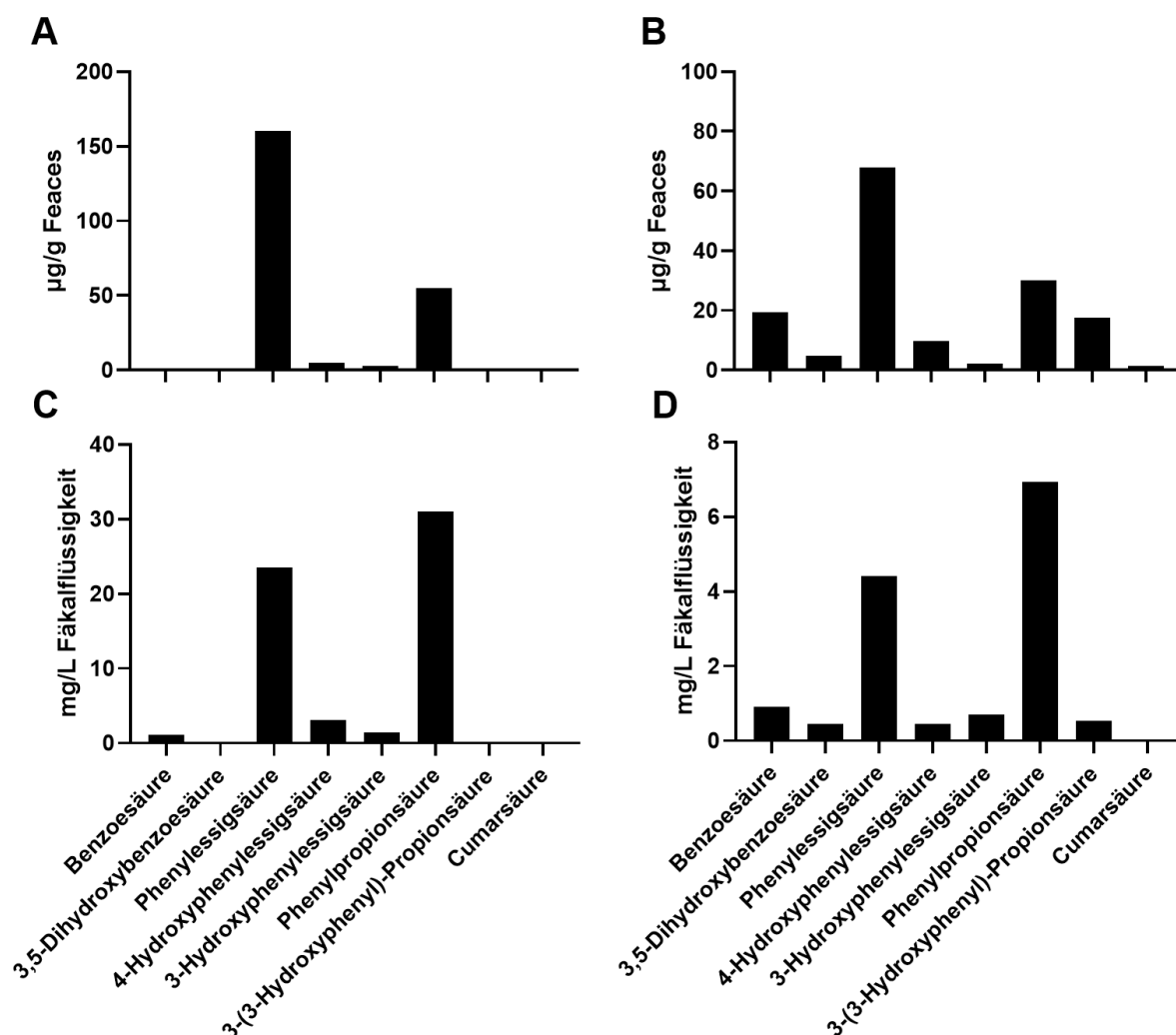


Abbildung 56: Nachweis von phenolischen Verbindungen in humanen Stuhlproben. Die Daten der Graphen basieren auf Publikationen, welche sich mit dem Gehalt phenolischer Verbindungen in humanen Faeces auseinandersetzen. Die Quantifizierung der phenolischen Verbindungen erfolgte entweder in µg nachgewiesener Verbindung/g Faeces oder in mg nachgewiesener Verbindung/L Fäkalflüssigkeit. [A] Muñoz-González *et al.*, 2013 [B] Sánchez-Patán *et al.*, 2011 [C] Gutiérrez-Díaz *et al.*, 2018 [D] Russell *et al.*, 2011b

In der Literatur wird deutlich, dass von allen phenolischen Verbindungen im Darm, Phenylelessigsäure aufgrund der verhältnismäßig hohen Konzentrationen eine besondere Rolle spielt. Bisher wurde davon ausgegangen, dass Phenylelessigsäure ebenfalls ein Produkt der Fermentation von Polyphenolen sei. In vitro Experimente, welche sich mit dem Abbau von Quercetin (einem ubiquitär verfügbaren Flavonoid aus Obst, Gemüse und Nüssen) beschäftigten, konnten belegen, dass Hydroxyphenylelessigsäure-Derivate aus Quercetin durch intestinale Bakterien freigesetzt werden (Aura *et al.*, 2002; Jaganath *et al.*, 2009). Jedoch deutet die Sachlage eher darauf hin, dass Phenylelessigsäure primär als

4. Diskussion

Fermentationsprodukt von Proteinen durch *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies entsteht (Russel *et al.*, 2013). Beispielsweise zeigte eine Studie von Muñoz-González *et al.* (2013), dass der Konsum von Rotwein, trotz einer hohen Konzentration an phenolischen Verbindungen, keinen Einfluss auf die Konzentration von Phenyllessigsäure im Darm nimmt. Ergänzend dazu konnte durch eine weitere Studie von Mansoorian *et al.* (2019), welche sich ebenfalls mit der Fermentation von Polyphenolen in Nahrungsmitteln durch die Darmmikrobiota beschäftigte, nachgewiesen werden, dass 77% der detektierten Phenyllessigsäure nicht aus der Metabolisierung von Polyphenolen stammte. Weiterhin kann Phenyllessigsäure ebenfalls in Individuen nachgewiesen werden, deren Ernährungsweise durch gesättigte Fettsäuren und tierische Proteinquellen und nicht durch Polyphenol-haltige Pflanzenbestandteile geprägt ist (Russel *et al.*, 2011a; Russel *et al.*, 2011b). Demnach gibt es deutliche Implikationen, dass die Freisetzung von Phenyllessigsäure im Darm nicht mit dem Abbau von Polyphenolen zusammenhängen muss.

Die exakte Quelle der Bildung/Freisetzung von Phenyllessigsäure im Darm ist bisher nicht aufgeklärt. Formal wird angenommen, dass die Fermentation von Proteinen durch *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies eine entscheidende Rolle für die Produktion spielt. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte diesbezüglich eine wichtige Beobachtung: Wenn Phenylalanin in einer ausreichenden Konzentration (> 8mM) verfügbar war, bildete *P. vulgatus* Phenyllessigsäure (Kapitel 3.4.2.7). Durch die phylogenetische Nähe zwischen den Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* ist die Annahme wahrscheinlich, dass diese Fähigkeit zur Phenyllessigsäure-Bildung nicht nur auf *P. vulgatus* beschränkt ist. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, welche Enzyme für die Bildung von Phenyllessigsäure durch *P. vulgatus* verantwortlich sind. Die Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) ist das Schlüsselenzym, welche entgegen ihrer Annotation die Umsetzung von Phenylacetyl-CoA zu Phenyllessigsäure katalysiert (Kap. 3.4.2.6). Diese Beobachtungen unterstützen den Zusammenhang zwischen der mikrobiellen Proteinfermentation und der Freisetzung von Phenyllessigsäure durch Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola*. In Abhängigkeit der Lebensweise und Ernährungsgewohnheiten eines Individuums kann alleine die Gattung *Phocaeicola* einen Anteil von bis zu 30% im Dickdarm erreichen (King *et al.*, 2019). Selbst wenn die Produktion von Phenyllessigsäure nur in sehr geringen Mengen durch *Phocaeicola*-Arten erfolgt, so könnte die nachweisbare Konzentration an Phenyllessigsäure auf die zahlenmäßige Überlegenheit dieser Organismen zurückgeführt werden. In dieser Arbeit konnte in diesem Kontext gezeigt werden, dass Vertreter der Gattung *Phocaeicola* Proteine sehr effizient als Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen können (Kap. 3.3.2). In PY-Kulturmedium, welches ausschließlich komplexe Protein-Bestandteile enthielt, zeigten *P. vulgatus* und *B. cellulosilyticus* in Flüssigkultur sowie auf Nährböden Wachstum. Aufgrund dieser Proteinfermentation fördern Personen, welche eine fettreiche Ernährungsweise pflegen und viele tierische Proteine zu sich nehmen, den Anteil an *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Vertretern im Dickdarm

(David *et al.*, 2014). Bei einem Ernährungsstil, welcher durch den Verzehr von tierischen Produkten geprägt ist, stehen *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies dementsprechend deutlich mehr Proteine als Substrat zur Verfügung, wodurch die Fermentation von aromatischen Aminosäuren zu Phenyllessigsäure begünstigt wird.

Aufgrund der fehlenden Standardisierung der in Abbildung 56 beschriebenen Forschungsergebnisse muss festgehalten werden, dass sich die Quelle der individuellen phenolischen Verbindungen im humanen Intestinaltrakt nur sehr schwer nachvollziehen lässt. Obwohl Hinweise vorliegen, dass primär *Bacteroides*- und *Phocaeicola*-Spezies für die Freisetzung von Phenyllessigsäure verantwortlich sind, sind weitere Forschungsarbeiten nötig, um die genauen Zusammenhänge der intestinalen Produktion und Verwertung von Phenolsäuren zu entschlüsseln. Für *P. vulgatus* DSM 1447 konnte in dieser Arbeit beispielsweise die Produktion von Phenyllessigsäure *in vitro* nachgewiesen werden. Dieser Nachweis konnte jedoch für alle weiteren *Bacteroides*-Wildtyp-Isolate, welche im Rahmen dieser Arbeit angereichert wurden, nicht erbracht werden. Weiterhin könnten Phenyllessigsäure und dessen Konjugate auch durch Cross-Feeding Interaktionen im Darm entstehen, sodass nicht eine einzelne Gattung oder Art, sondern ein ganzes Netzwerk an verschiedenen Organismen an der Bildung beteiligt ist.

4.5.2 Kanalisierung des C-Stoffwechsels in Richtung aromatischer Aminosäuren

In dieser Arbeit wurde der Fokus auf die Aufklärung des Stoffwechsels von *P. vulgatus* bezüglich der Produktion von Phenyllessigsäure gelegt. Um *P. vulgatus* als biotechnologisch nutzbaren Produzenten für Phenyllessigsäure einzusetzen, müsste der Stoffwechsel hinsichtlich einer Überproduktion der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin kanalisiert werden.

Grundsätzlich erfolgt die Synthese von aromatischen Aminosäuren in den meisten Organismen über den Shikimat-Weg, welcher durch das Schlüsselenzym Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase (DAHPS) eingeleitet wird. Dieses Enzym kondensiert PEP aus der Glykolyse und E4P aus dem Pentosephosphatweg zu Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat (DAHP). Es folgt ein Syntheseweg, welcher schließlich in der Bildung von Chorismat als gemeinsamer Vorläufer für die Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan mündet (Abb. 57) (Maeda & Dudareva, 2012). Da der Shikimat-Weg die zentralen Stoffwechselintermediate PEP und E4P benötigt, wird das Enzym DAHPS strikt reguliert. Dementsprechend stellt die Kanalisierung des Kohlenstoff-Metabolismus in Richtung der aromatischen Aminosäuren eine Herausforderung dar (Jossek *et al.*, 2001).

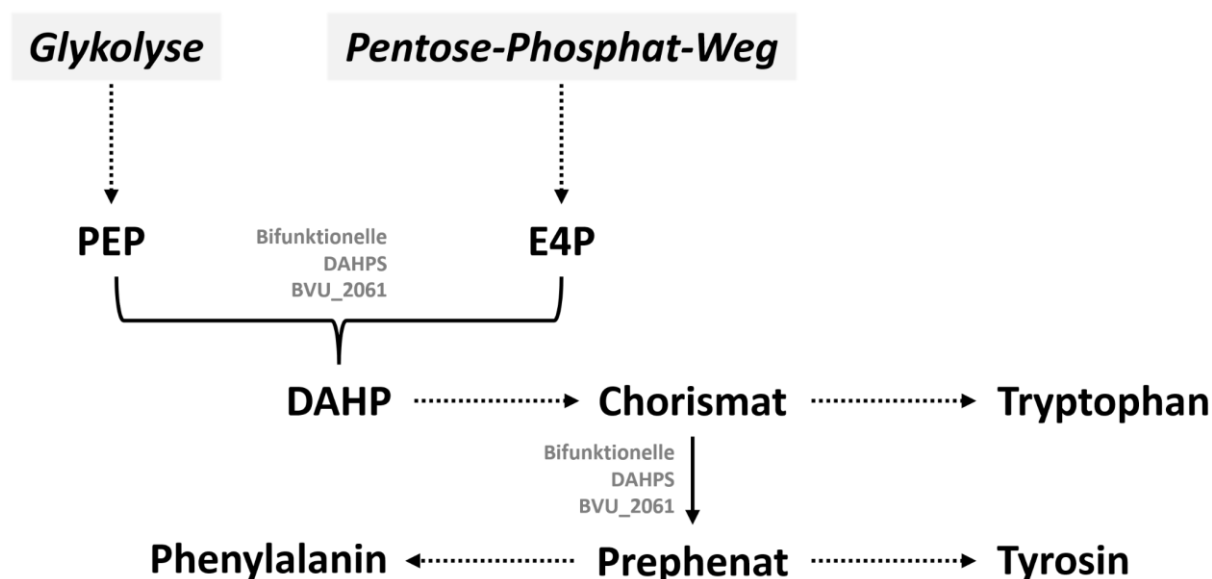


Abbildung 57: Schematische Darstellung der Synthese von aromatischen Aminosäuren in *P. vulgaris*. Gestrichelte Linien entsprechen mehreren Enzym-Reaktionen. DAHPS: Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat-Synthase; DAHP: Desoxy-D-Arabino-Heptulosonat-7-Phosphat; PEP: Phosphoenolpyruvat; E4P: Erythrose-4-Phosphat.

Diese Regulierung basiert in Bakterien auf der Feedback-Inhibierung der DAHPS. Beispielsweise erfolgt die Hemmung in *E. coli* direkt über die intrazelluläre Konzentration an Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Daher existieren drei Varianten der DAHPS, welche jeweils durch eine aromatische Aminosäure gehemmt werden (AroG durch Phenylalanin, AroF durch Tyrosin, und AroH durch Tryptophan) (Vargas & Gosset, 2015). Bei Mangel einer einzelnen aromatischen Aminosäure kann daher der gesamte Synthese-Prozess eingeleitet werden. Manche Organismen, darunter *B. subtilis* und auch *P. vulgaris*, besitzen eine bifunktionelle DAHPS, welche neben der Bildung von DHAP ebenfalls die Bildung von Prephenat aus Chorismat katalysiert. Die Regulation dieser Enzyme erfolgt dann nicht über die Verfügbarkeit der respektiven aromatischen Aminosäuren, sondern direkt über die intrazelluläre Chorismat und Prephenat Konzentration (Wu *et al.*, 2005). Für die Entwicklung einer industriellen Produktionsplattform, welche auf der Synthese von aromatischen Aminosäuren durch den Organismus selbst angewiesen ist, wird die Produkt-Ausbeute durch die Feedback-Inhibierung der DAHPS reduziert. Um das Problem des Inhibierungsmechanismus zu umgehen, wurde bereits an der Entwicklung einer unregulierten DAHPS geforscht (Lütke-Eversloh & Stephanopoulos, 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Herausforderungen bezüglich der *in vivo*-Synthese von aromatischen Aminosäuren über eine externe Supplementation von Phenylalanin umgangen.

4.5.3 Produktion von Phenylelessigsäure durch *P. vulgaris*

Viele aromatische Chemikalien, darunter auch Phenylelessigsäure sowie deren Derivate Phenylethylelessigsäure und Ethylphenylelessigsäure, werden aufgrund der angenehmen Geruchsprofile als Nahrungsmittelzusätze und als Zusatz für Kosmetik-Artikel eingesetzt (Etschmann *et al.*, 2002;

4. Diskussion

Bauer *et al.*, 2008; Hua & Xu, 2011; Kim & Park, 2017). Konventionelle Produktionsprozesse von Phenyllessigsäure hängen von Erdöl-basierten Rohstoffen ab, benötigen toxische Chemikalien und produzieren darüber hinaus große Mengen an Nebenprodukten und Chemieabfällen (Giroux *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2008). Daher ist die Zulassung von chemisch synthetisierter Phenyllessigsäure besonders in Nahrungsmitteln, aber auch in Kosmetik-Artikeln für Europa und den USA extrem problematisch, weshalb die Nachfrage an natürlichen Produktionsprozessen steigt (Hua & Xu, 2011). Versuche einer natürlichen Phenyllessigsäure-Produktion aus Pflanzen-Material erlauben bisher lediglich sehr geringe Ausbeuten (Martínez-Avila *et al.*, 2018). Dementsprechend liegen die Preise für Phenyllessigsäure, Phenylethyllessigsäure sowie Ethylphenyllessigsäure aus natürlichen Rohstoffen zwischen 1.760-2.200 USD/kg (Sekar *et al.*, 2022).

In jüngster Vergangenheit haben sich die Bemühungen einer natürlichen Phenyllessigsäure-Produktion auf die Anwendung von biotechnologisch eingesetzten Modellorganismen wie *E. coli* oder *S. cerevisiae* fokussiert. Hierbei wurde Phenylalanin als Substrat eingesetzt, um über die natürlichen Kapazitäten der Aminosäuresynthese Phenyllessigsäure zu produzieren. Jedoch liegen die erreichten Titer auch nach genetischen Optimierungen im Bereich von 50 mg/L (Zhang *et al.*, 2017). In einer Studie von Wu *et al.* (2017) wurde ein Produktionsstamm entwickelt, welcher durch die heterologe Expression mehrerer Enzyme Styrol mit einer hohen Ausbeute zu Phenyllessigsäure (13 g/L) umsetzen konnte. Aufgrund des Ausgangsstoffs Styrol kann auch dieser Prozess nicht als natürliche Produktion definiert werden. Über die heterologe Expression von fünf Enzymen konnten Sekar *et al.* (2022) einen *E. coli* Produktionsstamm für die Biosynthese von Phenyllessigsäure entwickeln, welcher ausgehend von Phenylalanin die höchste bisher beschriebene Ausbeute von 11,6 g/L erreichte. Trotz aller Investitionen in die Entwicklung von *E. coli* als Produktionsstamm ist dieser im Gegensatz zu Organismen der Familie *Bacteroidaceae* nicht in der Lage, erneuerbare Substrate wie pflanzliche Heteropolysaccharide zu verwerten (Chassard *et al.* 2007; Flint *et al.* 2008; Makki *et al.* 2018). Der Transfer dieser Produktionsbedingungen auf einen Vertreter der Familie *Bacteroidaceae*, wie z.B. *P. vulgatus*, würde die Produktion von Phenyllessigsäure aus natürlichen Rohstoffen ermöglichen. Bereits im Jahre 1982 untersuchte eine Studie von Bourgeau & Mayrand (1983) die Produktion von Phenyllessigsäure durch Mikroorganismen in Rumen-Flüssigkeit. Dabei konnte festgestellt werden, dass fünf Isolate der Gattung *Bacteroides* Potenzial für die Bildung von Phenyllessigsäure (50-200 mg/L) besitzen (s. Tab. 33). Aufgrund der Einteilung dieser Organismen nach den technischen Regeln für Biologische Arbeitsstoffe (TRBA, Stand 2020) wurden diese Prokaryoten in Risikogruppe 2 eingestuft. Demnach eignet sich keines dieser Bakterien für eine biotechnologische Anwendung. Da *P. vulgatus* als Risikogruppe 1-Organismus gilt und phylogenetisch eine große Nähe zu diesen Organismen aufweist, wurde dieser als Modellorganismus für weitere Analysen in dieser Arbeit ausgewählt.

4. Diskussion

Tabelle 33: Natürliche Produktion von Phenyllessigsäure in Stämmen der Gattung *Bacteroides*. B. : *Bacteroides*; P. : *Prevotella*. Tabelle modifiziert nach Mayrand & Bourgeau, 1982.

Organismus	Phenyllessigsäure (mg/L)	Risikogruppe
<i>B. fragilis</i>	203	2
<i>B. disastonis</i>	170	2
<i>B. thetaiotaomicron</i>	240	2
<i>B. ovatus</i>	257	2
<i>P. ruminicola</i>	69	2

In dieser Arbeit konnte, anders als bisherige Ansätze in der Literatur, ein neuer Stoffwechselzweig für die Produktion von Phenyllessigsäure in *P. vulgatus* identifiziert und beschrieben werden. Die allgemeine Annahme, dass die Phenylacetyl-CoA Ligase (BVU_2276) ausschließlich Phenyllessigsäure zu Phenylacetyl-CoA umsetzt, wurde widerlegt (Kap. 3.4.2.6). Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass entgegen der annotierten Funktion der Phenylacetyl-CoA Ligase, die Reaktion von Phenylacetyl-CoA zu Phenyllessigsäure die primäre Reaktion der Phenylacetyl-CoA Ligase darstellt (Kap. 3.4.2.6). Somit wurde die Möglichkeit zur Synthese von Phenyllessigsäure ausgehend von Phenylalanin in *P. vulgatus* ohne die Notwendigkeit von genetischen Modifikationen bestätigt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden in dieser Arbeit potenzielle Ansätze für die Phenyllessigsäure-Synthese untersucht, um die Ausbeute an Phenyllessigsäure in *P. vulgatus* zu steigern. Ein möglicher limitierender Faktor schien die Verfügbarkeit von Phenylpyruvat zu sein, welches in *P. vulgatus* ausgehend von Phenylalanin durch die Aminotransferase BVU_2275 gebildet wird. Durch die homologe Überproduktion der Aminotransferase BVU_2275 in *P. vulgatus* konnte die Ausbeute an Phenyllessigsäure um das sechsfache gesteigert werden (Kap. 3.4.2.7). Ein weiterer Optimierungsansatz wäre die Möglichkeit, die Aktivität aller beteiligten Enzyme für die Phenyllessigsäure-Bildung durch eine Überexpression der entsprechenden Gene zu erhöhen. Von besonderer Wichtigkeit ist auch die Kanalisierung des Kohlenstoff-Flusses in Richtung des Shikimat-Wegs, um die Bildung von Phenylalanin als Substrat für Phenyllessigsäure stärker zu forcieren.

4.5.3.1 Alternative Wege für die Produktion von Phenyllessigsäure in *P. vulgatus*

Trotz der neuen Möglichkeit für die Synthese von Phenyllessigsäure in *P. vulgatus*, welche in dieser Arbeit nachgewiesen wurde, liegen die bisher erreichten Produkttiter lediglich im μ molaren Bereich (Kap. 3.4.2.7). Für die industrielle Nutzung von *P. vulgatus* als Produktionsstamm sind künftig umfangreiche Maßnahmen zur Optimierung notwendig, um die Produktausbeute auf eine relevante Dimension anzuheben. Durch den Vergleich mit anderen Bakterien-basierten Produktionssystemen sollen in dem folgenden Kapitel Ideen für die weitere Entwicklung von *P. vulgatus* als Phenyllessigsäure-Produktionsplattform diskutiert werden.

4. Diskussion

Laut Literatur liegt die höchste bisher beschriebene Ausbeute für eine mikrobielle Phenylelessigsäure-Produktion aktuell bei 11,6 g/L mithilfe von ruhenden *E. coli* Zellen. Die Biosynthese wurde in Puffer mit 2% Glucose und 100 mM Phenylalanin als Substrat durchgeführt (Sekar *et al.*, 2022). Die Generierung des Produktionsstamms erfolgte durch die Konstruktion eines synthetischen Stoffwechselwegs in *E. coli*, welcher die katalytischen Eigenschaften von fünf Enzymen aus verschiedenen Organismen vereint (Abb. 58).

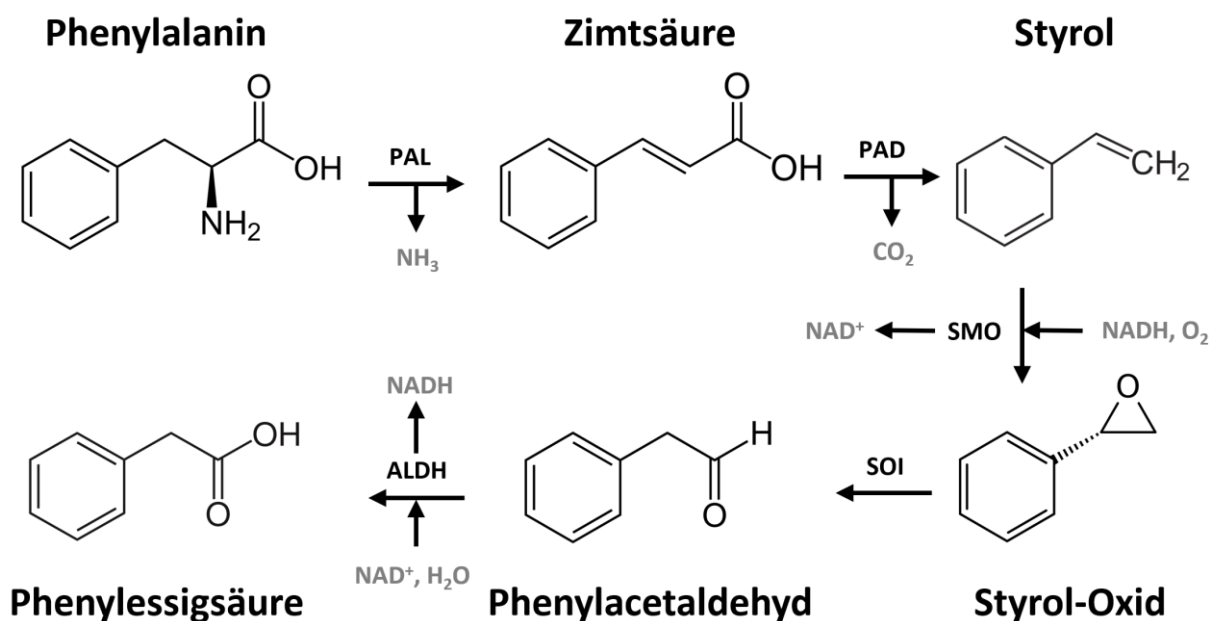


Abb. 58: Produktion von Phenylelessigsäure in *E. coli* mittels heterologer Überproduktion verschiedener Enzyme. PAL: Phenylalanin Ammoniak Lyase; PAD: Phenylacrylsäure Decarboxylase; SMO: Styrol Monooxygenase; SOI: Styrol-Oxid Isomerase; ALDH: Aldehyd Dehydrogenase (modifiziert nach Sekar *et al.*, 2022).

Über eine Phenylalanin Ammoniak Lyase (PAL aus *Arabidopsis thaliana*) wird durch eine Desaminierung Phenylalanin zu Zimtsäure umgesetzt. Die weitere Decarboxylierung durch eine Phenylacrylsäure Decarboxylase (PAD aus *Aspergillus niger*) führt zur Bildung von Styrol. Anschließend entsteht mittels einer Styrol Monooxygenase (SMO aus *Pseudomonas sp.* VLB120) Styrol-Oxid, welches durch eine Styrol-Oxid Isomerase (SOI aus *Pseudomonas sp.* VLB120) zu Phenylacetaldehyd isomerisiert werden kann. Der letzte Schritt erfordert die Oxidierung der Aldehydgruppe zu einer Carboxylgruppe, was durch eine Aldehyd Dehydrogenase erfolgt (ALDH aus *E. coli*). In *P. vulgaris* könnte ebenfalls der Versuch unternommen werden, durch heterologe Überproduktion von Enzymen einen Stoffwechselweg für die Bildung von Phenylelessigsäure zu rekonstruieren. Im Rahmen der Gen-Deletion mithilfe von 5-FU als Gegenselektionsmarker konnte bereits gezeigt werden, dass die gleichzeitige Expression von zwei Genen über den Shuttle-Vektor pG106 möglich ist (Kap. 3.1.8). Im Falle des in Abb. 58 vorgestellten Systems ist zu bedenken, dass die Synthese von Styrol-Oxid sauerstoffabhängig ist. Als obligat anaerober Organismus eignet sich *P. vulgaris* daher nicht für dieses Konzept.

4. Diskussion

Theoretisch besteht die Möglichkeit durch die heterologe Überproduktion einer Phenylpyruvat-Decarboxylase einen weiteren Stoffwechselzweig für die Produktion von Phenylelessigsäure in *P. vulgaris* zu konstruieren. In dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Überproduktion von BVU_2275 (Aspartat Aminotransferase) zu einer Erhöhung der Phenylelessigsäure-Produktion führt und damit im weiteren Sinne auch zu einer höheren Phenylpyruvat Konzentration (Kap. 3.4.2.7). Durch eine heterolog produzierte Phenylpyruvate-Decarboxylase könnte demnach Phenylpyruvat zu Phenylacetaldehyd decarboxyliert werden, welches wiederum durch die Aldehyd-Dehydrogenase BVU_1789 zu Phenylelessigsäure oxidiert werden kann (Abb. 59).

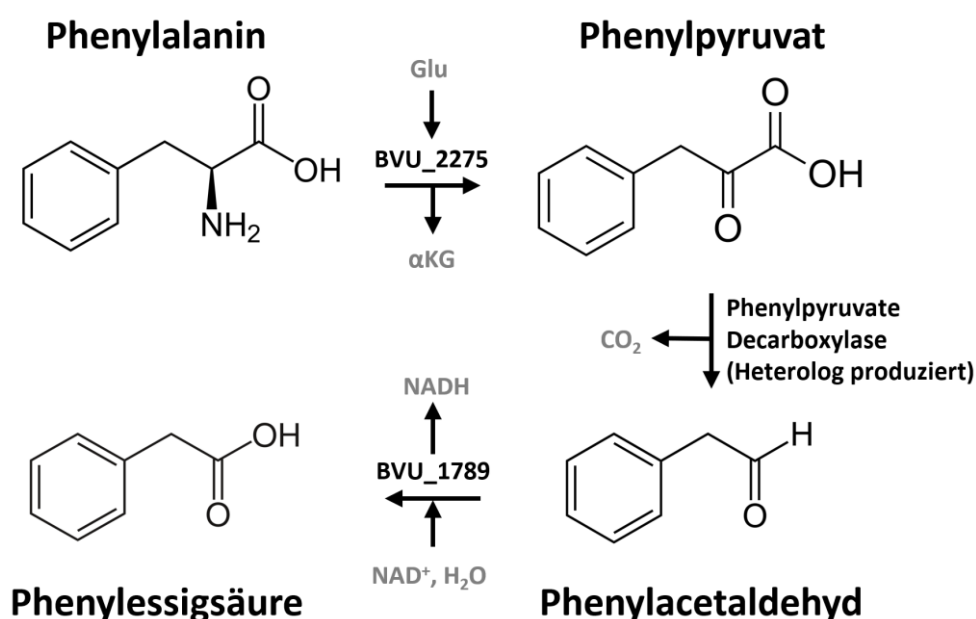


Abb. 59: Theoretische Alternative für die Bildung von Phenylelessigsäure durch die heterologe Expression einer Phenylpyruvat-Decarboxylase in *P. vulgaris*. BVU_2275: Phenylalanin-Aminotransferase; BVU_1789: Aldehyd Dehydrogenase

Um hohe Ausbeuten an Phenylelessigsäure durch eine mikrobielle Produktion zu erzielen muss berücksichtigt werden, dass Phenylelessigsäure auf viele Mikroorganismen eine toxische Wirkung hat (Cabrol *et al.*, 2015). Eine Studie von Kim *et al.* (2004) konnten zeigte, dass Phenylelessigsäure-Konzentrationen von bereits 50 µg/ml ausreichen, um das Wachstum von Organismen der Gattungen *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* und *Escherichia* zu hemmen. Aufgrund seiner nicht polaren Eigenschaften durch die Phenylgruppe ist die Löslichkeit von Phenylelessigsäure in organischen Lösungsmitteln deutlich höher (Gracin & Rasmuson, 2002). Um die gebildete Phenylelessigsäure vom Kulturmedium zu trennen könnte, durch die Verwendung eines wässrigen 2-Phasen-Systems, das toxische Endprodukt dem Medium entzogen werden. Mit *P. vulgaris* ist ein solches System bisher noch nicht angewandt worden und stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um die Phenylelessigsäure-Ausbeute zu erhöhen. Für eine nachhaltige Extraktion von Phenylelessigsäure muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass die potenziellen organischen Lösungsmittel nicht aus

Erdöl-basierten Chemikalien bestehen. Als geeignetes, nachhaltiges Lösungsmittel wurde bereits Ölsäureethylester verwendet, um einer Produktionskultur Phenyllessigsäure zu entziehen (Sekar *et al.*, 2022). Dabei handelt es sich um einen Ester aus Ölsäure, welche in großen Mengen aus Palm- und Olivenöl gewonnen werden kann (Fenaroli & Burdock, 1975).

In dieser Arbeit konnte, durch die Aufklärung des Phenolsäure-Stoffwechsels in *P. vulgaris*, der Grundstein für die Generierung eines potenziellen Phenyllessigsäure-Produktionsstamms gelegt werden (s. Kap. 3.4.2). Gegenüber etablierten Produktionsstämmen wie beispielsweise *E. coli* oder *V. natriegens* besitzen Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* den Vorteil, dass diese zur Verwertung pflanzlicher Heteropolysaccharide befähigt sind (Rogowski *et al.*, 2015; Despres *et al.*, 2016). Daher beherbergen diese beiden Gattungen vielversprechende Möglichkeiten für die Entwicklung nachhaltiger Produktionsprozesse von Chemikalien aus nachwachsenden Rohstoffen. Die in dieser Arbeit erreichten Produkttiter von Phenyllessigsäure beschränken sich jedoch, trotz erster genetischer Modifikationen, auf wenige Nanogramm pro Liter Kultur (s. Kap. 3.4.2.7). Zukünftige Experimente sollten sich demnach auf weitere Ansätze der genetischen Modifizierung sowie der Optimierung von Prozess-Parametern fokussieren, um die Relevanz von *P. vulgaris* als Phenyllessigsäure-Produzenten zu erhöhen.

4.5.4 Biotechnologische Produktion von Zimtsäure und Cumarsäure

Im pflanzlichen Stoffwechsel bietet der Phenylpropanoid-Synthese-Weg den natürlichen Metabolismus für die Synthese einer diversen Gruppe von sekundären Metaboliten, welche aufgrund ihrer strukturellen Vielfalt ein großes Anwendungspotenzial in der Pharmakologie und in den Ernährungswissenschaften bieten (Chemler & Koffas, 2008). Die prominentesten Beispiele für kommerziell wertvolle Phenylpropanoide sind Zimtsäure und Cumarsäure. Diese Verbindungen werden als Aromastoffe, Vorläufer für die Synthese von Bioplastik und als antimikrobielle Stoffe eingesetzt und sind darüber hinaus für ein breites Anwendungsspektrum in der Gesundheits-, Nahrungsmittel- und Kosmetik-Industrie interessant (Kaneko *et al.*, 2006; Sariaslani, 2007). Das Potenzial von Zimt- und Cumarsäure wird auch im Stoffwechsel von Pflanzen reflektiert, da diese als gemeinsamer Vorgänger für die Synthese eines großen Katalogs an aromatischen Verbindungen wie Flavone, Stilbene und Lignine dienen (Vogt, 2010). Zimt- und Cumarsäure können aus erneuerbaren Ressourcen wie Pflanzenresten extrahiert werden. Aufgrund ihrer Funktion als Vorläufer-Moleküle ergeben sich jedoch nur geringe Konzentrationen im Pflanzenmaterial und die entsprechenden Extraktionsmethoden sind komplex und gelten daher nicht als wirtschaftlich (Benkrief *et al.*, 1998). Aus diesem Grund spielt die biotechnologische Erschließung geeigneter Mikroorganismen für die Synthese von Zimt- und Cumarsäure aus einfachen Kohlenstoff-Quellen zunehmend eine wichtigere Rolle (Limem *et al.*, 2008; Vannelli *et al.*, 2007; Nijkamp *et al.*, 2007).

4. Diskussion

Einige Mikroorganismen besitzen bereits von Natur aus die Fähigkeiten für die Synthese von Zimt- und Cumarsäure. Genau wie im pflanzlichen Stoffwechsel erfolgt die Synthese über die Desaminierung von Phenylalanin (Zimtsäure) oder Tyrosin (Cumarsäure) durch eine Tyrosin/Phenylalanin Ammoniak-Lyase (T/PAL). Eine Sequenz-Analyse von Jendresen *et al.* (2015) konnte die Verteilung der T/PAL phylogenetisch auf Gattungs-Ebene zuordnen. Dabei stellte sich heraus, dass für die meisten Organismen der identifizierten Gattungen kaum genetische Tools für eine zielgerichtete Modifikation zur Verfügung stehen, wodurch eine biotechnologische Anwendung der entsprechenden Organismen erschwert wird. Unter den bereits charakterisierten bakteriellen TAL/PAL konnte keine den Gattungen *Bacteroides/Phocaeicola* zugeordnet werden (Jendresen *et al.*, 2015). Eine Besonderheit der Enzymklasse der T/PAL ist die prosthetische Gruppe 3,5-Dihydro-5-Methyldiene-4H-Imidazol-4-one (MIO). MIO bildet sich autokatalytisch aus einem Alanin-Serin-Glycin Motif im Protein und ist bereits in der primären Aminosäuresequenz des Enzyms erkennbar (MacDonald & D’Cunha, 2007). Der Cofaktor MIO diente in dieser Arbeit als Anhaltspunkt für die Identifizierung einer Ammoniak Lyase in *P. vulgatus*. Zum Zweck der Identifizierung wurden BLASTp-Alignments mit den Primärsequenzen bekannter Ammoniak Lyasen aus verschiedenen Organismen durchgeführt und mit dem Genom von *P. vulgatus* verglichen (Kap. 3.4.3.1). Auf diesem Wege wurde das Enzym BVU_1010, ursprünglich annotiert als Histidin Ammoniak Lyase, als potenzielle T/PAL in *P. vulgatus* identifiziert. Die Überproduktion und Aufreinigung von BVU_1010 ermöglichte die eindeutige Bestätigung, dass es sich bei dem Enzym um eine Tyrosin Ammoniak Lyase handelt (Kap. 3.4.3.3)

Biotechnologisch relevante Mikroorganismen wie *E. coli*, *V. natriegens* oder *S. cerevisiae* besitzen nicht die notwendigen Enzyme für die Synthese von Phenylpropanoiden, daher besteht ein grundsätzlicher Bedarf an umfassenden genetischen Modifikationen, um diese Organismen für die Produktion einzusetzen (Vargas & Gosset, 2015). Im Phylum Bacteroidota existieren vereinzelt Organismen, welche eine aromatische Ammoniak Lyase besitzen, darunter auch *P. vulgatus*. Jedoch wurde bisher keine dieser Ammoniak-Lyasen näher charakterisiert (Jendresen *et al.*, 2015). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Zugänglichkeit für die genetische Optimierung von *P. vulgatus* stark erweitert werden, wodurch das Interesse für biotechnologische Anwendungen durchaus steigen könnte. Aufgrund der Fähigkeit, erneuerbare Rohstoffe wie pflanzliche Heteropolysaccharide zu verstoffwechseln gilt *P. vulgatus* als vielversprechender Kandidat für die biotechnologische Produktion verschiedener Substanzen. Die in dieser Arbeit durchgeführte kinetische Charakterisierung der TAL aus *P. vulgatus* legte offen, dass sich das Enzym aufgrund seiner niedrigen Aktivität kaum als biotechnologischer Hebel für die Produktion von Zimt- oder Cumarsäure eignet (Kap. 3.4.3.4). Trotz der geringen Aktivität wurde in dieser Arbeit der Versuch unternommen, Cumarsäure durch die Überexpression des Gens *bvu_1010* in *P. vulgatus* zu produzieren. Zu diesem Zweck wurde das Gen *bvu_1010*, welches für die TAL BVU_1010 codiert, auf den Shuttle-Vektor pG106 unter Kontrolle des *ldh*-Promotors kloniert und in *P.*

4. Diskussion

vulgatus eingebracht (Kap. 3.4.3.6). Durch die hohe Transkriptabundanz einer Gen-Überexpression, die durch das pG106 Shuttle-System ermöglicht wird, sollte die geringe Aktivität der TAL BVU_1010 ausgeglichen werden. Im Gegensatz zur Überexpression des *pfl*-Gens *bvu_2880* (Erhöhung der Transkriptmenge um den Faktor 1537, Kap.3.2.2) konnte die Transkriptmenge von *bvu_1010* in der Überexpressionsmutante lediglich um den Faktor 15 erhöht werden (Kap. 3.4.3.7). Die Überproduktion von BVU_1010 führte als Konsequenz der geringen Transkriptmenge nicht zu einer nachweisbaren Ausbeute von Cumarsäure (Kap. 3.4.3.7).

Ungeachtet der erfolglosen Synthese von Cumarsäure durch die Überproduktion von BVU_1010 sollte das Potenzial des Enzyms nicht unterschätzt werden. Es gilt zu beachten, dass bereits in der Literatur beschriebene T/PAL ebenfalls nicht durch besonders hohe Umsatzraten charakterisiert sind (Tab. 34).

Tabelle 34: Kinetische Analyse verschiedener TAL unter Verwendung von Tyrosin oder Phenylalanin als Substrat. Angegeben sind die K_m -Werte für die jeweiligen Substrate sowie die Wechselzahl K_{cat} .

Enzym (Organismus)	Substrat	K_m [mM]	K_{cat} [s^{-1}]	Katalytische Effizienz [$s^{-1} mM^{-1}$]	Referenz
PvTAL (<i>Phocaeicola vulgatus</i>)	Tyrosin	0,042	0,13	3	Diese Arbeit
	Phenylalanin	35	0,07	0,002	
RsTAL (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	Tyrosin	0,074	4,32	58,4	Louie <i>et al.</i> , 2006
	Phenylalanin	11,4	13,1	1,2	
SeSam8 (<i>Saccharothrix espanaensis</i>)	Tyrosin	0,0047	0,015	3,2	Jendresen <i>et al.</i> , 2015
	Phenylalanin	6,3	0,016	0,003	
HaTAL1 (<i>Herpetosiphon auranticus</i>)	Tyrosin	0,024	0,076	3,2	Jendresen <i>et al.</i> , 2015
	Phenylalanin	33	0,21	0,0063	
FjTAL (<i>Flavobacterium johnsoniae</i>)	Tyrosin	0,0067	0,023	3,4	Jendresen <i>et al.</i> , 2015
	Phenylalanin	6,6	0,0094	0,00142	
AvPAL (<i>Anabaena variabilis</i>)	Tyrosin	-	-	-	Mays <i>et al.</i> , 2020
	Phenylalanin	0,06	0,65	11,9	
AvPAL L4P/G218S (<i>Anabaena variabilis</i>)	Tyrosin	-	-	-	Mays <i>et al.</i> , 2020
	Phenylalanin	0,14	1,18	8,43	

4. Diskussion

Die TAL mit der höchsten bisher beschriebenen Umsatzrate stammt aus *Rhodobacter sphaeroides*, einem anaeroben Purpur-Bakterium aus dem Phylum der Pseudomonata. Mit einer Wechselzahl K_{cat} von 4,32 ist dieses Enzym 33-mal schneller als die TAL aus *P. vulgaris*. Obwohl es sich bei dem Enzym um eine TAL handelt, arbeitet die RsTAL noch schneller mit Phenylalanin, jedoch reflektiert der hohe K_m -Wert die Substratspezifität zu Tyrosin. Die Produktion von Zimt- und Cumarsäure erfolgt bislang nicht mit aufgereinigtem Enzym, begründet durch die geringen Aktivitätswerte der bisher beschriebenen Biokatalysatoren. Eine katalytisch hochaktive TAL kann bereits für eine biotechnologische Anwendung interessant sein, jedoch liegen die Kosten für Tyrosin und Phenylalanin als Substrat zwischen 50-150 €/kg. Daher ist für die Produktion von Zimt- und Cumarsäure ein Produktionsstamm mittelfristig zielführender, da so deutlich günstigere Substrate für die Produktion eingesetzt werden können. Für die Entwicklung von Produktionsstämmen werden bisher biotechnologisch erschlossene Organismen wie *E. coli*, *S. cerevisiae*, und *P. putida* durch die Einbringung von heterologen Genen zur Herstellung von Zimt- und Cumarsäure eingesetzt (Nijkamp *et al.*, 2005; Vannelli *et al.*, 2007). Die bisher höchste Ausbeute für Zimtsäure wurde von Nijkamp *et al.* (2007) beschrieben. Durch die heterologe Expression der PAL von *R. toruloides* in *P. putida* S12 konnte eine Produktion von 0,8 g Cumarsäure /L Medium erreicht werden. Für die Produktion von Cumarsäure unter denselben Bedingungen betrug der Titer 1,7 g Cumarsäure /L Medium. Gemessen an diesen Ausbeuten besteht ein erheblicher Optimierungsbedarf in Hinblick auf die rekombinante Produktion der genannten Phenylpropanoide. Ein wichtiger Parameter für die mikrobielle Produktion von aromatischen Verbindungen ist die Toleranz des Produktionsstamms gegenüber der Toxizität des Endprodukts. Beispielsweise übt Cumarsäure einen starken antimikrobiellen Effekt gegen Gram-positive Bakterien aus (Pei *et al.*, 2016). Um einer potenziellen Toxizität entgegenzuwirken ist der Einsatz oder die Modifizierung von zellulären Transport-Systemen eine Möglichkeit. Beispielsweise konnte die Ausbeute an Cumarsäure in einem *E. coli* Produktionssystem verdoppelt werden, nachdem zusätzlich ein Efflux Transportsystem für aromatische Säuren im Organismus produziert wurde (Sariaslani, 2007). Durch die direkte Abführung von Cumarsäure während der Kultivierung könnte die Produktausbeute zusätzlich gesteigert werden.

Neben der Produktion von Zimt- und Cumarsäure spielen Ammoniak-Lyasen in der jüngeren Vergangenheit auch im medizinischen Bereich für die Behandlung von Menschen, welche an der Stoffwechselerkrankung Phenylketonurie (PKU) leiden, eine Rolle. Dabei handelt es sich um eine genetisch bedingte Beeinträchtigung des Phenylalanin-Stoffwechsels, welche durch eine mangelnde Phenylalanin-Hydroxylase Aktivität aufgrund von Mutationen charakterisiert wird (Christ, 2003). Die Phenylalanin-Hydroxylase setzt Phenylalanin zu Tyrosin um und verhindert so eine Akkumulation von Phenylalanin im Blut. Eine solche Akkumulation führt im schlimmsten Fall zu einer Reihe von neurotoxischen Effekten, welche sich wiederum in Entwicklungsstörungen und kognitiven

4. Diskussion

Einschränkungen äußern (Huttenlocher, 2000). Neben Proteinen ist eine der bekanntesten Phenylalanin-Quellen der synthetische Süßstoff Aspartam, der in zahlreichen Kalorien-reduzierten Getränken verwendet wird und im Körper zu Asparaginsäure, Phenylalanin und Methanol abgebaut wird (Butchko *et al.*, 2002). Bisherige Therapie-Ansätze basieren primär auf der Vermeidung von Phenylalaninquellen in Nahrungsmitteln und erfordern einen speziellen Ernährungsplan mit zusätzlicher Tyrosin-Supplementation (Van Wegberg *et al.*, 2017). Wie bereits erwähnt katalysiert die Enzym-Klasse PAL mit hoher Selektivität die Umwandlung von Phenylalanin zu Ammoniak und Zimtsäure. Während Ammoniak in der Leber metabolisiert werden kann, wird Zimtsäure über den Urin ausgeschieden. Daher eignet sich die PAL als Therapeutikum für die Senkung des Phenylalanin-Spiegels im Blut (Bell *et al.*, 2017). In den USA ist seit 2018 die subkutane Injektion von PAL-Präparaten in Kapselform (Palynziq®, BioMarin Pharmaceutical Inc., Irland) als Therapie autorisiert, wobei die entsprechende PAL aus dem Cyanobakterium *Anabaena variabilis* stammt (AvPAL) (Hydery & Coppenrath, 2019). Seitdem findet ein Wettbewerb um weitere Therapie-Ansätze statt, welche auf der Enzymklasse der PAL basieren. Beispielsweise wurde die AvPAL in einer Studie von Mays *et al.* (2020) durch gezielte Mutagenisierung optimiert, sodass die Aktivität und Affinität des Enzyms zu Phenylalanin verdoppelt wurde (Tab. 34). Weiterhin wird an der Entwicklung eines probiotischen *E. coli* Nissle Stamm gearbeitet, welcher in hohen Mengen PAL produziert und unkompliziert oral verabreicht werden kann (Puurunen *et al.*, 2021).

Für solch eine Anwendung scheint die in dieser Arbeit beschriebene TAL, aufgrund der geringen Affinität zu Phenylalanin und der grundsätzlich niedrigen Aktivität zunächst nicht geeignet. Jedoch existiert für diese Enzymklasse eine Reihe an bereits erfolgreich angewandten Modifizierungsmethoden, welche eine Optimierung durchaus zulassen. Watts *et al.* (2006) konnten bestätigen, dass der Austausch der Aminosäure Histidin zu Phenylalanin im aktiven Zentrum des Enzyms zu einem Switch der Selektivität der TAL aus *Rhodobacter sphaeroides* von Tyrosin zu Phenylalanin führte, wobei die Aktivität mit Phenylalanin sogar gesteigert wurde. Des Weiteren konnte die Mutagenisierung der PAL aus *Anabaena variabilis* im Rahmen einer Studie von Mays *et al.* (2020) ebenfalls die Affinität und Aktivität des Enzyms steigern.

Das initiale Potenzial für relevante Anwendungsgebiete der TAL aus *P. vulgaris* scheint, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, nicht übermäßig vielversprechend. In künftigen Experimenten sollten die hier vorgestellten Optimierungsansätze für BVU_1010 überprüft und bewertet werden. Für die weitere Entwicklung von *P. vulgaris* als Produktionsstamm existiert bereits ein umfangreiches Spektrum von verschiedenen T/PAL aus Pflanzen und Mikroorganismen, welche einen soliden Ausgangspunkt für die Produktion von Cumar- und Zimtsäure in *Phocaeicola*-Spezies bieten.

4.6 Fluoreszenz-Markierung von obligat anaeroben Mikroorganismen

Die genetische Modifizierung von Mikroorganismen bedingt im Wesentlichen die Einbringung von rekombinanter DNA in den Zielorganismus. Neben der Möglichkeit zur Überexpression von Proteinen oder zur Integration/Deletion von genomischen DNA-Sequenzen können diese auch für die Fluoreszenzmarkierung (sog. Fluoreszenz-Tags) von Proteinen eingesetzt werden (Chalfie *et al.*, 1994). Seit über 30 Jahren werden fluoreszierende Proteine als Werkzeug für die Markierung von Mikroorganismen, Zellstrukturen und einzelnen Proteinen verwendet. Fluoreszenz-Tags ermöglichen eine nicht-invasive Visualisierung von Zellen in Echtzeit, sowohl im Labor als auch in natürlichen Umgebungen. Diese Visualisierungstechniken erlauben außerdem, die Dynamik und räumliche Verteilung von Mikroorganismen zu verfolgen, ihre Interaktionen mit anderen Organismen zu analysieren und ihr Verhalten unter verschiedenen Umweltbedingungen zu untersuchen. Darüber hinaus eröffnet die Anwendung fluoreszierender Proteine in Mikroorganismen neue Möglichkeiten für die Analyse von Proteinfunktionen und die Untersuchung zellulärer Prozesse. Durch die gezielte Expression von fluoreszierenden Proteinen in bestimmten Zellkompartimenten oder an spezifischen Proteinen kann die Lokalisierung und Bewegung von Proteinen analysiert und berechnet werden. Dies ermöglicht es, die Funktionen einzelner Proteine zu untersuchen, ihre Wechselwirkungen mit anderen Molekülen zu analysieren und sogar Signalwege und Regulationsmechanismen zu entschlüsseln.

In diesem Abschnitt der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, die beiden Fluoreszenz-Marker UnaG und IFP2.0 als Instrumente zur Visualisierung von lebenden Zellen und einzelnen Proteinen im obligat anaeroben Modellorganismus *P. vulgatus* zu etablieren. Als Zielprotein für die Fluoreszenz-Markierung wurde die cytoplasmatische Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) gewählt, da sich dieses zuverlässig durch den Shuttle-Vector pG106 homolog mit einer hohen Translationsrate in *P. vulgatus* überproduzieren lässt (Lück & Deppenmeier, 2022).

4.6.1 Übersicht von Fluoreszenz-Markern für die Anwendung unter anaeroben

Bedingungen

Als wohl berühmtestes Fluoreszenz-Tag gilt das „green-fluorescent“ Protein (GFP), welches erstmals 1962 aus der lumineszenten Qualle *Aequorea victoria* isoliert und charakterisiert wurde (Shimomura *et al.*, 1962). Erst 32 Jahre später konnte das immense Potenzial von GFP als rekombinantes Tag für die Visualisierung von Proteinen in Bakterien und sogar eukaryotischen Zellen erstmals *in vivo* demonstriert werden (Chalfie *et al.*, 1994). In den Folgejahren wurden vermehrt Ressourcen in die Erforschung und Optimierung von GFP investiert. So entstanden unzählige Varianten von GFP mit völlig verschiedenen Fluoreszenz-Spektren, welche das simultane Tracking mehrerer verschiedener Zellen, oder sogar verschiedener Proteine innerhalb einer Zelle ermöglichten. Im Jahr 2008 gipfelte die Forschung mit der Verleihung des Nobel-Preises an Tsien und Shimomura, welche als Pioniere der GFP-

4. Diskussion

Forschung gefeiert wurden (Tsien, 2010). Während GFP aufgrund seiner Flexibilität für viele Zwecke eingesetzt werden kann, ist die Abhängigkeit von Sauerstoff bei der Bildung des Chromophors von GFP ein limitierender Faktor für die Anwendung in Sauerstoff-sensiblen Mikroorganismen (Tsien, 2010). Daher steht die enorme Bandbreite an fluoreszierenden Proteinen für die Visualisierung von Proteinen in obligat anaeroben Bakterien nur sehr begrenzt zur Verfügung.

In der Vergangenheit konnte GFP tatsächlich auch in anaerob lebenden Mikroorganismen der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* erfolgreich angewendet werden. Die Reifung des GFP-Fluorophors benötigt zwar Sauerstoff, jedoch wurde gezeigt, dass eine nachträgliche Sauerstoff-Exposition von GFP-markierten Organismen ausreicht, um die fluoreszierenden Eigenschaften von GFP wiederherzustellen (Zhang *et al.*, 2005). Erst kürzlich wurde diese Methode in *Bacteroides thetaiotaomicron* angewandt. Vor der Visualisierung wurde der Organismus für fünf Stunden Sauerstoff ausgesetzt, wonach die Reifung des GFP-Fluorophors mittels Fluoreszenz-Mikroskopie bestätigt wurde (Zheng *et al.*, 2022). Prinzipiell sind *Bacteroides* und *Phocaeicola* Vertreter auch unter mikroaeroben Bedingungen wachstumsfähig (Baughn & Malamy, 2004). So zeigte eine Studie von García-Bayona *et al.* (2020), dass Sauerstoff-Konzentrationen im nanomolaren Bereich für die Reifung von GFP in *B. fragilis* bereits ausreichen.

Neben der Fusion von Fluoreszenz-Tag an ein Protein von Interesse existieren alternative Markierungs-Protokolle, welche potenziell für anaerobe Zwecke geeignet sind. Eine Auswahl solcher Tools ist in Tabelle 35 zusammengefasst und werden in folgenden Abschnitten näher erläutert.

4. Diskussion

Tabelle 35: Übersicht von Fluoreszenz-Markern für die Anwendung in biologischen Systemen.

Marker	Emissions-Spektrum	Vorteile	Nachteile	Quelle
Sauerstoff-abhängige Protein-Tags				
GFP FP	Grün variiert	• Genetisch codiert • Verfügbarkeit von unzähligen Varianten die ein großes Wellenlängen-Spektrum abdecken	• Sauerstoff ist zwingend notwendig • Wiederherstellung der Fluoreszenz durch Sauerstoff-Exposition nicht zuverlässig	Tsien <i>et al.</i> , 2010
Sauerstoff-unabhängige Protein-Tags				
UnaG	Grün	• Genetisch codiert • Geeignet für anaerobe Anwendungen • Ligand ist Membrangängig	• Ligand ist Wasserunlöslich	Kumagai <i>et al.</i> , 2013
IFP2.0	Rot	• Genetisch codiert • Geeignet für anaerobe Anwendung • Ligand ist Membrangängig	• Ligand ist Wasserunlöslich • Emissionen nahe dem Infrarot-Spektrum, daher geringer Kontrast	Yu <i>et al.</i> , 2014
Biokonjugation				
Flash ReAsh	Grün Rot	• Genetisch codiert • Tag ist maximal 20 AAS groß	• Liganden enthalten Arsen und sind toxisch • nur wenig Erfolg für <i>in vivo</i> Anwendungen in anaeroben Organismen • Große Gefahr von unspezifischer Liganden-Bindung	Griffin <i>et al.</i> , 1998 Gaietta <i>et al.</i> , 2002
SNAP Halo-Tag CLIP	variiert	• Genetisch codiert • Wurde bereits für anaerobe <i>in vivo</i> Anwendungen demonstriert • Große Vielfalt an synthetischen Liganden	• Geringer Kontrast, die meisten Liganden sind nicht besonders hell • Liganden sind nur selten Membrangängig	Los <i>et al.</i> , 2008 Keppler <i>et al.</i> , 2003 Gautier <i>et al.</i> , 2008
Fluoreszierende unnatürliche Aminosäuren (UAA)	Blau	• Keine Liganden benötigt	• Geringer Kontrast • Technische Umsetzung sehr herausfordernd, eine gute genetische Zugänglichkeit des Ziel-Organismus ist zwingend erforderlich.	Wang <i>et al.</i> , 2006 Summerer <i>et al.</i> , 2006
Markierungen von Strukturen				
Konjugierte Antikörper	variiert	• Präzise Markierung von Oberflächen • Gut geeignet für die parallele Markierung mehrerer Ziele	• Teuer in der Herstellung • nicht geeignet für <i>in vivo</i> Anwendungen, Zellen müssen fixiert werden	Kebir <i>et al.</i> , 2016
Aptamere	Variiert	• Große Vielfalt an kontrastreichen, Membran-gängigen Liganden	• Eignung für anaerobe Anwendungen bisher nicht bestätigt • Liganden sind oft toxisch, kaum geeignet für <i>in vivo</i>-Anwendungen	Paige <i>et al.</i> , 2011 Babendure <i>et al.</i> , 2003 Dolgosheina <i>et al.</i> , 2014
Nanobodies & Chromobodies	Varriert	• Können modifiziert werden • Können mit organischen Farbstoffen konjugiert werden • Können mit FP's konjugiert werden	• Bisher nicht für anaerobe Anwendungen erprobt	Rothbauer <i>et al.</i> , 2006 Olichon <i>et al.</i> , 2007

4.6.1.1 Sauerstoff-unabhängige Fluoreszenz-Tags

Bei fluoreszenten Proteinen wird zwischen intrinsischer und extrinsischer Fluoreszenz differenziert. Als intrinsisch fluoreszentes Protein bildet GFP in Anwesenheit von Sauerstoff im Laufe des natürlichen Faltungsprozesses autokatalytisch das Fluorophor 4-(p-Hydroxybenzyliden) Imidazolidin-5-on (Tsien, 1998). Bei extrinsisch fluoreszenten Proteinen wie UnaG oder IFP2.0 wird ein Ligand benötigt, welcher die Bildung des Fluorophors erst ermöglicht. Die beiden Proteine UnaG und IFP2.0 gelten als Bilin-Bindeproteine und benötigen für ihren fluoreszenten Charakter die Liganden Bilirubin bzw. Biliverdin (Chia *et al.*, 2020). In dieser Arbeit wurden die beiden Fluoreszenz-Tags UnaG und IFP2.0 als potenzielles Zell- und Protein-Tracking-Tool für *P. vulgatus* untersucht. Als Ziel-Struktur für die Visualisierung wurde die LDH (BVU2499) ausgewählt, da sich dieses Protein zuverlässig und unkompliziert in *P. vulgatus* überproduzieren lässt (Lück & Deppenmeier, 2022). Für die Fluoreszenz-Markierung der LDH wurde das pG106 Plasmidsystem eingesetzt. Durch die gemeinsame Klonierung des *ldh*-Promotors, der kodierenden Sequenz des UnaG- bzw. IFP2.0-Tags und des *ldh*-Gens wurde ein Vektor generiert, welcher die konstitutive Überproduktion der LDH mit N-terminalen Fluoreszenz-Tag ermöglichte. Die beiden Liganden Bilirubin und Biliverdin, welche für die Fluoreszenz von UnaG bzw. IFP2.0 verantwortlich sind, wurden dem Wachstumsmedium vor der Inokulation mit *P. vulgatus* zugegeben. Als Vorbereitung für die Fluoreszenz-Mikroskopie wurden lebende Zellen unter anaeroben Bedingungen auf einem Objektträger mit 1% Agarose immobilisiert und mit Lack versiegelt.

UnaG stammt aus dem Muskelgewebe des japanischen Aals (*Anguilla japonica*) und zeigt mit dem Liganden Bilirubin eine Fluoreszenz, deren Intensität mit GFP vergleichbar ist. Außerdem besitzt UnaG eine geringe Größe von 16 kDa und wurde bereits erfolgreich für die Markierung in eukaryotischen sowie prokaryotischen Zellen eingesetzt (Chia *et al.*, 2020; Ko *et al.*, 2021). Aufgrund seiner Unabhängigkeit von Sauerstoff ist UnaG natürlicherweise ein Favorit für Experimente unter anaeroben Bedingungen (Kumagai *et al.*, 2013). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich die Anwendung von UnaG als Fluoreszenz-Marker für die Visualisierung von *P. vulgatus* eignet (Kap. 3.5.2). In *P. vulgatus*-Zellen, welche das UnaG-LDH Fusionsprotein produzierten, konnte eine geringe, ungleichmäßige aber klar erkennbare Fluoreszenz detektiert werden. Ein Großteil der Zellen fluoreszierte zwar nicht, aber dafür war in wenigen einzelnen Zellen ein diffuses, bewegliches Fluoreszenz-Muster erkennbar. Dabei handelte es sich um einzelne LDH-Moleküle, deren Bewegungsmuster visualisiert werden konnte.

In einer Studie von Chia *et al.* (2020) konnte eine bereits mit dem Auge sichtbare und gleichmäßige Fluoreszenz durch UnaG-Fusionsproteine in Kultur-Material von *B. thetaiotaomicron* gezeigt werden. Die heterogene Fluoreszenz von *P. vulgatus* in dieser Arbeit ließe sich eventuell dadurch erklären, dass dem Organismus zwei Kopien des *ldh*-Gens zur Verfügung stehen: Zum einen die genomische Kopie,

4. Diskussion

zum anderen die Plasmid-vermittelte Kopie in Kombination mit der *unaG*-Sequenz. Es könnte sein, dass sich das Expressionsmuster des UnaG-markierten *ldh*-Gens von dem des Wildtyp-*ldh*-Gens zwischen einzelnen Zellen unterschied. Darüber hinaus könnte auch das Verhältnis des Transkripts der beiden *ldh*-Varianten stark in Richtung der Wildtyp-Variante verschoben sein. Durch Lück & Deppenmeier (2022) wurde bestätigt, dass beide Kopien des *ldh*-Gens exprimiert werden, welches in einer deutlich höheren Lactat-Produktion resultierte. Zusätzlich könnte die Ausbildung unerwünschter Sekundärstrukturen innerhalb der transkribierten mRNA des UnaG-Ldh-Fusionskonstruktes den Translationsvorgang negativ modulieren, was in einer reduzierten Ausbeute fluoreszierender Proteine resultiert. Unabhängig von den Erwartungen lässt sich festhalten, dass sich UnaG als Fluoreszenz-Tag durchaus für anaerobe Anwendungen eignet. Die geringe Fluoreszenz-Intensität könnte, neben dem verwendeten Organismus und Ziel-Protein, auch durch die Verfügbarkeit des Liganden innerhalb einer Zelle begründet werden. Im Fall des in dieser Arbeit untersuchten LDH-UnaG-Fusionsproteins eignete sich die geringe Intensität sogar begrenzt für Single-Molecule Tracking (Kap. 3.5.2). Das flackernde Fluoreszenz-Muster in einzelnen Zellen bildete eindeutig die Bewegung der LDH-Moleküle ab, jedoch werden für Single-Molecule Tracking möglichst wenige fluoreszierende Moleküle benötigt, sodass sich die Bewegung der einzelnen Moleküle durch die Zelle besser nachvollziehen lässt.

Für künftige Anwendungen bringt UnaG noch weitere Vorteile mit sich. Es ist möglich die Fluoreszenz von UnaG ein- und auszuschalten. Kwon *et al.* (2020) stellten fest, dass die Fluoreszenz-Intensität von aufgereinigtem UnaG in der Anwesenheit von Sauerstoff durch Photo-Oxidation stark abnimmt. Die Fluoreszenz kann jedoch durch erneute Zugabe des Liganden Bilirubin beliebig oft wiederhergestellt werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass die Photo-Oxidation den Liganden betrifft, und nicht das Protein selbst. Aufgrund der Notwendigkeit von Sauerstoff für die Nutzung dieses Vorteils ist die Anwendung in anaeroben Organismen zwar begrenzt, dennoch lässt sich UnaG für fixierte Zellen einsetzen. Moderne Molekül-Tracking Methoden wie beispielsweise STORM (Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) benötigen solche regulierbaren Fluorophore, da bei dieser Methode durch die Messung weniger aktivierter Fluorophore während einer Vielzahl an Messzyklen eine Auflösung im Nanometer-Bereich erreicht wird (Rust *et al.*, 2006).

Neben UnaG wurde in dieser Arbeit auch das IFP2.0 Fluoreszenz-Tag für die N-terminale Markierung der LDH in *P. vulgaris* Zellen untersucht. Im Gegensatz zu Zellen, welche mit UnaG markiert wurden, führte eine IFP2.0-Markierung zu einer deutlich gleichmäßigeren, aber im Durchschnitt schwächeren Fluoreszenz (Kap. 3.5.2). Für die Detektion der Fluoreszenz von UnaG-Tags reichte eine Anregungsleistung des Lasers von 50 mW aus. Für die Anregung von IFP2.0 hingegen war eine Leistung von 200 mW notwendig. Dieser Unterschied lässt sich durch die experimentellen Bedingungen begründen, welche bei der Erfassung der Daten in dieser Arbeit vorherrschten. IFP2.0 fluoresziert nahe

dem Infrarot-Bereich, das Fluorophor kann bei 690 nm angeregt werden und die resultierenden Emissionen besitzen eine Wellenlänge von 711 nm (Yu *et al.*, 2014). Aufgrund technischer Limitierungen wurde sich diesen Parametern in dieser Arbeit nur angenähert. Die höchste maximale Anregungswellenlänge betrug daher 638 nm, und der korrespondierende Emissionsfilter 689 nm. Unter optimalen Bedingungen wäre demnach ein deutlicheres Ergebnis zu erwarten. Trotz dieser suboptimalen Bedingungen wurde eine gleichmäßige Fluoreszenz in allen Plasmid-tragenden *P. vulgaris* Zellen detektiert (Kap. 3.5.2). Aufgrund der langen Emissions-Wellenlänge von IFP2.0 ist die intrinsische Hintergrund-Fluoreszenz von Zell- und Medium-Bestandteilen deutlich geringer als bei kurzen Wellenlängen, daher eignet sich IFP2.0 gut als Fluoreszenz-Marker für Proteine mit einer geringen Kopienzahl. In einer Studie von Chia *et al.* (2020) wurde die Markierung von SusE, einem Protein in der äußeren Membran von *B. thetaiotaomicron*, verwendet. Dieses Protein konnte während der Translation in sehr geringen Mengen auch im Cytoplasma nachgewiesen werden, wodurch die Sensibilität von IFP2.0 demonstriert wurde. Für die Anwendung als Marker für das Single Molecule Tracking eignete sich IFP2.0 in dieser Arbeit nicht, jedoch lässt sich IFP2.0 aufgrund der gleichmäßigen Fluoreszenz als Zellmarker einsetzen, um die Zusammensetzung und Entwicklungen von einzelnen Organismen in künstlichen Zell-Communities zu analysieren.

4.6.1.2 Biokonjugation

Während traditionelle Fluoreszenz-Marker die räumliche Anordnung von Fusions-Proteinen behindern können, sinkt diese Gefahr mit der Verwendung von kleinen Peptid-Tags (Pomorski & Krężel, 2011). Beispielsweise wurde ein Tetracystein-Tag mit einer Größe von bis zu 20 Aminosäuren entwickelt, welches durch ein charakteristisches CCXXCC-Motif kovalent mit einem grünen (F1AsH) oder roten (ReAsH) Fluoreszenz-Farbstoff reagiert (Griffin *et al.*, 1998). Dieses System wurde ebenfalls für die Markierung von Proteinen in der äußeren Membran in *B. thetaiotaomicron* angewandt (Karunatilaka *et al.*, 2013). Es wird jedoch durch die Liganden selbst limitiert: Es handelt sich dabei um Fluorophore, welche auch ohne kovalente Bindung zu einem Tag fluoreszieren, was zu einer intensiven Hintergrund-Fluoreszenz führt. Darüber hinaus binden die Liganden auch, sofern vorhanden, am CCXXCC-Motif aller Proteinstrukturen, wodurch die Präzision dieses Systems leidet. Um diese unspezifischen Markierungen zu verhindern sind Waschschrte mit Chemikalien wie Ethendithiol oder Dimercaptoethanol notwendig, um überschüssige Liganden zu entfernen.

Eine Alternative zu fluoreszierenden Proteinen sind selbst-markierende Proteine. Analog zu der Verwendung von Fluoreszenz-Proteinen werden auch diese Systeme N- oder C-Terminal bei der Translation der Zielproteine angehängen. Die Besonderheit dieses Systems ist die Flexibilität, da diese Proteine, je nach Bedarf, mit einer Vielzahl an Fluorophoren als Liganden reagieren können. So genießt man die Vorteile der Spezifität von Fluoreszenz-Tags, aber auch die flexible Funktionalität durch eine

4. Diskussion

Vielzahl an verfügbaren Liganden, welche verschiedene Bedürfnisse erfüllen (Grimm *et al.*, 2017). Bisher können etablierte Systeme wie Halo-Tag, SNAP und CLIP sogar für die simultane Markierung mit verschiedenen Fluorophoren in einer Zelle kombiniert werden (Stagge *et al.*, 2013). Die Sauerstoff-unabhängigen Liganden sind, aufgrund ihrer synthetischen Natur, deutlich heller und stabiler als traditionelle FP-Tags, und eignen sich daher für die Anwendung unter anaeroben Bedingungen. Beispielsweise wurde das Halo-Tag System bereits in *B. thetaiotaomicron* für Single Molecule Tracking-Experimente zur Aufklärung des Stärke-Abbaus eingesetzt (Tuson *et al.*, 2018). Das Halo-Tag basiert auf einer bakteriellen Halogenase, welche kovalent Chloralkan-Reste bindet. Durch die Konjugation von Chloralkan-Resten mit Fluorophoren lassen sich relativ unkompliziert beliebige Liganden für das Halo-Tag System entwickeln (Los *et al.*, 2008). Bisher sind noch keine Liganden identifiziert oder entwickelt worden, welche in lebende Zellen eindringen können. Durch die Zugabe der Liganden in das Kulturmedium ist die Assoziation mit dem Halo-Tag während der Wachstumsphase der Zellen trotzdem möglich. Die Anwesenheit von Liganden im Medium kann allerdings zu Hintergrund-Fluoreszenz führen. In *B. thetaiotaomicron* wurde das Halo-Tag System erfolgreich für *in vivo* Visualisierungen von Proteinen unter anaeroben Bedingungen in der äußeren Membran angewendet (Karunatilaka *et al.*, 2014). Da ein Großteil der verfügbaren Liganden für das Halo-Tag System nicht permeabel für Zellmembranen ist, eignet sich das Tag primär für die Markierung von Zielen außerhalb der Zelle, sofern man invasive Methoden wie Elektroporation oder einen osmotischen Schock vermeiden möchte. Weiterhin besitzen die Liganden für dieses System eine hohe Fluoreszenz-Intensität, daher sind viele, gründliche Waschschrte notwendig, um eine Hintergrund-Fluoreszenz zu reduzieren und gleichzeitig die Zuverlässigkeit der Detektion zu erhöhen.

Eine deutlich exotischere Art der Proteinmarkierung ist der Einbau von unnatürlichen Aminosäuren (UAA) mit intrinsisch fluoreszierenden Seitenketten in das Protein von Interesse. Die sterische Faltung der Proteine wird dabei nicht behindert und eine Verwendung unter anaeroben Bedingungen ist ebenfalls möglich (Bain *et al.*, 1989, Noren *et al.*, 1989). Ein Beispiel für die Anwendung von UAA's ist ein Coumarin-Aminosäuren Derivat, welches in Proteinen von *E. coli* und *S. cerevisiae* inkorporiert wurde (Wang *et al.*, 2006; Charbon *et al.*, 2011). Neben intrinsisch fluoreszenten Aminosäuren wird auch an Aminosäuren-Konjugaten mit einem fluoreszierenden Liganden geforscht. Durch die Verfügbarkeit eines reaktiven Rests, welcher mit mehreren Liganden interagieren kann, wächst die Flexibilität des Systems deutlich (Beatty *et al.*, 2006). Obwohl dieses System theoretisch unter anaeroben Bedingungen funktionieren sollte, gibt es bis heute keine Demonstrationen dieser Art. Diese Methode erfordert eine hohe genetische Zugänglichkeit des Ziel-Organismus, da hier künstlich der genetische Code um die unnatürliche Aminosäure erweitert werden muss. Die experimentellen Herausforderungen beinhalten daher die Platzierung von Nonsense UAA-Codons im Ziel-Gen, sowie

der Manipulation der tRNA-Synthetase und Entwicklung der tRNA, welche die nicht proteinogene Aminosäure vermittelt (Wang *et al.*, 2006; Summerer *et al.*, 2006).

4.6.1.3 Struktur-spezifische Fluoreszenz-Markierung

Der Einsatz von Fluoreszenz-Tags muss nicht zwangsläufig die rekombinante Expression von Fusions-Proteinen bedingen. Besonders in der Forschung an eukaryotischen Zellen, in der auch simple genetische Modifikationen erheblichen Aufwand erfordern, sind alternative Methoden notwendig. Durch die Kopplung von Antikörpern mit synthetisch hergestellten Fluorophoren können sehr präzise Strukturen innerhalb von eukaryotischen Zellen mit Markierungen versehen werden. Auch hier hat die Forschung eine große Bandbreite an Fluorophoren mit verschiedenen Fluoreszenz-Spektren hervorgebracht, sodass die simultane Anwendung von mehreren Fluorophoren möglich ist. Beispielsweise in der Forschung von Muskelerkrankungen, welche häufig auf pathologische strukturelle Veränderungen der Proteinfilamente zurückzuführen sind, werden diese multiplen Antikörper-Markierungen häufig verwendet (Kebir *et al.*, 2016). Theoretisch ist die Anwendung von Antikörper-vermittelter Fluoreszenz-Markierung für jedes biologische System möglich, da nur eine Voraussetzung erfüllt sein muss: Die Zielstruktur muss dem Antikörper zugänglich sein. Da Antikörper große Proteine sind, müssen die Strukturen künstlich freigelegt werden, was in der Regel durch die Fixierung von Zellen bewerkstelligt wird. Daher eignen sich diese Systeme nicht für *in vivo* Studien. Außerdem muss die zu markierende Struktur für die Entwicklung der Antikörper als Template verwendet werden. Bis heute werden die potentesten Antikörper durch die Immunisierung von Tieren mit dem Antigen von Interesse entwickelt, was einen hohen finanziellen und zeitlichen Aufwand sowie die Durchführung von Tierexperimenten bedingt (Stills, 2012).

Basierend auf der Anwendung von Antikörpern sind Nanobodies als Markierungssystem entstanden. Nanobodies bestehen nur aus den Peptiden, welche normalerweise das Paratop eines Antikörpers bilden (Rothbauer *et al.*, 2006). Mit einer geringen Größe von 12-15 kDa sind diese daher gegenüber der ursprünglichen Größe von Antikörpern (~150 kDa) deutlich besser für *in vivo* Anwendungen geeignet. Zwar basiert die Generierung von Nanobodies auf demselben Prinzip wie dem von Antikörpern, doch eignen sich diese sogar für Echtzeit-Single Molecule Tracking (Virant *et al.*, 2018). Zu diesem Zweck müssen Nanobodies, genau wie Antikörper, funktionalisiert werden: Zum einen müssen Nanobodies mit einem Fluorophor konjugiert werden, zum anderen benötigen Nanobodies ein Tag, welches den Übergang von Zellmembranen ermöglicht, da sie nicht Membran-gängig sind. Ein Vorteil von Nanobodies ist die Freiheit, jeder erdenkliche Fluorophor als Konjugat zu verwenden. Die Anwendungsmöglichkeiten reichen vom klassischen GFP bis hin zu synthetischen Fluorophoren wie Alexa 594 (Rothbauer *et al.*, 2006; Kaiser *et al.*, 2014; Traenkle *et al.*, 2017). Außerdem erfordern Nanobodies keine genetische Modifikation des Zielorganismus, da die Interaktion ausschließlich

4. Diskussion

zwischen dem Paratop des Nanobodies und dem Epitop des Proteins von Interesse stattfindet. Auch für die Anwendung unter anaeroben Bedingungen sind Nanobodies durchaus geeignet, beispielsweise für die Markierung von Organismen in einer Mischkultur durch einzigartige, Art-spezifische Epitope der Zelloberfläche. Für das Tracking von Proteinen im Organismus ist die Anwendung in Bezug auf das Kosten/Nutzen-Verhältnis eher nicht erstrebenswert.

Neben Antikörpern sind in der jüngeren Vergangenheit Detektionssysteme abseits von Proteinstrukturen entstanden. Sogenannte Aptamere sind Einzelsträngige DNA oder RNA-Moleküle, welche über künstliche *in vitro* Evolutions-Techniken für die Bindung an Liganden von Interesse zugeschnitten wurden. Diese Bindung erfolgt entweder über die komplementäre Basen-Paarung zwischen dem Aptamer und einer Nukleinsäure oder über die Erkennung von kurzen Peptid-Sequenzen (Song *et al.*, 2013). Erst kürzlich wurden Aptamere für die Echtzeit-Visualisierung von Transkriptions-Prozessen in eukaryotischen Zellen eingesetzt (Song *et al.*, 2017). Anders als bei der Anwendung von Antikörpern müssen Zellen nicht fixiert und permeabilisiert werden, damit die Aptamere ihr Epitop erreichen. Stattdessen werden diese *in vivo* direkt im Organismus exprimiert, oder werden als Sonde verwendet, da sie einfach im Thermocycler synthetisiert werden können. Die Fluoreszenz-Markierung erfolgt über die Bindung von Fluorophoren, wie z.B. dem GFP-Analogon 3,5-Difluoro-4-Hydroxybenzylidin Imidazolinon (DFHBI), welches erst in Interaktion mit einem Aptamer fluoresziert (Paige *et al.*, 2011). In anaeroben Organismen wurden Aptamere bisher noch nicht eingesetzt. Trotz des Forschungsfortschritts bringen Aptamere noch einige Limitationen mit sich. Die Fluoreszenz-Intensität liegt auch im besten Falle immer noch deutlich unter der von GFP, außerdem ist die korrekte Faltung von Aptameren relativ unzuverlässig. Darüber hinaus können Aptamere durch Nukleasen degradiert werden, wodurch sich die Anwendung *in vivo* als problematisch gestaltet (Lakhin *et al.*, 2013).

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Erweiterung der genetischen Zugänglichkeit des relevanten Darmbakteriums *Phocaeicola (P.) vulgatus* mit dem Ziel, eine reproduzierbare und zuverlässige Methode zur markerlosen Deletion von chromosomalen Gensequenzen für die Gattungen *Bacteroides/Phocaeicola* zu etablieren. Außerdem wurden, mittels neu-entwickelter und bestehender genetischer Systeme für *Bacteroides/Phocaeicola*-Spezies, der zentrale Kohlenstoff-Stoffwechsel und Phenolsäure-Metabolismus in *P. vulgatus* untersucht und modifiziert um festzustellen, ob sich *P. vulgatus* als Plattform-Organismus für eine biotechnologische Produktion der Phenolsäuren Phenyllessigsäure und Cumarsäure eignet. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. Für eine Modifizierung des Stoffwechsels mithilfe der markerlosen Deletion von Gensequenzen durch homologe Rekombination wurde für *P. vulgatus* ein potenter Gegenselektionsmarker identifiziert und evaluiert. Die heterologe Expression des *sacB*-Gens aus *Bacillus subtilis* mittels des pG106 Shuttle-Vektors führte in *P. vulgatus* zu einer letalen Sensibilität gegenüber dem Substrat Saccharose. Durch eine anschließende Expression von *sacB* mithilfe des genomintegrativen Vektors pMM656 wurde zusätzlich demonstriert, dass eine einzelne genomische Kopie von *sacB* ausreicht, um einen letalen Effekt gegenüber Saccharose zu vermitteln. Die Kombination des Plasmid-Rückgrats von pMM656 und des *sacB*-Gens ermöglichte die Entwicklung eines modularen Deletions-Vektors, welcher alle Voraussetzungen für die Durchführung einer markerlosen Deletion in *P. vulgatus* erfüllte. Als Modellsystem wurde das Gen *bvu_1663*, welches für eine β -Exo-Fructosidase codiert, aus dem Genom von *P. vulgatus* deletiert.
2. Die Deletion des Gens *bvu_1663* aus dem Genom von *P. vulgatus* resultierte in einem Phänotyp, welcher die Fruktan-Polymere Inulin- und Levan-FOS nicht mehr als Kohlenstoff- und Energiequelle verwertete. Eine Kombination aus Experimenten mit aufgereinigter β -Exo-Fructosidase BVU_1663 und Membranpräparationen von *P. vulgatus* ermöglichten die Modellierung des Fruktan-Metabolismus von *P. vulgatus*, wodurch die bisherigen Kenntnisse zur Verwertung von Inulin- und Levan-FOS durch *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies ergänzt wurden. Da es sich bei Inulin- und Levan-FOS um wichtige Präbiotika handelt und diese nach Verzehr den Dickdarm erreichen, war die Aufklärung der Verwertung durch Darm-Kommensale, wie z.B. *P. vulgatus*, von hoher Relevanz.
3. Durch die homologe Überexpression des für die Pyruvat:Formiat Lyase kodierenden Gens *bvu_2880 (pfl)* in *P. vulgatus* mittels des pG106 Shuttle-Vektors wurde überprüft, ob der zentrale Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* gezielt modifiziert werden kann. Hierfür wurde die *pfl*-Kopienzahl und die Transkriptabundanz zwischen dem Plasmid-tragenden

5. Zusammenfassung

Stamm und dem Wildtyp verglichen. Die Shuttle-Vektor tragende Mutante, *P. vulgatus* pG106 2880, zeigte eine ca. 1500-fache Erhöhung der *pfl*-Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp. Schlussendlich führte dies zu einer Verschiebung des Produktspektrums hin zu einer 3,2-fachen Steigerung der Formiat-Produktion im Plasmid-tragenden Stamm *P. vulgatus* pG106 2880.

4. Im Hinblick auf die Produktion von Phenolsäuren wurde in *P. vulgatus* ein neuartiger Stoffwechselweg postuliert und analysiert. Ausgehend von Phenylalanin ist *P. vulgatus* theoretisch in der Lage, Phenylelessigsäure unter Freisetzung von ATP zu generieren. Dieser Stoffwechselweg konnte durch die *in vitro*-Charakterisierung der beteiligten Enzyme bestätigt werden. Um diesen Stoffwechselweg direkt im Organismus nachzuweisen wurde *P. vulgatus* mit Phenylalanin als Substrat kultiviert. So ließ sich die Bildung von Phenylelessigsäure bestätigen und die Funktionalität des Stoffwechselzweigs eindeutig beweisen. Es folgten weitere Versuche um die Produktion von Phenylelessigsäure zusätzlich zu erhöhen. Die homologe Überproduktion der Aminotransferase BVU_2275 in *P. vulgatus* steigerte die Menge an Phenylalanin, welche maximal in den Stoffwechselzweig eingeschleust werden konnte. Dies führte zu einer sechsfach höheren Ausbeute an Phenylelessigsäure.
5. Anhand von bioinformatischen Analysen konnte in *P. vulgatus* eine Histidin-Ammoniak-Lyase (BVU_1010) identifiziert werden, welche sich potenziell für die biotechnologische Produktion von Zimt- und Cumarsäure einsetzen lässt. Die Charakterisierung des Enzyms bestätigte, dass es sich nicht um eine Histidin-, sondern um eine Tyrosin-Ammoniak-Lyase handelt. Diese Enzymklasse wird für die industrielle Produktion von Cumarsäure bereits eingesetzt, dementsprechend wurde das Potenzial von BVU_1010 mit den Eigenschaften bereits beschriebener Tyrosin-Ammoniak-Lyasen verglichen. Die kinetischen Charakteristika von BVU_1010 lagen im Bereich bekannter Tyrosin-Ammoniak-Lyasen. Eine homologe Überproduktion von BVU_1010 in *P. vulgatus* führte jedoch nicht zu einer nachweisbaren Produktion von Cumarsäure.
6. Es wurden Versuche unternommen die bestehenden genetischen Systeme für *Bacteroides* und *Phocaeicola*-Spezies zu nutzen um die beiden Bilin-abhängigen Fluoreszenzmarker UnaG und IFP2.0 für die Sauerstoff-unabhängige Fluoreszenzmarkierung von Proteinen in *P. vulgatus* zu verwenden. Mithilfe des Shuttle-Vektors pG106 wurde die cytoplasmatische Lactat-Dehydrogenase BVU_2499 mit N-terminaler UnaG oder IFP2.0 Markierung homolog in *P. vulgatus* überproduziert. Die Auswertung erfolgte mittels lasergestützter Fluoreszenz-Mikroskopie und es konnte bestätigt werden, dass sich beide Fluoreszenzmarker für die Anwendung in *P. vulgatus* eignen.

6. Literaturverzeichnis

- Alexander, M., & Turnbaugh, P. J. (2020). Deconstructing mechanisms of diet-microbiome-immune interactions. *Immunity*, 53(2), 264-276.
- Angelidaki, I., Karakashev, D., Batstone, D. J., Plugge, C. M., & Stams, A. J. (2011). Biomethanation and its potential. *Methods in enzymology*, 494, 327–351.
- Anhê, F. F., Roy, D., Pilon, G., Dudonné, S., Matamoros, S., Varin, T. V., Garofalo, C., Moine, Q., Desjardins, Y., Levy, E., & Marette, A. (2015). A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut*, 64(6), 872–883.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D. R., Fernandes, G. R., Tap, J., Bruls, T., Batto, J. M., Bertalan, M., Borruel, N., Casellas, F., Fernandez, L., Gautier, L., Hansen, T., Hattori, M., Hayashi, T., Kleerebezem, M., Kurokawa, K., Leclerc, M., Levenez, F., Manichanh, C., Nielsen, H. B., Nielsen, T., Pons, N., Poulain, J., Qin, J., Sicheritz-Ponten, T., Tims, S., Torrents, D., Ugarte, E., Zoetendal, E. G., Wang, J., Guarner, F., Pedersen, O., de Vos W. M., Brunak, S., Doré, J., Antolín, M., Artiguenave, F., Blottiere, H. M., Almeida, M., Brechot, C., Cara, C., Chervaux, C., Cultrone, A., Delorme, C., Denariáz, G., Dervyn, R., Foerstner, K. U., Friss, C., van de Guchte, M., Guedon, E., Haimet, F., Huber, W., van Hylckama-Vlieg, J., Jamet, A., Juste, C., Kaci, G., Knol, J., Lakhdari, O., Layec, S., Le Roux, K., Maguin, E., Mérieux, A., Melo Minardi, R., M'rini, C., Muller, J., Oozeer, R., Parkhill, J., Renault, P., Rescigno, M., Sanchez, N., Sunagawa, S., Torrejon, A., Turner, K., Vandemeulebrouck, G., Varela, E., Winogradsky, Y., Zeller, G., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), 174-180.
- Atkinson, C., Frankenfeld, C. L., & Lampe, J. W. (2005). Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health. *Experimental biology and medicine*, 230(3), 155-170.
- Aura, A. M., O'Leary, K. A., Williamson, G., Ojala, M., Bailey, M., Puupponen-Pimiä, R., Nuutila, A. M., Oksman-Caldentey, K. M., & Poutanen, K. (2002). Quercetin derivatives are deconjugated and converted to hydroxyphenylacetic acids but not methylated by human fecal flora in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(6), 1725–1730.
- Aziz, Q., Doré, J., Emmanuel, A., Guarner, F., & Quigley, E. M. M. (2013). Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterology & Motility*, 25(1), 4-15.
- Babendure, J. R., Adams, S. R., & Tsien, R. Y. (2003). Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *Journal of the American Chemical Society*, 125(48), 14716-14717.
- Bain, J. D., Diala, E. S., Glabe, C. G., Dix, T. A., & Chamberlin, A. R. (1989). Biosynthetic site-specific incorporation of a non-natural amino acid into a polypeptide. *Journal of the American Chemical Society*, 111(20), 8013-8014.
- Bais, H. P., Vepachedu, R., Gilroy, S., Callaway, R. M., & Vivanco, J. M. (2003). Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science*, 301(5638), 1377-1380.
- Bassalo, M. C., Garst, A. D., Halweg-Edwards, A. L., Grau, W. C., Domaille, D. W., Mutalik, V. K., Arkin, A. P., & Gill, R. T. (2016). Rapid and Efficient One-Step Metabolic Pathway Integration in *E. coli*. *ACS synthetic biology*, 5(7), 561–568.

6. Literaturverzeichnis

- Bauer, K., Garbe, D., & Surburg, H. (2008). Common fragrance and flavor materials: preparation, properties and uses. *John Wiley & Sons*.
- Baughn, A. D., & Malmay, M. H. (2004). The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*, 427(6973), 441-444.
- Beatty, K. E., Liu, J. C., Xie, F., Dieterich, D. C., Schuman, E. M., Wang, Q., & Tirrell, D. A. (2006). Fluorescence visualization of newly synthesized proteins in mammalian cells. *Angewandte Chemie*, 118(44), 7524-7527.
- Bell, S. M., Wendt, D. J., Zhang, Y., Taylor, T. W., Long, S., Tsuruda, L., Zhao, B., Laipis, P., & Fitzpatrick, P. A. (2017). Formulation and PEGylation optimization of the therapeutic PEGylated phenylalanine ammonia lyase for the treatment of phenylketonuria. *PLoS one*, 12(3), e0173269.
- Bencivenga-Barry, N. A., Lim, B., Herrera, C. M., Trent, M. S., & Goodman, A. L. (2020). Genetic manipulation of wild human gut *Bacteroides*. *Journal of Bacteriology*, 202(3), 10-1128.
- Benkrief, R., Ranarivelo, Y., Skaltsounis, A. L., Tillequin, F., Koch, M., Pusset, J., & Sévenet, T. (1998). Monoterpene alkaloids, iridoids and phenylpropanoid glycosides from *Osmanthus austrocaledonica*. *Phytochemistry*, 47(5), 825-832.
- Bjursell, M. K., Martens, E. C., & Gordon, J. I. (2006). Functional genomic and metabolic studies of the adaptations of a prominent adult human gut symbiont, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to the suckling period. *Journal of biological chemistry*, 281(47), 36269-36279.
- Blomfield, I. C., Vaughn, V., Rest, R. F., & Eisenstein, B. I. (1991). Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Molecular microbiology*, 5(6), 1447-1457.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8(2), 93-99.
- Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2011). Mechanistic insight into polysaccharide use within the intestinal microbiota. *Gut microbes*, 2(2), 86-90.
- Bourgeau, G., & Mayrand, D. (1983). Phenylacetic acid production by *Bacteroides gingivalis* from phenylalanine and phenylalanine-containing peptides. *Canadian journal of microbiology*, 29(9), 1184-1189.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Tóth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L. G., Kundu, P., Gulyás, B., Halldin, C., Hultenby, K., Nilsson, H., Hebert, H., Volpe, B. T., Diamond, B., & Pettersson, S. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Science translational medicine*, 6(263), 263ra158-263ra158.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, 56(11), 317-333.
- Broderick, J. B., Duderstadt, R. E., Fernandez, D. C., Wojtuszewski, K., Henshaw, T. F., & Johnson, M. K. (1997). Pyruvate formate-lyase activating enzyme is an iron-sulfur protein. *Journal of the American Chemical Society*, 119(31), 7396-7397.
- Buckel, W., & Golding, B. T. (2006). Radical enzymes in anaerobes. *Annual review of microbiology*, 60, 27-49.
- Butchko, H. H., Stargel, W. W., Comer, C. P., Mayhew, D. A., Benninger, C., Blackburn, G. L., de Sonnevile, L. M., Geha, R. S., Hertelendy, Z., Koestner, A., Leon, A. S., Liepa, G. U., McMartin, K. E., Mendenhall, C. L., Munro, I. C., Novotny, E. J., Renwick, A. G., Schiffman, S. S., Schomer,

6. Literaturverzeichnis

- D. L., Shaywitz, B. A., Spiers, P. A., Tephly, T. R., Thomas, J. A. & Trefz, F. K. (2002). Aspartame: review of safety. *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP*, 35(2 Pt 2), S1–S93.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143-155.
- Cabrol, L., Urra, J., Rosenkranz, F., Kroff, P. A., Plugge, C. M., Lesty, Y., & Chamy, R. (2015). Influence of phenylacetic acid pulses on anaerobic digestion performance and archaeal community structure in WWTP sewage sludge digesters. *Water Science and Technology*, 71(12), 1790-1799.
- Camm, E. L., & Towers, G. N. (1973). Phenylalanine ammonia lyase. *Phytochemistry*, 12(5), 961-973.
- Canı P. D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A. M., Delzenne N. M. & Burcelin, R. (2008). Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 57, 1470–1481. 10.2337/db07-1403
- Carrasco-Pozo, C., Gotteland, M., Castillo, R. L., & Chen, C. (2015). 3, 4-Dihydroxyphenylacetic acid, a microbiota-derived metabolite of quercetin, protects against pancreatic β -cells dysfunction induced by high cholesterol. *Experimental Cell Research*, 334(2), 270-282.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263(5148), 802-805.
- Charbon, G., Brustad, E., Scott, K. A., Wang, J., Løbner-Olesen, A., Schultz, P. G., Jacobs-Wagner, C., & Chapman, E. (2011). Subcellular protein localization by using a genetically encoded fluorescent amino acid. *Chembiochem: a European journal of chemical biology*, 12(12), 1818–1821.
- Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M., Del'Homme, C., & Bernalier-Donadille, A. (2007). Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces. *FEMS microbiology ecology*, 61(1), 121-131.
- Chatzidaki-Livanis, M., Geva-Zatorsky, N., & Comstock, L. E. (2016). *Bacteroides fragilis* type VI secretion systems use novel effector and immunity proteins to antagonize human gut Bacteroidales species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), 3627-3632.
- Chemler, J. A., & Koffas, M. A. (2008). Metabolic engineering for plant natural product biosynthesis in microbes. *Current opinion in biotechnology*, 19(6), 597-605.
- Chen, T., Long, W., Zhang, C., Liu, S., Zhao, L., & Hamaker, B. R. (2017). Fiber-utilizing capacity varies in *Prevotella*-versus *Bacteroides*-dominated gut microbiota. *Scientific reports*, 7(1), 2594.
- Cheng, M., & Ning, K. (2019). Stereotypes about enterotype: the old and new ideas. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17(1), 4-12.
- Chia, H. E., Zuo, T., Koropatkin, N. M., Marsh, E. N. G., & Biteen, J. S. (2020). Imaging living obligate anaerobic bacteria with bilin-binding fluorescent proteins. *Current research in microbial sciences*, 1, 1–6.
- Choct, M. (1997). Feed non-starch polysaccharides: chemical structures and nutritional significance. *Feed milling international*, 191(1), 13-26.
- Christ, S. E. (2003). Asbjorn Folling and the Discovery of Phenylketonuria. *Journal of the History of the Neurosciences*, 12(1), 44-54.
- Clifford, M. N. (2004). Diet-derived phenols in plasma and tissues and their implications for health. *Planta medica*, 70(12), 1103-1114.

6. Literaturverzeichnis

- Colegrave, N., & Buckling, A. (2005). Microbial experiments on adaptive landscapes. *Bioessays*, 27(11), 1167-1173.
- Collins, S. M., Surette, M., & Bercik, P. (2012). The interplay between the intestinal microbiota and the brain. *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), 735-742.
- Colnet, B., Sieber, C. M., Perraudeau, F., & Leclerc, M. (2021). FiberGrowth Pipeline: A Framework Toward Predicting Fiber-Specific Growth From Human Gut Bacteroidetes Genomes. *Frontiers in Microbiology*, 12, 632567.
- Cooper, A. J., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1996). The erythromycin resistance gene from the *Bacteroides* conjugal transposon Tcr Emr 7853 is nearly identical to ermG from *Bacillus sphaericus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(2), 506-508.
- Crain, A. V., & Broderick, J. B. (2014). Pyruvate formate-lyase and its activation by pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 289(9), 5723-5729.
- Cui, J. D., Qiu, J. Q., Fan, X. W., Jia, S. R., & Tan, Z. L. (2014). Biotechnological production and applications of microbial phenylalanine ammonia lyase: a recent review. *Critical reviews in biotechnology*, 34(3), 258-268.
- Dao, M. C., Everard, A., Aron-Wisniewsky, J., Sokolovska, N., Prifti, E., Verger, E. O., Kayser, B. D., Levenez, F., Chilloux, J., Hoyles, L., MICRO-Obes Consortium, Dumas, M. E., Rizkalla, S. W., Doré, J., Cani, P. D., & Clément, K. (2016). Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: relationship with gut microbiome richness and ecology. *Gut*, 65(3), 426-436.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, V. A., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J. & Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559-563.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly) phenolics in human health: structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants & redox signaling*, 18(14), 1818-1892.
- Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Chambon, C., Yeoman, C. J., Berg Miller, M. E., Fields, C. J., Martens, E., Terrapon, N., Henrissat, B., White, B. A., & Mosoni, P. (2016). Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1A(T) involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. *BMC genomics*, 17, 326.
- Di Bartolomeo, F., Startek, J. B., & Van den Ende, W. (2013). Prebiotics to fight diseases: reality or fiction? *Phytotherapy Research*, 27(10), 1457-1473.
- Di Lorenzo, F., Pither, M. D., Martufi, M., Scarinci, I., Guzmán-Caldentey, J., Łakomiec, E., Jachymek, W., Bruijns, S. C. M., Santamaría, S. M., Frick, J. S., van Kooyk, Y., Chiodo, F., Silipo, A., Bernardini, M. L., & Molinaro, A. (2020). Pairing *Bacteroides vulgatus* LPS structure with its immunomodulatory effects on human cellular models. *ACS Central Science*, 6(9), 1602-1616.
- Dinan, T. G., Stilling, R. M., Stanton, C., & Cryan, J. F. (2015). Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior. *Journal of psychiatric research*, 63, 1-9.
- Dolgosheina, E. V., Jeng, S. C., Panchapakesan, S. S., Cojocaru, R., Chen, P. S., Wilson, P. D., Hawkins, N., Wiggins, P. A., & Unrau, P. J. (2014). RNA mango aptamer-fluorophore: a bright, high-affinity complex for RNA labeling and tracking. *ACS chemical biology*, 9(10), 2412-2420.

- Domínguez-Avila, J. A., Villa-Rodriguez, J. A., Montiel-Herrera, M., Pacheco-Ordaz, R., Roopchand, D. E., Venema, K., & González-Aguilar, G. A. (2021). Phenolic Compounds Promote Diversity of Gut Microbiota and Maintain Colonic Health. *Digestive diseases and sciences*, 66(10), 3270–3289.
- Dudareva, N., Pichersky, E., & Gershenzon, J. (2004). Biochemistry of plant volatiles. *Plant physiology*, 135(4), 1893-1902.
- Dueñas, M., Muñoz-González, I., Cueva, C., Jiménez-Girón, A., Sánchez-Patán, F., Santos-Buelga, C., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2015). A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols. *BioMed research international*, 2015, 850902.
- Duncan, S. H., Belenguer, A., Holtrop, G., Johnstone, A. M., Flint, H. J., & Lobley, G. E. (2007). Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Applied and environmental microbiology*, 73(4), 1073-1078.
- Edelstein, A. D., Tsuchida, M. A., Amodaj, N., Pinkard, H., Vale, R. D., & Stuurman, N. (2014). Advanced methods of microscope control using µManager software. *Journal of biological methods*, 1(2).
- Eggerth, A. H., & Gagnon, B. H. (1933). The Bacteroides of Human Feces. *Journal of bacteriology*, 25(4), 389–413.
- Englyst, K. N., Liu, S., & Englyst, H. N. (2007). Nutritional characterization and measurement of dietary carbohydrates. *European journal of clinical nutrition*, 61(1), S19-S39.
- Ernits, K., Eek, P., Lukk, T., Visnapuu, T., & Alamäe, T. (2019). First crystal structure of an endo-levanase—the BT1760 from a human gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Scientific Reports*, 9(1), 8443.
- Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., & Schrader, J. (2002). Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied microbiology and biotechnology*, 59, 1-8.
- Etcheberria, U., Arias, N., Boqué, N., Macarulla, M. T., Portillo, M. P., Martínez, J. A., & Milagro, F. I. (2015). Reshaping faecal gut microbiota composition by the intake of trans-resveratrol and quercetin in high-fat sucrose diet-fed rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(6), 651-660.
- Etcheberria, U., Fernández-Quintela, A., Milagro, F. I., Aguirre, L., Martínez, J. A., & Portillo, M. P. (2013). Impact of polyphenols and polyphenol-rich dietary sources on gut microbiota composition. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(40), 9517-9533.
- Faith, J. J., Guruge, J. L., Charbonneau, M., Subramanian, S., Seedorf, H., Goodman, A. L., Clemente, J. C., Knight, R., Heath, A. C., Leibel, R. L., Rosenbaum, M., & Gordon, J. I. (2013). The long-term stability of the human gut microbiota. *Science (New York, N.Y.)*, 341(6141), 1237439.
- Fenaroli, G., & Burdock, G. A. (1975). Fenaroli's handbook of flavor ingredients. CRC Press, 2004, ISBN 978-1-4200-3787-6, S. 618
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., & Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical reviews in food science and nutrition*, 41(5), 353-362.
- Fletcher, H. M., Schenkein, H. A., Morgan, R. M., Bailey, K. A., Berry, C. R., & Macrina, F. L. (1995). Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W83 mutant defective in the prtH gene. *Infection and immunity*, 63(4), 1521–1528.

6. Literaturverzeichnis

- Flint, H. J., Bayer, E. A., Rincon, M. T., Lamed, R., & White, B. A. (2008). Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 121-131.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., & Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut microbes*, 3(4), 289–306.
- Fonseca, A. C., Lima, M. S., Sousa, A. F., Silvestre, A. J., Coelho, J. F., & Serra, A. C. (2019). Cinnamic acid derivatives as promising building blocks for advanced polymers: synthesis, properties and applications. *Polymer Chemistry*, 10(14), 1696-1723.
- Franke, T., & Deppenmeier, U. (2018). Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular microbiology*, 109(4), 528–540.
- Frey, M., Rothe, M., Wagner, A. F., & Knappe, J. (1994). Adenosylmethionine-dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate-lyase by abstraction of the glycine C-2 pro-S hydrogen atom. Studies of [2H] glycine-substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site. *Journal of Biological Chemistry*, 269(17), 12432-12437.
- Fritz, R. R., Hodgins, D. S., & Abell, C. W. (1976). Phenylalanine ammonia lyase. Induction and purification from yeast and clearance in mammals. *Journal of Biological Chemistry*, 251(15), 4646-4650.
- Gaietta, G., Deerinck, T. J., Adams, S. R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D. W., Sosinsky, G. E., Tsien, R. Y., & Ellisman, M. H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science (New York, N.Y.)*, 296(5567), 503–507.
- García-Bayona, L., & Comstock, L. E. (2019). Streamlined genetic manipulation of diverse *Bacteroides* and *Parabacteroides* isolates from the human gut microbiota. *MBio*, 10(4), 10-1128.
- García-Bayona, L., Coyne, M. J., Hantman, N., Montero-Llopis, P., Von, S. S., Ito, T., Malamy, M. H., Basler, M., Barquera, B., & Comstock, L. E. (2020). Anaerobic growth enables direct visualization of dynamic cellular processes in human gut symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(39), 24484–24493.
- García-López, M., Meier-Kolthoff, J. P., Tindall, B. J., Gronow, S., Woyke, T., Kyrpides, N. C., Hahnke, R. L., & Göker, M. (2019). Analysis of 1,000 type-strain genomes improves taxonomic classification of Bacteroidetes. *Frontiers in microbiology*, 10, 2083.
- Gardner, R. G., Russell, J. B., Wilson, D. B., Wang, G. R., & Shoemaker, N. B. (1996). Use of a modified *Bacteroides-Prevotella* shuttle vector to transfer a reconstructed beta-1, 4-D-endoglucanase gene into *Bacteroides uniformis* and *Prevotella ruminicola* B (1) 4. *Applied and environmental microbiology*, 62(1), 196-202.
- Gautier, A., Juillerat, A., Heinis, C., Corrêa, I. R., Kindermann, M., Beaufls, F., & Johnsson, K. (2008). An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chemistry & biology*, 15(2), 128-136.
- Ge, T., Yang, J., Zhou, S., Wang, Y., Li, Y., Tong, X. (2020): The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 365.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L., & Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, 352(6285), 539-544.
- Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P. D., Verbeke, K., & Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement

- on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502.
- Gill, C. I., McDougall, G. J., Glidewell, S., Stewart, D., Shen, Q., Tuohy, K., Dobbin, A., Boyd, A., Brown, E., Haldar, S., & Rowland, I. R. (2010). Profiling of phenols in human fecal water after raspberry supplementation. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(19), 10389–10395.
- Giroux, A., Nadeau, C., & Han, Y. (2000). Synthesis of phenylacetic acids under rhodium-catalyzed carbonylation conditions. *Tetrahedron Letters*, 41(40), 7601-7604.
- Goh, Y. J., Azcárate-Peril, M. A., O'Flaherty, S., Durmaz, E., Valence, F., Jardin, J., Lortal, S., & Klaenhammer, T. R. (2009). Development and application of a *upp*-based counterselective gene replacement system for the study of the S-layer protein SlpX of *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Applied and environmental microbiology*, 75(10), 3093–3105.
- Gorkiewicz, G., & Moschen, A. (2018). Gut microbiome: a new player in gastrointestinal disease. *Virchows Archiv*, 472(1), 159-172.
- Gracin, S., & Rasmuson, Å. C. (2002). Solubility of phenylacetic acid, p-hydroxyphenylacetic acid, p-aminophenylacetic acid, p-hydroxybenzoic acid, and ibuprofen in pure solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 47(6), 1379-1383.
- Graf, B. A., Mullen, W., Caldwell, S. T., Hartley, R. C., Duthie, G. G., Lean, M. E., Crozier, A., & Edwards, C. A. (2005). Disposition and metabolism of [2-14C]quercetin-4'-glucoside in rats. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 33(7), 1036–1043.
- Griffin, B. A., Adams, S. R., & Tsien, R. Y. (1998). Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells. *Science*, 281(5374), 269-272.
- Grimm, J. B., Muthusamy, A. K., Liang, Y., Brown, T. A., Lemon, W. C., Patel, R., Lu, R., Macklin, J. J., Keller, P. J., Ji, N., & Lavis, L. D. (2017). A general method to fine-tune fluorophores for live-cell and in vivo imaging. *Nature methods*, 14(10), 987–994.
- Grondin, J. M., Tamura, K., Déjean, G., Abbott, D. W., & Brumer, H. (2017). Polysaccharide utilization loci: fueling microbial communities. *Journal of bacteriology*, 199(15), 10-1128.
- Guiney Jr, D. G. (1984a). Promiscuous transfer of drug resistance in gram-negative bacteria. *Journal of Infectious Diseases*, 149(3), 320-329.
- Guiney Jr, D. G., Hasegawa, P., & Davis, C. E. (1984b). Homology between clindamycin resistance plasmids in *Bacteroides*. *Plasmid*, 11(3), 268-271.
- Guiney, D. G., Hasegawa, P., & Davis, C. E. (1984c). Plasmid transfer from *Escherichia coli* to *Bacteroides fragilis*: differential expression of antibiotic resistance phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(22), 7203-7206.
- Gutiérrez-Díaz, I., Fernández-Navarro, T., Salazar, N., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., López, P., Suárez, A., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M., & González, S. (2018). Could Fecal Phenylacetic and Phenylpropionic Acids Be Used as Indicators of Health Status? *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(40), 10438–10446.
- Gutiérrez-Díaz, I., Fernández-Navarro, T., Salazar, N., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., de Andres-Galiana, E. J., Fernández-Martínez, J. L., de Los Reyes-Gavilán, C. G., Gueimonde, M., & González, S. (2017). Adherence to a Mediterranean Diet Influences the Fecal Metabolic Profile of Microbial-Derived Phenolics in a Spanish Cohort of Middle-Age and Older People. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(3), 586–595.

- Hamady, M., & Knight, R. (2009). Microbial community profiling for human microbiome projects: tools, techniques, and challenges. *Genome research*, 19(7), 1141-1152.
- Haslam, E. (1993). Shikimic acid: metabolism and metabolites. (John Wiley & Sons (1993)).
- Hayashi, H., Shibata, K., Sakamoto, M., Tomita, S., & Benno, Y. (2007). *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(5), 941-946.
- Heyer, R., Schallert, K., Siewert, C., Kohrs, F., Greve, J., Maus, I., Klang, J., Klocke, M., Heiermann, M., Hoffmann, M., Püttker, S., Calusinska, M., Zoun, R., Saake, G., Benndorf, D., & Reichl, U. (2019). Metaproteome analysis reveals that syntrophy, competition, and phage-host interaction shape microbial communities in biogas plants. *Microbiome*, 7(1), 69.
- Hill, M. J. (1997). Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 6(2), S43-S45.
- Hollinshead, W., He, L., & Tang, Y. J. (2019). ¹³C-Fingerprinting and Metabolic Flux Analysis of Bacterial Metabolisms. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1927, 215–230.
- Hollman, P. C., de Vries, J. H., van Leeuwen, S. D., Mengelers, M. J., & Katan, M. B. (1995). Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *The American journal of clinical nutrition*, 62(6), 1276-1282.
- Horecker, B. L., Gibbs, M., Klenow, H., Smyrniotis, P. Z. (1954): The mechanism of pentosephosphate conversion to hexose monophosphate. I. With a liver enzyme preparation. *Journal of Biological Chemistry*, 207 (1), 393-403.
- Hsu, C. L., & Yen, G. C. (2008). Phenolic compounds: evidence for inhibitory effects against obesity and their underlying molecular signaling mechanisms. *Molecular nutrition & food research*, 52(1), 53-61.
- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157(6), 1262-1278.
- Hu, J., Chen, J., Xu, X., Hou, Q., Ren, J., & Yan, X. (2023). Gut microbiota-derived 3-phenylpropionic acid promotes intestinal epithelial barrier function via AhR signaling. *Microbiome*, 11(1), 1-23.
- Hua, D., & Xu, P. (2011). Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. *Biotechnology advances*, 29(6), 654-660.
- Huang, W. Y., Cai, Y. Z., & Zhang, Y. (2009). Natural phenolic compounds from medicinal herbs and dietary plants: potential use for cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 62(1), 1-20.
- Human Microbiome Project Consortium (2012) Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *nature*, 2012, 486. Jg., Nr. 7402, S. 207-214.
- Huttenlocher, P. R. (2000). The neuropathology of phenylketonuria: human and animal studies. *European journal of pediatrics*, 159, S102-S106.
- Hydery, T., & Coppenrath, V. A. (2019). A Comprehensive Review of Pegvaliase, an Enzyme Substitution Therapy for the Treatment of Phenylketonuria. *Drug target insights*, 13, 1177392819857089.
- Ihekweazu, F. D., & Versalovic, J. (2018). Development of the pediatric gut microbiome: impact on health and disease. *The American journal of the medical sciences*, 356(5), 413-423.
- Ihekweazu, F. D., & Versalovic, J. (2018). Development of the pediatric gut microbiome: impact on health and disease. *The American journal of the medical sciences*, 356(5), 413-423.

6. Literaturverzeichnis

- Ito, T., Gallegos, R., Matano, L. M., Butler, N. L., Hantman, N., Kaili, M., Coyne, M. J., Comstock, L. E., Malamy, M. H., & Barquera, B. (2020). Genetic and biochemical analysis of anaerobic respiration in *Bacteroides fragilis* and its importance *In Vivo*. *MBio*, 11(1), 10-1128.
- Jaganath, I. B., Mullen, W., Lean, M. E., Edwards, C. A., & Crozier, A. (2009). In vitro catabolism of rutin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(8), 1180-1189.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G., & Wohlleben, W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of bacteriology*, 174(16), 5462-5465.
- Jendresen, C. B., Stahlhut, S. G., Li, M., Gaspar, P., Siedler, S., Förster, J., Maury, J., Borodina, I., & Nielsen, A. T. (2015). Highly Active and Specific Tyrosine Ammonia-Lyases from Diverse Origins Enable Enhanced Production of Aromatic Compounds in Bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 81(13), 4458–4476.
- Jenner, A. M., Rafter, J., & Halliwell, B. (2005). Human fecal water content of phenolics: the extent of colonic exposure to aromatic compounds. *Free Radical Biology and Medicine*, 38(6), 763-772.
- Jiménez-Girón, A., Muñoz-González, I., Martín-Álvarez, P. J., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolomé, B. (2014). Towards the fecal metabolome derived from moderate red wine intake. *Metabolites*, 4(4), 1101-1118.
- Jiménez-Girón, A., Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Muñoz-González, I., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Martín-Álvarez, P. J., Murri, M., Tinahones, F. J., Andrés-Lacueva, C., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). Comparative study of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after intake of gin, red wine, and dealcoholized red wine. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(16), 3909–3915.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.
- Joglekar, P., Sonnenburg, E. D., Higginbottom, S. K., Earle, K. A., Morland, C., Shapiro-Ward, S., Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2018). Genetic Variation of the SusC/SusD Homologs from a Polysaccharide Utilization Locus Underlies Divergent Fructan Specificities and Functional Adaptation in *Bacteroides thetaiotaomicron* Strains. *mSphere*, 3(3), e00185-18.
- Johnson, J. R. (1942). The Perkin Reaction and Related Reactions. *Organic reactions*, 1, 210-265.
- Jones, K. R., Belvin, B. R., Macrina, F. L., & Lewis, J. P. (2020). Sequence and characterization of shuttle vectors for molecular cloning in *Porphyromonas*, *Bacteroides* and related bacteria. *Molecular oral microbiology*, 35(4), 181-191.
- Jossek, R., Bongaerts, J., & Sprenger, G. A. (2001). Characterization of a new feedback-resistant 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase AroF of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 202(1), 145-148.
- Kabaivanova, L., Hubenov, V., Dimitrova, L., Simeonov, I., Wang, H., & Petrova, P. (2022). Archaeal and bacterial content in a two-stage anaerobic system for efficient energy production from agricultural wastes. *Molecules*, 27(5), 1512.
- Kaczmarek, F. S., & Coykendall, A. L. (1980). Production of phenylacetic acid by strains of *Bacteroides asaccharolyticus* and *Bacteroides gingivalis* (sp. nov.). *Journal of Clinical Microbiology*, 12(2), 288-290.

6. Literaturverzeichnis

- Kaiser, P. D., Maier, J., Traenkle, B., Emele, F., & Rothbauer, U. (2014). Recent progress in generating intracellular functional antibody fragments to target and trace cellular components in living cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1844(11), 1933–1942.
- Kaneko, T., Thi, T. H., Shi, D. J., & Akashi, M. (2006). Environmentally degradable, high-performance thermoplastics from phenolic phytomonomers. *Nature materials*, 5(12), 966-970.
- Karunatilaka, K. S., Cameron, E. A., Martens, E. C., Koropatkin, N. M., & Biteen, J. S. (2014). Superresolution imaging captures carbohydrate utilization dynamics in human gut symbionts. *MBio*, 5(6), 10-1128.
- Karunatilaka, K. S., Coupland, B. R., Cameron, E. A., Martens, E. C., Koropatkin, N. K., & Biteen, J. S. (2013, February). Single-molecule imaging can be achieved in live obligate anaerobic bacteria. In *Single Molecule Spectroscopy and Superresolution Imaging VI* (Vol. 8590, pp. 114-120). SPIE.
- Kebir, S., Orfanos, Z., Schuld, J., Linhart, M., Lamberz, C., van der Ven, P. F., Schrickel, J., Kirfel, G., Fürst, D. O., & Meyer, R. (2016). Sarcomeric lesions and remodeling proximal to intercalated disks in overload-induced cardiac hypertrophy. *Experimental cell research*, 348(1), 95–105.
- Keppler, A., Gendreizig, S., Gronemeyer, T., Pick, H., Vogel, H., & Johnsson, K. (2003). A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules *In Vivo*. *Nature biotechnology*, 21(1), 86-89.
- Kim, H., & Park, C. (2017). Enzymatic synthesis of phenethyl ester from phenethyl alcohol with acyl donors. *Enzyme and Microbial Technology*, 100, 37-44.
- Kim, Y., Cho, J. Y., Kuk, J. H., Moon, J. H., Cho, J. I., Kim, Y. C., & Park, K. H. (2004). Identification and antimicrobial activity of phenylacetic acid produced by *Bacillus licheniformis* isolated from fermented soybean, Chungkook-Jang. *Current microbiology*, 48, 312-317.
- King, C. H., Desai, H., Sylvestsky, A. C., LoTempio, J., Ayanyan, S., Carrie, J., Crandall, K. A., Fochtman, B. C., Gasparyan, L., Gulzar, N., Howell, P., Issa, N., Krampis, K., Mishra, L., Morizono, H., Pisegna, J. R., Rao, S., Ren, Y., Simonyan, V., Smith, K., VedBrat, S., Yao, M. D. & Mazumder, R. (2019). Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLoS one*, 14(9), e0206484.
- Kino, Y., Nakayama-Imahiji, H., Fujita, M., Tada, A., Yoneda, S., Murakami, K., Hashimoto, M., Hayashi, T., Okazaki, K., & Kuwahara, T. (2016). Counterselection employing mutated pheS for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species. *Anaerobe*, 42, 81–88.
- Knappe, J., Blaschkowski, H. P., Gröbner, P., & Schmitt, T. (1974). Pyruvate formate-lyase of *Escherichia coli*: the acetyl-enzyme intermediate. *European journal of biochemistry*, 50(1), 253–263.
- Ko, S., Kwon, J., & Shim, S. H. (2021). Enhanced UnaG With Minimal Labeling Artifact for Single-Molecule Localization Microscopy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 647590.
- Korkina, L., Kostyuk, V., De Luca, C., & Pastore, S. (2011). Plant phenylpropanoids as emerging anti-inflammatory agents. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(10), 823-835.
- Kostner, D., Peters, B., Mientus, M., Liebl, W., & Ehrenreich, A. (2013). Importance of codB for new codA-based markerless gene deletion in *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97, 8341-8349.
- Koumandou, V. L., & Kossida, S. (2014). Evolution of the FOF1 ATP synthase complex in light of the patchy distribution of different bioenergetic pathways across prokaryotes. *PLoS computational biology*, 10(9), e1003821.

- Kumagai, A., Ando, R., Miyatake, H., Greimel, P., Kobayashi, T., Hirabayashi, Y., Shimogori, T., & Miyawaki, A. (2013). A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell*, 153(7), 1602–1611.
- Kwon, J., Park, J. S., Kang, M., Choi, S., Park, J., Kim, G. T., Lee, C., Cha, S., Rhee, H. W., & Shim, S. H. (2020). Bright ligand-activatable fluorescent protein for high-quality multicolor live-cell super-resolution microscopy. *Nature communications*, 11(1), 273.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., & Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: the contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological reviews*, 198(1), 267–284.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.
- Lakhin, A. V., Tarantul, V. Z., & Gening, L. V. (2013). Aptamers: problems, solutions and prospects. *Acta naturae*, 5(4), 34–43.
- Lamuela-Raventos, R. M., & Quifer-Rada, P. (2016). Effect of dietary polyphenols on cardiovascular risk. *Heart*, 102(17), 1340–1341.
- Le Chatelier, E., Nielsen, T., Qin, J., Prifti, E., Hildebrand, F., Falony, G., Almeida, M., Arumugam, M., Batto, J. M., Kennedy, S., Leonard, P., Li, J., Burgdorf, K., Grarup, N., Jørgensen, T., Brandslund, I., Nielsen, H. B., Juncker, A. S., Bertalan, M., Levenez, F., Pedersen, O. (2013). Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), 541–546.
- Leser, T. D., & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology*, 11(9), 2194–2206.
- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. S., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R. & Gordon, J. I. (2008). Evolution of mammals and their gut microbes. *science*, 320(5883), 1647–1651.
- Ley, R. E., Peterson, D. A., & Gordon, J. I. (2006). Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 124(4), 837–848.
- Li, J., Gálvez, E. J. C., Amend, L., Almási, É., Iljazovic, A., Lesker, T. R., Bielecka, A. A., Schorr, E. M., & Strowig, T. (2021). A versatile genetic toolbox for *Prevotella copri* enables studying polysaccharide utilization systems. *The EMBO journal*, 40(23), e108287.
- Li, L. Y., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1995). Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer genes. *Journal of bacteriology*, 177(17), 4992–4999.
- Limem, I., Guedon, E., Hehn, A., Bourgaud, F., Ghedira, L. C., Engasser, J. M., & Ghoul, M. (2008). Production of phenylpropanoid compounds by recombinant microorganisms expressing plant-specific biosynthesis genes. *Process Biochemistry*, 43(5), 463–479.
- Los, G. V., Encell, L. P., McDougall, M. G., Hartzell, D. D., Karassina, N., Zimprich, C., Wood, M. G., Learish, R., Ohana, R. F., Urh, M., Simpson, D., Mendez, J., Zimmerman, K., Otto, P., Vidugiris, G., Zhu, J., Darzins, A., Klaubert, D. H., Bulleit, R. F., & Wood, K. V. (2008). HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS chemical biology*, 3(6), 373–382.
- Louie, G. V., Bowman, M. E., Moffitt, M. C., Baiga, T. J., Moore, B. S., & Noel, J. P. (2006). Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chemistry & biology*, 13(12), 1327–1338.

- Lück, R., & Deppenmeier, U. (2022). Genetic tools for the redirection of the central carbon flow towards the production of lactate in the human gut bacterium *Phocaeicola (Bacteroides) vulgatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(3), 1211-1225.
- Luengo, J. M., Garcia, J. L., & Olivera, E. R. (2001). The phenylacetyl-CoA catabolon: a complex catabolic unit with broad biotechnological applications. *Molecular microbiology*, 39(6), 1434-1442.
- Lütke-Eversloh, T., & Stephanopoulos, G. (2007). L-tyrosine production by deregulated strains of *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 75, 103-110
- MacDonald, M. J., & D'Cunha, G. B. (2007). A modern view of phenylalanine ammonia lyase. *Biochemistry and Cell Biology*, 85(3), 273-282.
- Macy, J. M., & Probst, I. (1979). The biology of gastrointestinal bacteroides. *Annual Reviews in Microbiology*, 33(1), 561-594.
- Maeda, H., & Dudareva, N. (2012). The shikimate pathway and aromatic amino acid biosynthesis in plants. *Annual review of plant biology*, 63, 73-105.
- Makki, K., Deehan, E. C., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The impact of dietary fiber on gut microbiota in host health and disease. *Cell host & microbe*, 23(6), 705-715.
- Mansoorian, B., Combet, E., Alkhaldy, A., Garcia, A. L., & Edwards, C. A. (2019). Impact of fermentable fibres on the colonic microbiota metabolism of dietary polyphenols rutin and quercetin. *International journal of environmental research and public health*, 16(2), 292.
- Martínez, I., Kim, J., Duffy, P. R., Schlegel, V. L., & Walter, J. (2010). Resistant starches types 2 and 4 have differential effects on the composition of the fecal microbiota in human subjects. *PLoS one*, 5(11), e15046.
- Martínez-Avila, O., Sánchez, A., Font, X., & Barrena, R. (2018). Bioprocesses for 2-phenylethanol and 2-phenylethyl acetate production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(23), 9991-10004.
- Matzke, G. R., Zhanel, G. G., & Guay, D. R. P. (1986). Clinical pharmacokinetics of vancomycin. *Clinical pharmacokinetics*, 11, 257-282.
- Mayrand, D., & Bourgeau, G. (1982). Production of phenylacetic acid by anaerobes. *Journal of Clinical Microbiology*, 16(4), 747-750.
- Mays, Z. J., Mohan, K., Trivedi, V. D., Chappell, T. C., & Nair, N. U. (2020). Directed evolution of *Anabaena variabilis* phenylalanine ammonia-lyase (PAL) identifies mutants with enhanced activities. *Chemical Communications*, 56(39), 5255-5258.
- McCarthy, R. E., Pajean, M., & Salyers, A. A. (1988). Role of starch as a substrate for *Bacteroides vulgatus* growing in the human colon. *Applied and environmental microbiology*, 54(8), 1911-1916.
- Mills, R. H., Dulai, P. S., Vázquez-Baeza, Y., Saucedo, C., Daniel, N., Gerner, R. R., Batachari, L. E., Malfavon, M., Zhu, Q., Weldon, K., Humphrey, G., Carrillo-Terrazas, M., Goldasich, L. D., Bryant, M., Raffatellu, M., Quinn, R. A., Gewirtz, A. T., Chassaing, B., Chu, H., Sandborn, W. J., Dorrestein, P. C., Knight, R. & Gonzalez, D. J. (2022). Multi-omics analyses of the ulcerative colitis gut microbiome link *Bacteroides vulgatus* proteases with disease severity. *Nature microbiology*, 7(2), 262-276.
- Mimee, M., Tucker, A. C., Voigt, C. A., & Lu, T. K. (2015). Programming a Human Commensal Bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to Sense and Respond to Stimuli in the Murine Gut Microbiota. *Cell systems*, 1(1), 62-71.

6. Literaturverzeichnis

- Monagas, M., Khan, N., Andrés-Lacueva, C., Urpí-Sardá, M., Vázquez-Agell, M., Lamuela-Raventós, R. M., & Estruch, R. (2009). Dihydroxylated phenolic acids derived from microbial metabolism reduce lipopolysaccharide-stimulated cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells. *The British journal of nutrition*, 102(2), 201–206.
- Moreno-Indias, I., Sánchez-Alcoholado, L., Pérez-Martínez, P., Andrés-Lacueva, C., Cardona, F., Tinahones, F., & Queipo-Ortuño, M. I. (2016). Red wine polyphenols modulate fecal microbiota and reduce markers of the metabolic syndrome in obese patients. *Food & function*, 7(4), 1775–1787.
- Mosele, J. I., Gosalbes, M. J., Macià, A., Rubió, L., Vázquez-Castellanos, J. F., Jiménez Hernández, N., Moya, A., Latorre, A., & Motilva, M. J. (2015). Effect of daily intake of pomegranate juice on fecal microbiota and feces metabolites from healthy volunteers. *Molecular nutrition & food research*, 59(10), 1942–1953.
- Mott, J. E., Grant, R. A., Ho, Y. S., & Platt, T. (1985). Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the lambda PL promoter: strategies for overproducing transcription termination factor rho. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 82(1), 88–92.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). [21] Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In *Methods in enzymology* (Vol. 155, pp. 335–350). Academic Press.
- Muñoz-González, I., Jiménez-Girón, A., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2013). Profiling of microbial-derived phenolic metabolites in human feces after moderate red wine intake. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(39), 9470–9479.
- Murillo, A. G., & Fernandez, M. L. (2017). The Relevance of Dietary Polyphenols in Cardiovascular Protection. *Current pharmaceutical design*, 23(17), 2444–2452.
- Naphtine, S., Ling, R., Finch, L. K., Jones, J. D., Bell, S., Brierley, I., & Firth, A. E. (2017). Protein-directed ribosomal frameshifting temporally regulates gene expression. *Nature Communications*, 8(1), 15582.
- Nijkamp, K., van Luijk, N., de Bont, J. A., & Wery, J. (2005). The solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12 as host for the production of cinnamic acid from glucose. *Applied microbiology and biotechnology*, 69, 170–177.
- Noren, C. J., Anthony-Cahill, S. J., Griffith, M. C., & Schultz, P. G. (1989). A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*, 244(4901), 182–188.
- O'Hara, A. M., & Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7(7), 688–693.
- Olichon, A., & Surrey, T. (2007). Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 282(50), 36314–36320.
- Paige, J. S., Wu, K. Y., & Jaffrey, S. R. (2011). RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, 333(6042), 642–646.
- Parkar, S. G., Trower, T. M., & Stevenson, D. E. (2013). Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. *Anaerobe*, 23, 12–19.
- Pei, K., Ou, J., Huang, J., & Ou, S. (2016). p-Coumaric acid and its conjugates: dietary sources, pharmacokinetic properties and biological activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(9), 2952–2962.
- Pellicic, V., Reyrat, J. M., & Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene confers sucrose sensitivity on *mycobacteria*. *Journal of bacteriology*, 178(4), 1197–1199.

- Peng, X., Zhang, Z., Zhang, N., Liu, L., Li, S., & Wei, H. (2014). In vitro catabolism of quercetin by human fecal bacteria and the antioxidant capacity of its catabolites. *Food & nutrition research*, 58(1), 23406.
- Peng, Y., Veneziano, S. E., Gillispie, G. D., & Broderick, J. B. (2010). Pyruvate formate-lyase, evidence for an open conformation favored in the presence of its activating enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, 285(35), 27224-27231.
- Pickard, J. M., Zeng, M. Y., Caruso, R., & Núñez, G. (2017). Gut microbiota: Role in pathogen colonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunological reviews*, 279(1), 70-89.
- Pohlentz, J. C., Gallala, N., Kosciow, K., & Hövels, M. (2022). Growth behavior of probiotic microorganisms on levan-and inulin-based fructans. *Journal of Functional Foods*, 99, 105343.
- Pomorski, A., & Krężel, A. (2011). Exploration of biarsenical chemistry--challenges in protein research. *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, 12(8), 1152-1167.
- Porras-Domínguez, J. R., Ávila-Fernández, Á., Rodríguez-Alegría, M. E., Miranda-Molina, A., Escalante, A., González-Cervantes, R., Olvera, C. Munguía, A. L. (2014). Levan-type FOS production using a *Bacillus licheniformis* endolevanase. *Process Biochemistry*, 49(5), 783-790.
- Post, F. J., Allen, A. D., & Reid, T. C. (1967). Simple medium for the selective isolation of *Bacteroides* and related organisms, and their occurrence in sewage. *Applied microbiology*, 15(2), 213-218.
- Putnins, R. F., & Yamada, E. W. (1975). Colorimetric determination of inorganic pyrophosphate by a manual or automated method. *Analytical Biochemistry*, 68(1), 185-195.
- Puurunen, M. K., Vockley, J., Searle, S. L., Sacharow, S. J., Phillips, J. A., 3rd, Denney, W. S., Goodlett, B. D., Wagner, D. A., Blankstein, L., Castillo, M. J., Charbonneau, M. R., Isabella, V. M., Sethuraman, V. V., Riese, R. J., Kurtz, C. B., & Brennan, A. M. (2021). Safety and pharmacodynamics of an engineered *E. coli* Nissle for the treatment of phenylketonuria: a first-in-human phase 1/2a study. *Nature metabolism*, 3(8), 1125-1132.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., & Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50(3), 586-621.
- Rakoff-Nahoum, S., Coyne, M. J., & Comstock, L. E. (2014). An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Current Biology*, 24(1), 40-49.
- Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2017). Amikacin: uses, resistance, and prospects for inhibition. *Molecules*, 22(12), 2267.
- Rechner, A. R., & Kroner, C. (2005). Anthocyanins and colonic metabolites of dietary polyphenols inhibit platelet function. *Thrombosis research*, 116(4), 327-334.
- Rehman, A., Rausch, P., Wang, J., Skieceviciene, J., Kiudelis, G., Bhagalia, K., Amarapurkar, D., Kupcinkas, L., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Baines, J. F. & Ott, S. (2016). Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut*, 65(2), 238-248.
- Roca, A. I., Cox, M. M., & Brenner, S. L. (1990). The RecA Protein: Structure and Functio. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 25(6), 415-456.
- Rodríguez-Daza, M. C., Pulido-Mateos, E. C., Lupien-Meilleur, J., Guyonnet, D., Desjardins, Y., & Roy, D. (2021). Polyphenol-mediated gut microbiota modulation: Toward prebiotics and further. *Frontiers in nutrition*, 8, 689456.

- Rogowski, A., Briggs, J. A., Mortimer, J. C., Tryfona, T., Terrapon, N., Lowe, E. C., Baslé, A., Morland, C., Day, A. M., Zheng, H., Rogers, T. E., Thompson, P., Hawkins, A. R., Yadav, M. P., Henrissat, B., Martens, E. C., Dupree, P., Gilbert, H. J., & Bolam, D. N. (2015). Glycan complexity dictates microbial resource allocation in the large intestine. *Nature communications*, 6, 7481.
- Roopchand, D. E., Carmody, R. N., Kuhn, P., Moskal, K., Rojas-Silva, P., Turnbaugh, P. J., & Raskin, I. (2015). Dietary polyphenols promote growth of the gut bacterium *Akkermansia muciniphila* and attenuate high-fat diet-induced metabolic syndrome. *Diabetes*, 64(8), 2847-2858.
- Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S., Cardoso, M. C., & Leonhardt, H. (2006). Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature methods*, 3(11), 887-889.
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews immunology*, 9(5), 313-323.
- Russell, W. R., Duncan, S. H., Scobbie, L., Duncan, G., Cantlay, L., Calder, A. G., Anderson, S. E., & Flint, H. J. (2013). Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular nutrition & food research*, 57(3), 523-535.
- Russell, W. R., Gratz, S. W., Duncan, S. H., Holtrop, G., Ince, J., Scobbie, L., Duncan, G., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Wallace, R. J., Duthie, G. G., & Flint, H. J. (2011a). High-protein, reduced-carbohydrate weight-loss diets promote metabolite profiles likely to be detrimental to colonic health. *The American journal of clinical nutrition*, 93(5), 1062-1072.
- Russell, W., & Duthie, G. (2011b). Plant secondary metabolites and gut health: the case for phenolic acids. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 70(3), 389-396.
- Rust, M. J., Bates, M., & Zhuang, X. (2006). Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature methods*, 3(10), 793-796.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, N.Y.)*, 239(4839), 487-491.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Nara, M., Kitakata, A., & Kurihara, S. (2018). Functional analysis of arginine decarboxylase gene *speA* of *Bacteroides dorei* by markerless gene deletion. *FEMS microbiology letters*, 365(4), fny003.
- Salaki, J. S., Black, R., Tally, F. P., & Kislak, J. W. (1976). *Bacteroides fragilis* resistant to the administration of clindamycin. *The American journal of medicine*, 60(3), 426-428.
- Salyers, A. A. (1984). *Bacteroides* of the human lower intestinal tract. *Annual review of microbiology*, 38(1), 293-313.
- Salyers, A. A., Shoemaker, N. B., & Li, L. Y. (1995). In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. *Journal of bacteriology*, 177(20), 5727-5731.
- Salyers, A. A., Vercellotti, J. R., West, S. E., & Wilkins, T. D. (1977). Fermentation of mucin and plant polysaccharides by strains of *Bacteroides* from the human colon. *Applied and environmental microbiology*, 33(2), 319-322.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual (No. Ed. 2). *Cold spring harbor laboratory press*.
- Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Moreno-Arribas, M. V., & Bartolome, B. (2011). Determination of microbial phenolic acids in human faeces by UPLC-ESI-TQ MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(6), 2241-2247.

- Sariaslani, F. S. (2007). Development of a combined biological and chemical process for production of industrial aromatics from renewable resources. *Annual review of microbiology*, 61, 51–69.
- Savage, D. C. (1977). Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual review of microbiology*, 31(1), 107-133.
- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases. *Critical reviews in food science and nutrition*, 45(4), 287-306.
- Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., & Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282.
- Sekar, B. S., Li, X., & Li, Z. (2022). Bioproduction of Natural Phenethyl Acetate, Phenylacetic Acid, Ethyl Phenylethylacetate, and Phenethyl Phenylethylacetate from Renewable Feedstock. *ChemSusChem*, 15(9), e202102645.
- Selma, M. V., Espin, J. C., & Tomas-Barberan, F. A. (2009). Interaction between phenolics and gut microbiota: role in human health. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(15), 6485-6501.
- Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body. *PLoS biology*, 14(8), e1002533.
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P., & Dore, J. (2000). Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2263-2266.
- Shimomura, O., Johnson, F. H., & Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of cellular and comparative physiology*, 59(3), 223-239.
- Shoemaker, N. B., Wang, G. R., Stevens, A. M., & Salyers, A. A. (1993). Excision, transfer, and integration of NBU1, a mobilizable site-selective insertion element. *Journal of bacteriology*, 175(20), 6578–6587.
- Shu, X., Royant, A., Lin, M. Z., Aguilera, T. A., Lev-Ram, V., Steinbach, P. A., & Tsien, R. Y. (2009). Mammalian expression of infrared fluorescent proteins engineered from a bacterial phytochrome. *Science*, 324(5928), 804-807.
- Smith, A. H., Zoetendal, E., & Mackie, R. I. (2005). Bacterial mechanisms to overcome inhibitory effects of dietary tannins. *Microbial ecology*, 50, 197-205.
- Smith, C. J., Rogers, M. B., & McKee, M. L. (1992). Heterologous gene expression in *Bacteroides fragilis*. *Plasmid*, 27(2), 141-154.
- Smith, D. M., Daniel, K. G., Wang, Z., Guida, W. C., Chan, T. H., & Dou, Q. P. (2004). Docking studies and model development of tea polyphenol proteasome inhibitors: applications to rational drug design. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 54(1), 58-70.
- Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1996). Enumeration of human colonic bacteria producing phenolic and indolic compounds: effects of pH, carbohydrate availability and retention time on dissimilatory aromatic amino acid metabolism. *Journal of Applied Microbiology*, 81(3), 288-302.
- Smith, E. A., & Macfarlane, G. T. (1997). Formation of phenolic and indolic compounds by anaerobic bacteria in the human large intestine. *Microbial ecology*, 33, 180-188.

- Song, W., Filonov, G. S., Kim, H., Hirsch, M., Li, X., Moon, J. D., & Jaffrey, S. R. (2017). Imaging RNA polymerase III transcription using a photostable RNA–fluorophore complex. *Nature chemical biology*, 13(11), 1187-1194.
- Song, W., Strack, R. L., & Jaffrey, S. R. (2013). Imaging bacterial protein expression using genetically encoded RNA sensors. *Nature methods*, 10(9), 873-875.
- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firbank, S. J., Bolam, D. N., & Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*, 141(7), 1241-1252.
- Stagge, F., Mitronova, G. Y., Belov, V. N., Wurm, C. A., & Jakobs, S. (2013). SNAP-, CLIP- and Halo-tag labelling of budding yeast cells. *PloS one*, 8(10), e78745.
- Stills, H. F. (2012). Polyclonal antibody production. In *The laboratory rabbit, Guinea pig, Hamster, and other rodents* (pp. 259-274). Academic Press.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M.; Campbell, K.; Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer, A. M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J.D., Ralser, M. (2015): The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews of Cambridge Philosophical Society*, 90 (3), 927-63.
- Strand, T. A., Lale, R., Degnes, K. F., Lando, M., & Valla, S. (2014). A new and improved host-independent plasmid system for RK2-based conjugal transfer. *PloS one*, 9(3), e90372.
- Summerer, D., Chen, S., Wu, N., Deiters, A., Chin, J. W., & Schultz, P. G. (2006). A genetically encoded fluorescent amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(26), 9785-9789.
- Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V., Peláez, C., & Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: Resistance and metabolism. *Food microbiology*, 28(7), 1345-1352.
- Tally, F. P., Snyderman, D. R., Gorbach, S. L., & Malamy, M. H. (1979). Plasmid-mediated, transferable resistance to clindamycin and erythromycin in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Infectious Diseases*, 139(1), 83-88.
- Thomason, L. C., Sawitzke, J. A., Li, X., Costantino, N., & Court, D. L. (2014). Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current protocols in molecular biology*, 106, 1.16.1–1.16.39.
- Thomason, L. C., Sawitzke, J. A., Li, X., Costantino, N., & Court, D. L. (2014). Recombineering: genetic engineering in bacteria using homologous recombination. *Current protocols in molecular biology*, 106(1), 1-16.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(9), 4350–4354.
- Traenkle, B., & Rothbauer, U. (2017). Under the microscope: single-domain antibodies for live-cell imaging and super-resolution microscopy. *Frontiers in immunology*, 8, 1030.
- Tressera-Rimbau, A., Arranz, S., Eder, M., & Vallverdú-Queralt, A. (2017). Dietary Polyphenols in the Prevention of Stroke. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017, 7467962.
- Tsien, R. Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 509-544.
- Tsien, R. Y. (2010). The 2009 Lindau Nobel Laureate Meeting: Roger Y. Tsien, Chemistry 2008. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (35), 1575.

- Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., & Gordon, J. I. (2008). Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe*, 3(4), 213-223.
- Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Mahowald, M. A., Magrini, V., Mardis, E. R., & Gordon, J. I. (2006). An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), 1027-1031.
- Tuson, H. H., Foley, M. H., Koropatkin, N. M., & Biteen, J. S. (2018). The starch utilization system assembles around stationary starch-binding proteins. *Biophysical Journal*, 115(2), 242-250.
- van de Wiele, T., Boon, N., Possemiers, S., Jacobs, H., & Verstraete, W. (2007). Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *Journal of applied microbiology*, 102(2), 452–460.
- van Wegberg, A. M. J., MacDonald, A., Ahring, K., Bélanger-Quintana, A., Blau, N., Bosch, A. M., Burlina, A., Campistol, J., Feillet, F., Gizewska, M., Huijbregts, S. C., Kearney, S., Leuzzi, V., Maillot, F., Muntau, A. C., van Rijn, M., Trefz, F., Walter, J. H., & van Spronsen, F. J. (2017). The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet journal of rare diseases*, 12(1), 162.
- Vannelli, T., Qi, W. W., Sweigard, J., Gatenby, A. A., & Sariaslani, F. S. (2007). Production of p-hydroxycinnamic acid from glucose in *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli* by expression of heterologous genes from plants and fungi. *Metabolic engineering*, 9(2), 142-151.
- Vargas-Tah, A., Martínez, L. M., Hernández-Chávez, G., Rocha, M., Martínez, A., Bolívar, F., & Gosset, G. (2015). Production of cinnamic and p-hydroxycinnamic acid from sugar mixtures with engineered *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1-12.
- Virant, D., Traenkle, B., Maier, J., Kaiser, P. D., Bodenhöfer, M., Schmees, C., Vojnovic, I., Pisak-Lukáts, B., Endesfelder, U., & Rothbauer, U. (2018). A peptide tag-specific nanobody enables high-quality labeling for dSTORM imaging. *Nature communications*, 9(1), 930.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular plant*, 3(1), 2-20.
- Vos, M. (2009). Why do bacteria engage in homologous recombination? *Trends in microbiology*, 17(6), 226-232.
- Waidmann, M., Bechtold, O., Frick, J. S., Lehr, H. A., Schubert, S., Dobrindt, U., Loeffler, J., Bohn, E., & Autenrieth, I. B. (2003). *Bacteroides vulgatus* protects against *Escherichia coli*-induced colitis in gnotobiotic interleukin-2-deficient mice. *Gastroenterology*, 125(1), 162-177.
- Walker, A. W., Ince, J., Duncan, S. H., Webster, L. M., Holtrop, G., Ze, X., Brown, D., Stares, M. D., Scott, P., Bergerat, A., Louis, P., McIntosh, F., Johnstone, A. M., Lobley, G. E., Parkhill, J., & Flint, H. J. (2011). Dominant and diet-responsive groups of bacteria within the human colonic microbiota. *The ISME journal*, 5(2), 220–230.
- Walsby, C. J., Hong, W., Broderick, W. E., Cheek, J., Ortillo, D., Broderick, J. B., & Hoffman, B. M. (2002). Electron-nuclear double resonance spectroscopic evidence that S-adenosylmethionine binds in contact with the catalytically active [4Fe– 4S]⁺ cluster of pyruvate formate-lyase activating enzyme. *Journal of the American Chemical Society*, 124(12), 3143-3151.
- Wang, F. Q., Liu, J., Dai, M., Ren, Z. H., Su, C. Y., & He, J. G. (2007). Molecular cloning and functional identification of a novel phenylacetyl-CoA ligase gene from *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical and biophysical research communications*, 360(2), 453-458.

6. Literaturverzeichnis

- Wang, J., Shoemaker, N. B., Wang, G. R., & Salyers, A. A. (2000). Characterization of a *Bacteroides* mobilizable transposon, NBU2, which carries a functional lincomycin resistance gene. *Journal of bacteriology*, 182(12), 3559-3571.
- Wang, J., Xie, J., & Schultz, P. G. (2006). A genetically encoded fluorescent amino acid. *Journal of the American Chemical Society*, 128(27), 8738-8739.
- Wang, X., Brown, I. L., Khaled, D., Mahoney, M. C., Evans, A. J., & Conway, P. L. (2002). Manipulation of colonic bacteria and volatile fatty acid production by dietary high amylose maize (amylomaize) starch granules. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 390-397.
- Wang, X., Conway, P. L., Brown, I. L., & Evans, A. J. (1999). In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), 4848-4854.
- Watts, K. T., Mijts, B. N., Lee, P. C., Manning, A. J., & Schmidt-Dannert, C. (2006). Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family. *Chemistry & biology*, 13(12), 1317-1326.
- Weiland, P. (2010). Biogas production: current state and perspectives. *Applied microbiology and biotechnology*, 85, 849-860.
- Welch, R. A., Jones, K. R., & Macrina, F. L. (1979). Transferable lincosamide-macrolide resistance in *Bacteroides*. *Plasmid*, 2(2), 261-268.
- Wexler, A. G., & Goodman, A. L. (2017). An insider's perspective: *Bacteroides* as a window into the microbiome. *Nature microbiology*, 2(5), 1-11.
- Wexler, A. G., Bao, Y., Whitney, J. C., Bobay, L. M., Xavier, J. B., Schofield, W. B., Barry, N. A., Russell, A. B., Tran, B. Q., Goo, Y. A., Goodlett, D. R., Ochman, H., Mougous, J. D., & Goodman, A. L. (2016). Human symbionts inject and neutralize antibacterial toxins to persist in the gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(13), 3639-3644.
- Wexler, H. M. (2007). *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical microbiology reviews*, 20(4), 593-621.
- Winter, J., Moore, L. H., Dowell Jr, V. R., & Bokkenheuser, V. D. (1989). C-ring cleavage of flavonoids by human intestinal bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 55(5), 1203-1208.
- Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. (1963): Formation of methane by bacterial extracts. *The Journal of biological chemistry*, 238: 2882-2886.
- Wu, J., Sheflyan, G. Y., & Woodard, R. W. (2005). *Bacillus subtilis* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase revisited: resolution of two long-standing enigmas. *Biochemical Journal*, 390(2), 583-590.
- Wu, S. S., & Kaiser, D. (1996). Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5817-5821.
- Wu, S., Zhou, Y., Seet, D., & Li, Z. (2017). Regio- and Stereoselective Oxidation of Styrene Derivatives to Arylalkanoic Acids via One-Pot Cascade Biotransformations. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 359(12), 2132-2141.
- Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., Hooper, L. V., & Gordon, J. I. (2003). A genomic view of the human-*Bacteroides thetaiotaomicron* symbiosis. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5615), 2074-2076.

- Yoshida, N., Emoto, T., Yamashita, T., Watanabe, H., Hayashi, T., Tabata, T., Hoshi, N., Hatano, N., Ozawa, G., Sasaki, N., Mizoguchi, T., Amin, H. Z., Hirota, Y., Ogawa, W., Yamada, T., & Hirata, K. I. (2018). *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis. *Circulation*, 138(22), 2486-2498.
- Yu, D., Gustafson, W. C., Han, C., Lafaye, C., Noirclerc-Savoye, M., Ge, W. P., Thayer, D. A., Huang, H., Kornberg, T. B., Royant, A., Jan, L. Y., Jan, Y. N., Weiss, W. A., & Shu, X. (2014). An improved monomeric infrared fluorescent protein for neuronal and tumour brain imaging. *Nature communications*, 5, 3626.
- Zhang, C., Xing, X. H., & Lou, K. (2005). Rapid detection of a gfp-marked *Enterobacter aerogenes* under anaerobic conditions by aerobic fluorescence recovery. *FEMS microbiology letters*, 249(2), 211-218.
- Zhang, G., Zhang, Q., Wang, J., Zhang, J., & Shang, G. (2023). Characterization of a novel *Escherichia coli* recombineering selection/counterselection cassette. *Biotechnology Letters*, 45(2), 191-197.
- Zhang, L., Liu, Q., Pan, H., Li, X., & Guo, D. (2017). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to high efficient synthesis phenylacetic acid from phenylalanine. *AMB Express*, 7(1), 105.
- Zhang, W., Xu, W., Ni, D., Dai, Q., Guang, C., Zhang, T., & Mu, W. (2019). An overview of levan-degrading enzyme from microbes. *Applied microbiology and biotechnology*, 103, 7891-7902.
- Zhang, Z., Peng, X., Li, S., Zhang, N., Wang, Y., & Wei, H. (2014). Isolation and identification of quercetin degrading bacteria from human fecal microbes. *PLOS one*, 9(3), e90531.
- Zheng, L., Tan, Y., Hu, Y., Shen, J., Qu, Z., Chen, X., Ho, C. L., Leung, E. L., Zhao, W., & Dai, L. (2022). CRISPR/Cas-Based Genome Editing for Human Gut Commensal *Bacteroides* Species. *ACS synthetic biology*, 11(1), 464–472.
- Zheng, W., Xia, Y., Wang, X., Gao, S., Zhou, D., Ravichandran, V., Jiang, C., Tu, Q., Yin, Y., Zhang, Y., Fu, J., Li, R., & Yin, J. (2023). Precise genome engineering in *Pseudomonas* using phage-encoded homologous recombination and the Cascade-Cas3 system. *Nature protocols*, 18(9), 2642–2670.
- Zhou, J., Olson, D. G., Lanahan, A. A., Tian, L., Murphy, S. J. L., Lo, J., & Lynd, L. R. (2015). Physiological roles of pyruvate Ferredoxin oxidoreductase and pyruvate formate-lyase in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-14.
- Zhu, B., Wang, X., & Li, L. (2010). Human gut microbiome: the second genome of human body. *Protein & cell*, 1(8), 718-725.

7. Danksagung

Eine Promotion braucht nicht nur Zeit, wissenschaftliches Gespür und Durchhaltevermögen. Es braucht auch Menschen, die einem besonders in schweren Zeiten helfen weiter an sich zu glauben, um diese Herausforderung durchzustehen. Bei diesen Menschen möchte ich mich hier bedanken.

An erster Stelle geht mein Dank selbstverständlich an Herrn Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Trotz des herausfordernden Themas haben Sie sich immer die Zeit genommen über neue Ansätze und Lösungswege zu diskutieren und so maßgeblich zur Entwicklung meiner wissenschaftlichen Fähigkeiten beigetragen.

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. Christiane Dahl für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für all die Unterstützung bei jeglichen Fragestellungen.

Auch bedanke ich mich bei Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger für die Übernahme der Pflichten als fachnahes und fachfremdes Mitglied meiner Prüfungskommission.

Ich bedanke mich besonders bei den Mitgliedern der AG Deppenmeier, die ich schon lange nicht mehr als Kollegen, sondern als enge Freunde sehe. Danke an Mélanie, Paulina, Natalie & Natalie und Franzl. Egal wie gut oder schlecht die Umstände waren, auf euch kann ich mich immer verlassen. Die Zeit mit Euch im und außerhalb des Labors werde ich in bester Erinnerung behalten und sehr vermissen.

Mein Dank geht an Marcel für all die Motivation, die seine wissenschaftliche Begeisterung während meiner Promotion in mir ausgelöst hat. Dein Input ist immer sehr hilfreich und ich bin wirklich froh darüber, dass wir auch weiterhin zusammenarbeiten. Ich hoffe das „beste Pferd im Stall“ fliegt!

Rebecca, als wir uns damals in der Ausbildung kennengelernt haben dachte bestimmt keiner von uns, dass wir unsere gesamte akademische Laufbahn miteinander teilen werden. Unsere Zusammenarbeit erschien mir oft als unfairer Vorteil gegenüber allen, die diesen Weg alleine gehen mussten. Das Gefühl, sich jederzeit 100% aufeinander verlassen zu können, wird für mich immer beispiellos bleiben. Und die Freundschaft, die daraus entstanden ist, auch. Dafür will ich mich von ganzem Herzen bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei allen Kollegen und Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Biotechnologie für die Hilfsbereitschaft und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken: Meiner Lebensgefährtin Julia, meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Familie für all die Unterstützung, die man in so einer intensiven Zeit dringend braucht. Bei meinen Freunden möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir geholfen haben, in meiner Freizeit den Kopf freizubekommen. Egal ob Zocken, Wakeboarden oder eine Runde Terraforming Mars, mit euch habe ich immer den größten Spaß. Ihr seid alle ein wichtiger Teil meines Lebens.