

**Die Aufklärung eines neuartigen  
Pentose-Stoffwechsels und die Möglichkeit einer  
Homosuccinat-Fermentation in Darmbakterien**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Laura S. Garschagen**

aus Siegburg

Bonn, 2022

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

Tag der Promotion: 04.08.2022

Erscheinungsjahr: 2022

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Garschagen, L. S., Franke, T. & Deppenmeier, U. (2021).** An alternative pentose phosphate pathway in human gut bacteria for the degradation of C5 sugars in dietary fibers. *The FEBS Journal*, 288(6), 1839-1858. doi:10.1111/febs.15511

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Die humane Darmmikrobiota .....	1-2
1.2 Eine ballaststoffreiche Ernährung.....	2-3
1.3 <i>P. copri</i> und die Spezialisierung auf Ballaststoffe .....	3-4
1.4 Biotechnologische Produktion von Succinat.....	4-5
1.5 Das Konzept einer Homosuccinat-Fermentation am Beispiel von <i>P. vulgatus</i> .....	5-6
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	6
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>7</b>
2.1 Chemikalien und andere Materialien.....	7
2.1.1 Chemikalien .....	7
2.1.2 Gase .....	7
2.1.3 Kits .....	7
2.1.4 Software und Datenbanken.....	7
2.1.5 Puffer und Lösungen.....	8
2.2 Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide .....	8
2.2.1 Bakterienstämme.....	8-9
2.2.2 Vektoren .....	9-10
2.2.3 Oligonukleotide.....	10-13
2.3 Mikrobiologische Methoden .....	13
2.3.1 Medien .....	13-16
2.3.2 Antibiotika.....	16
2.3.3 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	16
2.3.4 Kultivierung von <i>P. copri</i> und <i>P. vulgatus</i> .....	17
2.3.5 Stammkulturhaltung.....	17
2.3.6 Wachstumsbestimmung.....	17
2.3.7 Präparation von ruhenden Zellen .....	17

2.4 Molekularbiologische Methoden .....	18
2.4.1 Polymerasekettenreaktion .....	18-19
2.4.2 Agarose Gelelektrophorese .....	19
2.4.3 DNA-Isolierung aus PCR-Ansätzen .....	20
2.4.4 Restriktionsverdau .....	20
2.4.5 DNA-Ligation .....	20
2.4.6 Sequenzierung von DNA .....	21
2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA .....	21
2.4.8 Transformation von <i>E. coli</i> durch Hitzeschock.....	21
2.4.9 RNA-Isolierung .....	21-22
2.4.10 RT-qPCR.....	22
2.5 Biochemische Methoden .....	22
2.5.1 Produktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> .....	22-23
2.5.2 Zell-Lyse .....	23
2.5.3 Proteinaufreinigung .....	23-24
2.5.4 Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen .....	24
2.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976) .....	24
2.5.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) .....	25
2.5.7 Silberfärbung .....	25
2.5.8 Western Blot .....	26
2.5.9 Probenanalyse mittels HPLC .....	26-28
2.5.10 Photometrische Messungen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten .....	28
2.5.10.1 Aktivitätsmessungen der aufgereinigten Enzyme des SBPPs aus <i>P. copri</i> .....	28-31
2.5.10.2 Messungen der FBP-Aldolase und PPi-PFK im Cytoplasma von <i>P. copri</i> .....	31-32
2.5.10.3 Aktivitätsmessung von BVU_3333 .....	32-33
2.5.10.4 Aktivitätsmessungen der aufgereinigten Enzyme des Citratzyklus aus <i>P. vulgatus</i> .....	33-35
2.5.10.5 Messungen des Citratzyklus im Cytoplasma und in Membranfraktionen von <i>P. vulgatus</i> .....	36-37
2.6 Bioinformatische Analysen.....	37-42

<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>43</b>
3.1 Der Pentose-Metabolismus in <i>P. copri</i> .....	43
3.1.1 Wachstum von <i>P. copri</i> auf Xylose und Hemicellulose .....	43-44
3.1.2 Bioinformatische Analyse des Pentose-Stoffwechsels in <i>P. copri</i> .....	45-48
3.1.3 Transkriptionsanalyse zum Pentose-Metabolismus in <i>P. copri</i> .....	48-50
3.1.4 Biochemischer Nachweis des SBPPs in <i>P. copri</i> .....	51-52
3.1.4.1 Nachweis eines funktionellen SBPPs mit heterolog produzierten Enzymen .....	52-58
3.1.4.2 Enzymatische Charakterisierung der zwei Phosphofruktokinase .....	59-62
3.1.4.3 Bestätigung des SBPPs in <i>P. copri</i> über den Nachweis der Intermediate mittels HPLC.....	62-68
3.1.4.4 Nachweis der Kernreaktion des SBPPs im Cytoplasma von <i>P. copri</i> .....	68-70
3.1.4.5 Analyse der Relevanz von PPI im Anabolismus von <i>P. copri</i> .....	70-71
3.1.5 Vorkommen des SBPPs innerhalb von Darmbakterien.....	71
3.1.5.1 Bioinformatische Analyse des SBPPs in bakteriellen Hauptvertretern des menschlichen Darms .....	71-77
3.1.5.2 Biochemische Untersuchung zum Pentose-Metabolismus in <i>P. vulgatus</i> .....	78-80
3.1.6 Xylose-Isomerisierung in <i>P. copri</i> .....	80-82
3.2 Auf dem Weg zur Homosuccinat-Fermentation – biochemische Analyse des Citratzyklus in <i>P. vulgatus</i> .....	83-84
3.2.1 Bioinformatische Analyse des Citratzyklus von <i>P. vulgatus</i> .....	84-86
3.2.2 Transkriptionsanalysen zum nicht-geschlossenen Citratzyklus in <i>P. vulgatus</i> .....	87-88
3.2.3 Biochemischer Nachweis des nicht-geschlossenen Citratzyklus in <i>P. vulgatus</i> .....	89-96
3.2.4 Rekonstruktion des nicht-geschlossenen Citratzyklus für die Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation.....	96-100
3.2.5 Zelluläre Aktivitäten des nicht-geschlossenen Citratzyklus in <i>P. vulgatus</i> .....	100-104
<b>4 Diskussion</b> .....	<b>105</b>
4.1 Die Verwertung von Ballaststoffen durch Darmbakterien.....	107-109
4.2 Der Pentose-Metabolismus in <i>P. copri</i> .....	109-113
4.3 Die Rolle von PPI in <i>P. copri</i> .....	113-118
4.4 Der putative Nutzen des SBPPs für Organismen .....	118-122
4.5 Biotechnologische Produktion von Succinat .....	122-137
4.6 Der „Flaschenhals“ der Succinat-Bildung in <i>P. vulgatus</i> .....	137-140

4.7 Strategien zur Optimierung der Succinat-Produktion in <i>P. vulgatus</i> durch „ <i>metabolic engineering</i> “ für das Konzept der Homosuccinat-Fermentation .....	140-144
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	145-146
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	147-160

**Abkürzungsverzeichnis**

AHT	Anhydrotetrazyklin
APS	Ammoniumpersulfat
B, Bp	Basen, Basenpaare
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alii / et aliae</i> (und andere)
g	Gramm
h	Stunde
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> , H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	destilliertes Wasser, Reinstwasser
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
L	Liter
M	molar (mol l <sup>-1</sup> )
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
sp., spp.	Spezies
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
V	Volt
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenkonzentration, Volumen pro Volumen
w/v	Massekonzentration, Gewicht pro Volumen

**Aminosäuren:**

Ala, A	Alanin
Cys, C	Cystein
Asp, D	Asparaginsäure
Glu, E	Glutaminsäure
Phe, F	Phenylalanin
Gly, G	Glycin
His, H	Histidin
Ile, I	Isoleucin
Lys, K	Lysin
Leu, L	Leucin
Met, M	Methionin
Asp, N	Asparagin
Pro, P	Prolin
Gln, Q	Glutamin
Arg, R	Arginin
Ser, S	Serin
Thr, T	Threonin
Val, V	Valin
Trp, W	Tryptophan
Tyr, Y	Tyrosin

## 1. Einleitung

### 1.1 Die humane Darmmikrobiota

Der menschliche Körper stellt ein dynamisches Ökosystem dar, welcher viele Milliarden Mikroorganismen wie Bakterien, Archaeen, Viren und einzelligen Eukaryoten enthält. Alle auf oder in dem menschlichen Körper angesiedelten Mikroorganismen werden als Mikrobiota definiert. Zwar sind nahezu alle Oberflächen des Körpers kolonisiert, doch die höchste Anzahl der Mikroorganismen befindet sich im Darm (Lloyd-Price et al., 2017). Viele Faktoren beeinflussen die mikrobielle Besiedlung des Gastrointestinaltrakts, dazu zählen unter anderem chemische Parameter wie der pH-Wert oder die Sauerstoffkonzentration, aber auch physikalische Aspekte wie die Peristaltik oder Transitzeiten (de Vos et al., 2022). Deshalb sind auch die Zellzahlen im Magen und Abschnitten des Dünndarms niedriger, wohingegen die Masse an Mikroorganismen mit  $10^{11} - 10^{12}$  Zellen  $g^{-1}$  im Dickdarm deutlich ansteigt (Sekirov et al., 2010). Aufgrund von sauerstoffarmen Bedingungen dominieren anaerobe Bakterien den Dickdarm. Dazu zählen vornehmlich die Phyla Firmicutes (überwiegend Ruminococcaceae and Lachnospiraceae), Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria und Verrucomicrobia (*Akkermansia*) (Zoetendal et al., 2008; Qin et al., 2010; Li et al., 2014).

Der Dünndarm ist auf den Abbau und die Aufnahme von Nährstoffen wie beispielsweise einfachen Kohlenhydraten, Fetten oder den meisten Proteinen spezialisiert. Hingegen können komplexe Kohlenhydrate wie Ballaststoffe nicht durch den Menschen verdaut werden, da dem Körper die notwendigen Enzyme zur Hydrolyse fehlen (de Vos et al., 2022). Im Dickdarm stellen Ballaststoffe dann allerdings die entscheidende Energiequelle der lokalen Bakterien dar. Über komplexe Enzym-Systeme werden die Polymere schrittweise hydrolysiert und somit verwertbar gemacht (Flint et al., 2012). Als finale Fermentationsendprodukte werden aus den Ballaststoffen kurzkettige Fettsäuren (SCFA) wie Acetat, Propionat und Butyrat gebildet. SCFAs werden entweder lokal durch die Kolonozyten verwertet oder über das Darmepithel in den menschlichen Blutkreislauf aufgenommen (Flint et al., 2012; Fischbach und Sonnenburg, 2011). Die Stoffwechselendprodukte regulieren zahlreiche Stoffwechselvorgänge im Darm und in weiter entfernten Organen wie z.B. der Leber, wobei die Verbindungen zu vielen physiologischen Wirkungen beitragen. Darunter zählt die Modulation von unter anderem der Energiehomöostase, des Glukose-,/Lipidstoffwechsels, Entzündungsvorgängen und sogar der Immunität (Tan et al., 2014; Cani und Jordan, 2018; Silva et al., 2020).

Generell ist auffällig, dass die Art des Ballaststoffs in direktem Zusammenhang mit dem SCFA-Produktionsprofil steht. Beispielsweise führt der Konsum von Inulin zu einer erhöhten Menge an Propionat, wohingegen resistente Stärken vermehrt zu Butyrat verstoffwechselt werden (de Vos et al., 2022). Neben Acetat, Propionat und Butyrat wird mittlerweile auch die Wirkung von Succinat auf den

Wirt untersucht. Der Einfluss von Succinat wurde bislang vernachlässigt, da Succinat hauptsächlich als Intermediat des Citratzyklus angesehen wurde (de Vos et al., 2022). Allerdings stellt Succinat auch ein Stoffwechselprodukt von Darmbakterien mit Fumarat-Atmung dar, wodurch die wichtige Rolle von Succinat als bioaktive Substanz neben den anderen SCFA deutlich wird. Die Wirkung von Succinat ist aber derzeit stark umstritten, da sowohl von positiven wie die Verbesserung der Glukosehomöostase oder die Reduktion von Fettleibigkeit und metabolischen Dysfunktionen als auch von negativen Assoziationen wie die Förderung von Entzündungen berichtet wurde (Tannahill et al., 2013; de Vadder et al., 2016; Wang et al., 2019; Wan et al., 2020). Interessanterweise lässt sich auch eine Verbindung zwischen dem SCFA-Profil und den vorherrschenden Darmbakterien beobachten. Die Bildung von Acetat tritt in verschiedenen Arten allgegenwärtig auf, wohingegen Propionat hauptsächlich durch Vertreter der Bacteroidetes und Negativicutes und Butyrat vor allem durch Bakterien der Familien Ruminococcaceae und Lachnospiraceae produziert werden (Louis & Flint, 2017).

Die Diversität der humanen Darmmikrobiota kann sehr variabel sein und aufgrund von z.B. dem Lebensstil oder der Ernährung schwanken (Fan & Pedersen, 2021). Dennoch wurde versucht die Komplexität dieser intestinalen Gemeinschaft in eine übersichtliche Kern-Mikrobiota mittels distinkter Enterotypen einzuordnen. Für jeden Enterotyp treten vornehmlich verschiedene Leitorganismen auf, die phylogenetisch zu den Gattungen *Bacteroides*, *Ruminococcus* oder *Prevotella* gehören (Arumugam et al., 2011). Allerdings können nicht alle humanen Darmfloren zugeordnet werden, weshalb in den vergangenen Jahren das Schema der Enterotypen hinterfragt wurde (Cheng & Ning, 2019). Da die Darmflora nachweislich Einfluss auf die Gesundheit des Menschen hat, ist die Definition einer gesunden Mikrobiota natürlich von großem Interesse. Es besteht zwar ein Zusammenhang zwischen einer gesunden Darmflora und einer hohen Taxa-Diversität, einem hohen mikrobiellen Genreichtum und einer stabilen Kern-Mikrobiota, diese Faktoren gewährleisten aber nicht zwangsläufig die Gesundheit des Wirts (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Es konnte aber gezeigt werden, dass eine ballaststoffreiche und fett-/eiweißarme Ernährungsweise einen positiven Effekt auf die Darmmikrobiota und somit den Menschen ausübt (Fan & Pedersen, 2021).

## 1.2 Eine ballaststoffreiche Ernährung

Tägliche Ernährungsentscheidungen haben langfristige Auswirkungen auf unsere Gesundheit und das Wohlbefinden. Denn ungesunde Ernährung und Übergewicht erhöhen das Risiko für chronische Krankheiten wie Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Typ-2-Diabetes, Bluthochdruck und verschiedene Krebsarten (Chu et al., 2018; Wang et al., 2011a). Durch die Einnahme von Ballaststoffen in Form von beispielsweise Hülsenfrüchten, Getreideprodukten oder Nüssen kann ein positiver Effekt auf die Gesundheit des Menschen erzielt und die Prävalenz der genannten Krankheiten gesenkt werden

(Dhingra et al., 2012; Kendall et al., 2010). Eine ballaststoffreiche Ernährung steht in direktem Zusammenhang mit dem vermehrten Auftreten bestimmter Darmbakterien. Dazu zählen vornehmlich Vertreter der *Bacteroides*, *Prevotella* und *Phocaeicola* (Chassard et al., 2007; Bryant et al., 1958; Dehority, 1966; Hiseni et al., 2021). Da diese Darmbakterien mit einem gesunden Darm assoziiert werden können, vermitteln diese Mikroorganismen dem Wirt somit einen gesundheitlichen Nutzen. Die Darmbakterien, die eine positive Wirkung auf den Darm haben, werden unter dem Begriff Probiotika zusammengefasst (Hill et al., 2014). Im Vergleich dazu wird das Konzept der selektiven Anreicherung der Probiotika durch die Einnahme von Ballaststoffen unter der Bezeichnung Präbiotika definiert (Gibson & Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007).

Ballaststoffe sind pflanzliche Polysaccharide, die aufgrund ihrer Zusammensetzung und physikalischen Eigenschaften sehr verschieden sind (van Soest, 1978). Eine der wichtigsten pflanzlichen Ballaststoffe sind die Hemicellulosen. Hemicellulosen machen ungefähr 20-40 % der gesamten lignocellulosehaltigen Biomasse (Cellulose, Hemicellulose & Lignin) aus, wobei wiederum die häufigste Hemicellulose Xylan darstellt (McKendry, 2002). Im Grundgerüst sind Xylane hauptsächlich aus der Pentose D-Xylose aufgebaut (Bastawde, 1992; Scheller & Ulvskov, 2010). Durch eine Xylan-reiche Ernährung wie beispielsweise Roggen oder Mais werden unter anderem Vertreter der Gattung *Prevotella* und primär das Darmbakterium *Prevotella copri* (*P. copri*) im Darm akkumuliert (Wu et al., 2011; Tan et al., 2018; Linares-Pastén et al., 2021).

### 1.3 *P. copri* und die Spezialisierung auf Ballaststoffe

Obwohl eine *Bacteroides* dominierte Darmflora häufiger auftritt, setzt sich die Mikrobiota von bis zu 25 % der Menschen hauptsächlich aus *Prevotella*-Arten zusammen (Koren et al., 2013). Vertreter der intestinalen *Prevotella* können Ballaststoffe als Wachstumssubstrate verstoffwechseln und kodieren für Genprodukte, die die pflanzlichen Polysaccharide hydrolysieren (Accetto & Avguštin, 2015). Im Vergleich zu mindestens 25 *Prevotella*-Arten in der Mundhöhle und 17 verschiedene *Bacteroides*-Spezies im Darm, konnten bislang lediglich 5 *Prevotella*-Spezies im humanen Dickdarm beschrieben werden. Von diesen 5 Arten tritt die Spezies *P. copri* deutlich am häufigsten auf (Fehlner-Peach et al., 2019). In mehreren untersuchten Darmfloraen, nahm *P. copri* bis zu 80 % der gesamten Mikrobiota ein (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Diese Dominanz durch eine einzige Bakterienart ist außergewöhnlich und entspricht nahezu einer intestinalen Fermentation in Reinkultur. Die möglichen Effekte einer *P. copri* Anreicherung sind derzeit nicht vollends geklärt. Beispielsweise wird *P. copri* mit dem Auftreten der Autoimmunkrankheit rheumatoide Arthritis assoziiert (Scher et al., 2013; Bernard, 2014). Hingegen wurde auch beobachtet, dass eine *P. copri*-dominierte Darmflora einen positiven Effekt auf die Glukose-Homöostase ausübt und somit eine neuartige Therapie Möglichkeit für Typ-2-

Diabetes darstellt (Péan et al., 2020). Generell konnte aber einheitlich festgestellt werden, dass durch eine als gesund geltende ballaststoffreiche Ernährung, die Akkumulierung des Bakteriums *P. copri* gefördert (Wu et al., 2011; Tan et al., 2018; Linares-Pastén et al., 2021) und der Organismus sogar als potenzielles Probiotikum eingestuft wird (Chang et al., 2019; De Filippis et al., 2022). Die Zuordnung von *P. copri* als putativer Pathobiont in Bezug auf rheumatoide Arthritis (Kim & Kim, 2016), kann deshalb durchaus in Frage gestellt werden.

*P. copri* ist ein Gram-negatives, obligat anaerobes Bakterium und wird in die Familie der Prevotellaceae innerhalb des Phylums der Bacteroidetes eingeordnet. Der Organismus wurde 2007 von Hayashi et al. aus menschlichen Fäkalien isoliert und erstmals beschrieben. Der zentrale Stoffwechsel von *P. copri* beruht auf dem Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg, der Fumarat-Atmung mit Bildung von Succinat und der Produktion von Acetat und Formiat aus Pyruvat. Die Atmungskette besteht aus fünf Membrankomplexen, dem Rnf-Komplex, der Nqr, einer „kopflösen“ NDH-Variante, einer Cytochrom-bd-Chinioxidase und der Fumarat-Reduktase (Franke & Deppenmeier, 2018). Da *P. copri* durch die Aufnahme von Ballaststoffen (vornehmlich Xylan) im Dickdarm vermehrt auftritt, muss das Bakterium auf die Verstoffwechslung der pflanzlichen Polysaccharide spezialisiert sein. Auf Genomebene wurde bereits aufgeklärt, wie *P. copri* die pflanzlichen Polysaccharide aufnimmt und in die entsprechenden Monomere hydrolysiert (Accetto & Avguštin, 2015; Fehlner-Peach et al., 2019). Dennoch fehlen derzeit immer noch biochemische Analysen der Verstoffwechslung vor allem bezogen auf die grundlegenden Bausteine der Polymere. Im Fall der Hemicellulosen stellen die monomeren Einheiten Pentosen insbesondere Xylose dar (Bastawde, 1992).

#### **1.4 Biotechnologische Produktion von Succinat**

Wie zuvor beschrieben, stellt Succinat neben Acetat, Propionat und Butyrat ein wichtiges Stoffwechselprodukt der Darmflora dar, wobei derzeit die Wirkung von Succinat auf den Wirt nicht vollends geklärt ist. Succinat, auch als Salz der Bernsteinsäure bekannt, ist ein wichtiger Baustein vieler Verbindungen innerhalb der Lebensmittel-, Chemie- und Pharmaindustrie (Saxena et al., 2017). Die Bernsteinsäure findet Anwendung in der Herstellung von Polybutylen-Succinat (PBS), Tensiden, Duftstoffen und Lebensmittelzusatzstoffen (Kumar et al., 2020). Der Bedarf an Succinat ist dementsprechend hoch und beträgt mehrere 10.000 Tonnen pro Jahr (Mordor Intelligence, 2021a). Aufgrund der akuten Klimadebatte und der steigenden Ölpreise ist ein Umstieg von der traditionellen petrochemischen auf eine umweltfreundliche biotechnologische Succinat-Herstellung unausweichlich (Tylecote, 2019; Li et al., 2020; Nasser et al., 2021). Die fermentative Produktion von Succinat aus nachwachsenden Rohstoffen hat künftig das wirtschaftliche und nachhaltige Potential die erdölbasierte Produktion in Zukunft zu ersetzen (Jansen & van Gulik, 2014). Wenige Firmen

produzieren bereits Succinat mithilfe von Mikroorganismen im industriellen Maßstab. Bei diesen Mikroorganismen handelt es sich hauptsächlich um anaerobe Pansen-Bakterien, die natürlicherweise eine große Menge an Succinat produzieren (Ahn et al., 2016). Grundsätzlich wird Succinat innerhalb des Citratzyklus, des Glyoxylatwegs und der Fumarat-Atmung gebildet. Bei der anaeroben Fumarat-Atmung wird Fumarat als finaler Elektronenakzeptor der Atmungskette verwendet und zu Succinat reduziert. Da somit Succinat als Stoffwechselendprodukt akkumuliert, eignen sich Organismen mit Fumarat-Atmung besonders für die industrielle Succinat-Produktion. Über verschiedene Maßnahmen der Stammoptimierung, vor allem durch die Manipulation der Stoffwechselwege, konnte die Succinat-Ausbeute der eingesetzten Organismen deutlich gesteigert werden (Jansen & van Gulik, 2014). Allerdings weisen alle bekannten Succinat-Produktionsstämme auch trotz Stoffwechselloptimierung eine hohe Anhäufung von Nebenprodukten auf. Diese Art der Succinat-Produktionen mit unerwünschten Nebenprodukten erhöht die Kosten der Herstellung und der Produkt-Aufreinigung enorm, weshalb der vollständige Umstieg auf eine biotechnologische Succinat-Herstellung erschwert wird. Da Succinat in der Regel über den reduktiven Zweig des Citratzyklus gebildet wird, werden für die Produktion Reduktionsäquivalente [H] benötigt. Die benötigten [H] werden über andere glykolytischen Stoffwechselwege wie dem EMP-Weg oder über die Oxidation von Pyruvat erzeugt, wodurch folglich weitere Endprodukte wie z.B. Acetat gebildet werden. Aufgrund der [H]-Abhängigkeit der reduktiven Succinat-Produktion, konnte die Nebenprodukt-Bildung bislang nicht unterbunden werden.

### **1.5 Das Konzept einer Homosuccinat-Fermentation am Beispiel von *P. vulgatus***

Das grundlegende Ziel der biotechnologischen Succinat-Herstellung ist eine hohe Succinat-Ausbeute mit geringer Nebenprodukt-Bildung. Der effizienteste Succinat-Produktionsstamm würde im besten Fall aus dem eingesetzten Substrat nur noch Succinat bilden und somit eine sogenannte Homosuccinat-Fermentation betreiben. Da im Konzept der Homosuccinat-Fermentation somit keine weiteren Nebenprodukte anfallen sollen, darf der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Produktion nicht über andere Stoffwechselwege abgedeckt werden. Eine Möglichkeit zur Generierung von [H] liegt jedoch im Citratzyklus selbst. Fumarat-Atmer weisen keinen geschlossenen Citratzyklus auf, weshalb der oxidative Abschnitt des Citratzyklus wie auch der reduktive Teil mit der Bildung von Succinat endet. Im oxidativen Abschnitt werden unter anderem auch [H] erzeugt, die für anabole Reaktionen der Zelle zur Bildung von Biomasse Verwendung finden. Um die fehlenden [H] der Homosuccinat-Fermentation abzudecken und trotzdem keine weiteren Endprodukte zu erzeugen, könnten die gebildeten [H] des oxidativen Citratzyklus für die reduktive Succinat-Bildung eingesetzt werden. Durch diese Kopplung des oxidativen und reduktiven Abschnitts des Citratzyklus, wäre also der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Produktion erfüllt und die notwendigen [H] müssten nicht anderweitig erzeugt werden,

weshalb die Nebenprodukt-Bildung unterbunden wäre. Eine Homosuccinat-Fermentation wäre ein Durchbruch für die biotechnologische Succinat-Produktion. Die Weiterverarbeitung von Succinat würde vereinfacht und somit die Gesamtkosten der Produktion enorm gesenkt, weshalb die Möglichkeit bestehen würde, dass das Verfahren der Homosuccinat-Fermentation die klassische petrochemische Succinat-Herstellung ohne wirtschaftliche Kompromisse ersetzen könnte.

Das anaerobe Bakterium *Phocaeicola vulgatus* (*P. vulgatus*) ist ein häufig vorkommender Organismus des menschlichen Darms und produziert natürlicherweise unter anderem Succinat als Stoffwechselprodukt (Flint & Duncan, 2014; Flint et al., 2015). Da *P. vulgatus* pflanzliche Polysaccharide hydrolysieren kann, eignet sich das Bakterium für die umweltfreundliche Succinat-Produktion aus nachwachsenden Rohstoffen (Chassard et al., 2007; Bryant et al., 1958; Dehority, 1966). *P. vulgatus* betreibt Fumarat-Atmung, weshalb Succinat hauptsächlich über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus produziert wird (Franke, 2020). Da also *P. vulgatus* bereits natürlicherweise Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus bildet und nachwachsende Rohstoffe als Wachstumssubstrate verwerten kann, wäre es möglich das Konzept der Homosuccinat-Fermentation anhand dieses Bakteriums umzusetzen.

## 1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine ballaststoffreiche Ernährung fördert bestimmte Darmbakterien, vor allem *P. copri*, in ihrem Wachstum. Dennoch konnte die Auswirkung der entsprechenden Stoffwechselprodukte und der Prädominanz der Bakterien auf den Wirt derzeit nicht vollends geklärt werden. In dieser Arbeit sollten deshalb detaillierte Untersuchungen bezüglich der Verstoffwechslung der Ballaststoffe auf der Ebene der monomeren Einheiten, den Pentosen, anhand von *P. copri* durchgeführt werden. Dazu sollten zunächst Wachstumsversuche von *P. copri* mit unterschiedlichen Ballaststoffen erfolgen und auf bioinformatischer Ebene ein Stoffwechselmodell aufgestellt werden. Dieses Modell zur Verstoffwechslung der Pentosen, sollte mithilfe von Transkript-Analysen und Enzym-Assays verifiziert und analysiert werden. Als weiteres Projekt dieser Arbeit, sollte ein neuartiges System zur Succinat-Produktion mithilfe von Bakterien am Beispiel von *P. vulgatus* untersucht werden. Die essentiellen Ziele einer optimierten Succinat-Produktion, also die Erhöhung der Ausbeute und Reduktion der Nebenprodukte, sollten über die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation getestet werden. Dazu sollten in dieser Abhandlung grundlegende Versuche durchgeführt werden, um zu überprüfen, ob das Modell der Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* umsetzbar wäre. Hierfür sollte zunächst bioinformatisch das Modell der Homosuccinat-Fermentation aufgestellt und anschließend dieses Stoffwechselmodell über Enzym-Aktivitätstest untermauert werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und andere Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Schwerte, Deutschland) oder New England Biolabs (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) im Reinheitsgrad p.a. (*pro analysis*) bezogen.

#### 2.1.2 Gase

CO<sub>2</sub> (99,9 %), H<sub>2</sub> (99,9 %) und N<sub>2</sub> (99,9 %) wurden von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen.

#### 2.1.3 Kits

**Tabelle 1:** Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Kits.

Kit	Hersteller
Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit	NEB (Frankfurt a.M., Deutschland)
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	NEB (Frankfurt a.M., Deutschland)
Monarch® Plasmid Miniprep Kit	NEB (Frankfurt a.M., Deutschland)

#### 2.1.4 Software und Datenbanken

**Tabelle 2:** Verwendete Software und Datenbanken.

Programm	Verwendungszweck
Chromas Lite 2.1.1	Auswertung von DNA-Sequenzen
Clustal Omega	Multisequenzalignment
Clone Manager 9	Analyse von DNA-Sequenzen
DoubleDigest Calculator	Reaktionsbedingungen für DNA-Verdaue
ExpASy ProtParam	Proteinanalysen
ExpASy translate tool	DNA-Sequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzen
JGI IMG	DNA- und Proteinanalyse
KEGG	Proteinanalysen
NCBI	DNA- und Proteinanalyse
Primer3	Primer-Design
Prosite	Analyse von Proteinen
UniProt	Proteindatenbank

## 2.1.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 3: Verwendete Puffer und Lösungen.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumpersulfat (APS) Lösung	10 % APS
Entwicklerlösung	3 % (w/v) Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
	50 µl Formaldehyd (37 % v/v) 1 Krümel Natriumthiosulfat
Fixierlösung	50 % (v/v) Methanol
	12 % (v/v) Essigsäure
	0,05 % Formaldehyd (37 % v/v)
Imprägnier-Lösung	0,1 % AgNO <sub>3</sub>
1 x PBS	115 mM NaCl
	16 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	pH 7,3
Puffer E	2,5 mM Desthiobiotin in Puffer W
Puffer W	100 mM Tris pH 8,0
	150 mM NaCl
Sammelgelpuffer	600 mM Tris-HCl
	pH 6,8
SDS-Elektrophoresepuffer (1x)	20 mM Tris
	190 mM Glycerin
	0,1 % (w/v) SDS
	pH 8,3
SDS-Ladepuffer	0,1 % (v/v) Bromophenolblau
	0,05 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
	50 % (v/v) Glycerin
Stopplösung	5 % (v/v) Essigsäure
TAE-Puffer (1x)	4,84 g Tris
	2 ml 0,05 M EDTA (pH 8)
	1,14 ml 1 M Essigsäure
	ad 1 l
Thiosulfatlösung	0,02 % (w/v) Natriumthiosulfat
Trenngelpuffer	1,8 M Tris-HCl
	pH 8,8

## 2.2 Bakterienstämme, Vektoren und Oligonukleotide

### 2.2.1 Bakterienstämme

Tabelle 4: Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F <sup>-</sup> , Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15, Δ( <i>lac</i> - <i>ZYA-argF</i> )U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ <sup>-</sup> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	Hanahan, 1983
<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hadSB</i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Invitrogen (Carlsbad, USA)

<i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) $\Delta$ <i>iscR</i>	<i>E. coli</i> BL21 (DE3); $\Delta$ <i>iscR</i>	Akhtar & Jones, 2008
<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	Wildtyp	Hayashi et al., 2007
<i>Phocaeicola vulgatus</i> DSM 1447	Wildtyp	Eggerth & Gagnon, 1933; García-López et al., 2019

## 2.2.2 Vektoren

**Tabelle 5:** Auflistung der verwendeten Vektoren.

Vektor	Eigenschaften	Hersteller
pASK-IBA3	Strep-Tag für die C-terminale Fusion mit einem rekombinanten Protein, Amp <sup>R</sup> , Vektor mit induzierbarem Tetracyclin-Promotor/Operator	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK-IBA5	Strep-Tag für die N-terminale Fusion mit einem rekombinanten Protein, Amp <sup>R</sup> , Vektor mit induzierbarem Tetracyclin-Promotor/Operator	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK-3_prevcop_4138_ATP-PFK	pASK-3-Derivat mit Gensequenz der ATP-PFK aus <i>P. copri</i>	Diese Arbeit
pASK-3_prevcop_03899_PP <sub>i</sub> -PFK	pASK-3-Derivat mit Gensequenz der PP <sub>i</sub> -PFK aus <i>P. copri</i>	Diese Arbeit
pASK-5_prevcop_04063_R5P-Isomerase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der R5P-Isomerase aus <i>P. copri</i>	Diese Arbeit
pASK-5_prevcop_03582_RuP-3-Epimerase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der RuP-3-Epimerase aus <i>P. copri</i>	Diese Arbeit
pASK-5_prevcop_04062_Transketolase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Transketolase aus <i>P. copri</i>	Diese Arbeit
pASK-5_prevcop_06123_FBP-Aldolase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der FBP-Aldolase aus <i>P. copri</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_3333_Transaldolase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Transaldolase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_1961_Citrat-Synthase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Citrat-Synthase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_1959_Aconitase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Aconitase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_1960_Isocitrat-Dehydrogenase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Isocitrat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_0978-0979_α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_1163_SCACT	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der SCACT aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_0462_Malat-Dehydrogenase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Malat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit
pASK-5_BVU_1859_Fumarase	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Fumarase aus <i>P. vulgatus</i>	Diese Arbeit

pASK-5_mthe1194	pASK-5-Derivat mit Gensequenz der Acetyl-CoA-Synthetase aus <i>Methanosaeta thermophila</i>	Berger et al., 2012
-----------------	---	---------------------

### 2.2.3 Oligonukleotide

Für die Amplifikation der entsprechenden Gene wurden die in Tab. 6 aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) verwendet. Die Primer wurden mithilfe der Software Primer Primer D'Signer (IBA, Göttingen, Deutschland) oder Primer 3 (primer3.ut.ee/) erstellt. Synthetisiert wurden die Oligonukleotide von der Firma Eurofins (Wesseling, Deutschland).

**Tabelle 6:** Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Funktion	Bezeichnung	Sequenz
Screening/Sequenzierung	pASK.for	GAGTTATTTTACCACTCCCT
Screening/Sequenzierung	pASK.rev	CGCAGTAGCGGTAAACG
<b>Klonierungsprimer</b>		
Klonierung des Gens der R5P-Isomerase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_04063_fw	ATG GTA GGT CTC AGC GC C GAA GTA AAG ACA GTT G GT ATT GCA T
Klonierung des Gens der R5P-Isomerase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_04063_rev	ATG GTA GGT CTC ATA TCA CTG CTG AAC AGG AAT CT T CTT GAC
Klonierung des Gens der RuP-3-Epimerase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_03582_fw	ATG GTA GGT CTC AGC GC C AAA ACA ATG GTA TCC C CT TCA TTG C
Klonierung des Gens der RuP-3-Epimerase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_03582_rev	ATG GTA GGT CTC ATA TCA GTG GAG TTC TTT CAA GG C ATG GA
Klonierung des Gens der Transketolase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_04062_fw	ATG GTA GGT CTC AGC GC C AAC GAC ATT AAA GTA A TG AAT CAT GC
Klonierung des Gens der Transketolase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_04062_rev	ATG GTA GGT CTC ATA TCA AGC CTC TGC CAA GAA AG C CTT TA
Klonierung des Gens der ATP-PFK aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-3	Prevcop_04138_fw	TCTATCTAGA ATGGCAAAGATTAAG
Klonierung des Gens der ATP-PFK aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-3	Prevcop_04138_rev	AAGTCCATGG CAGATACTCAACTCGT
Klonierung des Gens der PPI-PFK aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-3	Prevcop_03899_fw	TCTATCTAGA ATGGAAAAAAGTGCATTG
Klonierung des Gens der PPI-PFK aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-3	Prevcop_03899_rev	TTATCCATGG TACTTAGCCTGCTCCA
Klonierung des Gens der FBP-Aldolase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_06123_fw	ATGGTAGGTCTC AGCGCCGCAGTAGATTACA AGAAAATCGGTC
Klonierung des Gens der FBP-Aldolase aus <i>P. copri</i> in den Vektor pASK-5	Prevcop_06123_rev	ATGGTAGGTCTC ATATCAGTCGAGGTTAGCCA ACTTGTTATC

Klonierung des Gens der Transaldolase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_3333_fw	ATGGTAGGTCTC AGCGCCAAATTCTTTATTGA CACAGCTAATCTG
Klonierung des Gens der Transaldolase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_3333_rev	ATGGTAGGTCTC ATATCATCCGTTAACCTTTTT GTAATCGGC
Klonierung des Gens der Citrat-Synthase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1961_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAT GAAGAAAGAATATATCATTT ACAAAC
Klonierung des Gens der Citrat-Synthase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1961_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATC TCTGTTTCAAAGGCACATAT TCC
Klonierung des Gens der Aconitase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1959_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAT GGTAAAAGGTATGGTATAT GACTT
Klonierung des Gens der Aconitase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1959_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATC TTGCATTTAAAGCAGAGCCG G
Klonierung des Gens der Isocitrat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1960_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAT GAAAAAGACAGTACCTTATA TTACA
Klonierung des Gens der Isocitrat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1960_rev	ATGGTAGGTCTCATATCAGG AGTTTATTCTTTCTATTATTT CTTTT
Klonierung des Gens der SCACT aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1163_fw	ATG GTA GGT CTC AGC GC C GGA TTT AAT ATT ATT TC C GCA GCC G
Klonierung des Gens der SCACT aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1163_rev	ATG GTA GGT CTC ATA TCA TTT ATA TTC TGC CCA ATC TAT CAG G
Klonierung des Gens der $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_0978/0979_fw	ATG GTA GGT CTC AGC GC C GCA GAT GAA ATG ATA G TC AAG GAG
Klonierung des Gens der $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_0978/0979_rev	ATG GTA GGT CTC ATA TCA TTT CAC TTC CCA AAT ATC ATT TGT CA
Klonierung des Gens der Malat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_0462_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAT GGAATTTGTAACGAATGAA AAGCT
Klonierung des Gens der Malat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_0462_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATT TAATATAAGGATTCAGTTTG TTCCA
Klonierung des Gens der Fumarase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1859_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCAT GGCAACACCTCCGTTCCACT
Klonierung des Gens der Fumarase aus <i>P. vulgatus</i> in den Vektor pASK-5	Bvu_1859_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATT TACAATTTCCAAGGCAACGC GG

**Primer für RT-qPCR**

für RT-qPCR des Gens der R5P-Isomerase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04063_fw	CAG CGA TGC GAG TGT AG A CT
für RT-qPCR des Gens der R5P-Isomerase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04063_rev	TCT CCT TGC ACC ATG CCA AT
für RT-qPCR des Gens der RuP-3-Epimerase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_03582_fw	GCA GGA GTT ACC CTC AAC CC
für RT-qPCR des Gens der RuP-3-Epimerase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_03582_rev	CTG GCT TCC GCT CTC TTT GA
für RT-qPCR des Gens der Transketolase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04062_fw	CCA GGG CAT CGC TAA ATT GC
für RT-qPCR des Gens der Transketolase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04062_rev	CAG AAC CGC TAG CTA CG A GG
für RT-qPCR des Gens der ATP-PFK aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04138_fw	AATTCATCGCACCTGTCAGC
für RT-qPCR des Gens der ATP-PFK aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04138_rev	ACAGGTGGTACGATGCTGA A
für RT-qPCR des Gens der PPI-PFK aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_03899_fw	GTTAGCACCATTTCGACGCT
für RT-qPCR des Gens der PPI-PFK aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_03899_rev	ACTCGGTTTCAACGCTTCAC
für RT-qPCR des Gens der Glucokinase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_03592_fw	CAT CGA CGT TAC GCT CGG TA
für RT-qPCR des Gens der Glucokinase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_03592_rev	CAC CAG TGG CAG AGC AG T AA
für RT-qPCR des Gens der G6P-Isomerase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04497_fw	GGC TGA CAT GGA GAA GG C TT
für RT-qPCR des Gens der G6P-Isomerase aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_04497_rev	CTT CCA CCA CTC AGC GAA GT
für RT-qPCR des Gens des ribosomalen Proteins L21 aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_06002_fw	CGTTGACAAAGACGGCTCA A
für RT-qPCR des Gens des ribosomalen Proteins L21 aus <i>P. copri</i>	RT-qPCR_prevcop_06002_rev	GTGAACTGAGCACGATGAC C
für RT-qPCR des Gens der Citrat-Synthase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1961_fw	ACGCTTGATTTGCTGTTGGT
für RT-qPCR des Gens der Citrat-Synthase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1961_rev	ACCTGGATATTTGCCCTCC
für RT-qPCR des Gens der Aconitase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1959_fw	GATGCTGAGGTTGTTGCCAA
für RT-qPCR des Gens der Aconitase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1959_rev	GCAGCCCCACTTAAATCCTG
für RT-qPCR des Gens der Isocitrat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1960_fw	TTGGTTCAGCGGAGTGGTA T
für RT-qPCR des Gens der Isocitrat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1960_rev	AAGAAGATTCGGGAAAGCG C
für RT-qPCR des Gens der $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_0979_fw	GCCGGGACAGGAAGGTTAT A

für RT-qPCR des Gens der $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_0979_rev	TGACCGTAAGTTCCACCGAA
für RT-qPCR des Gens der SCACT aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1163_fw	CGCCTTACCGTCGTGAAATT
für RT-qPCR des Gens der SCACT aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1163_rev	TACCCCGTTTTTCATGTCAGCT
für RT-qPCR des Gens der Malat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_0462_fw	AAAGGCGGTGCAAACATCA T
für RT-qPCR des Gens der Malat-Dehydrogenase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_0462_rev	AGTTTCCCAGGCCATCATGA
für RT-qPCR des Gens der Fumarase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1859_fw	TCCGGCTACATTGGTTCCTT
für RT-qPCR des Gens der Fumarase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1859_rev	GAAAGCACGCCCGTATTCAT
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit B des Rnf-Komplex aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_3890_fw	TGTGTATGAAGATCCGCGG A
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit B des Rnf-Komplex aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_3890_rev	CAACGGCTTCCAATCCCAAA
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit A der kopflosen NDH aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1759_fw	GACGGTCGTGGATGCAATT C
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit A der kopflosen NDH aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1759_rev	CAACGCTCCTTTCTTCCAGG
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit B des Nqr-Komplex aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_3234_fw	ACCGATCAGTACAGTGCCAA
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit B des Nqr-Komplex aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_3234_rev	TCGGGAGCCACTTCGTAAT
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit A der Fumarat-Reduktase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1240_fw	TGGGTGGTATCTGGGTTGA C
für RT-qPCR des Gens der Untereinheit A der Fumarat-Reduktase aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_1240_rev	GGCAGCCACAAATTCAGGA A
für RT-qPCR des Gens des ribosomalen Proteins L23 aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_0803_fw	CGGCTTTATTGTACGTCCTG A
für RT-qPCR des Gens des ribosomalen Proteins L23 aus <i>P. vulgatus</i>	RT-qPCR_bvu_0803_rev	AGCATTCGTACGACCATTGA

## 2.3 Mikrobiologische Methoden

### 2.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde vorwiegend „Lysogeny-Broth“- Medium (LB-Medium; Miller, 1972) verwendet.

**LB-Medium**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 mL

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem Medium vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zugegeben. Die Agar-Platten dienten zur kurzzeitigen Lagerung von *E. coli*-Stämmen bei 4 °C. Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums (auf ca. 60 °C) hinzugefügt.

Für die aerobe heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* wurde stets „Maximal induction“-Medium (MI-Medium; modifiziert nach Mott et al., 1985) verwendet.

**MI-Medium****Basismedium**

Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 950 ml

**20 x M9-Salze**

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	120 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	60 g
NaCl	10 g
NH <sub>4</sub> Cl	20 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Dem autoklavierten Basis-Medium wurde in einfacher Endkonzentration M9-Salze hinzugefügt. Zusätzlich wurden steril filtrierte Salzlösungen hinzugegeben: CaCl<sub>2</sub> (0,1 mM), MgSO<sub>4</sub> (1 mM) und FeNH<sub>4</sub> (1 µM).

Für die Regeneration von transformierten *E. coli*-Zellen wurde SOC-Medium (Hanahan, 1983) eingesetzt.

**SOC-Medium**

Trypton	2 % (w/v)
Hefeextrakt	0,5 % (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glukose	20 mM
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Sollte *E. coli* zur Überproduktion von sauerstoffsensitiven Proteinen eingesetzt werden, erfolgte die Anzucht unter anaeroben Bedingungen. Die Kultivierung wurde in modifizierten Miller-LB-Medium durchgeführt. Bei Proteinen mit Eisen-Schwefel-Clustern erfolgte die Zugabe von 2 mM Eisenammoniumcitrat.

#### **mod. Miller-LB-Medium**

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glukose	4,5 g
NaCl	10 g
MOPS	20,9 g pH 7,4
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Für die Anzucht von *P. copri* und *P. vulgatus* wurde „Peptone yeast extract“-Medium (PYG-Medium, Komplexmedium; modifiziert nach DSMZ Nr.: 104) oder „Defined Minimal Medium“ (DMM) verwendet.

#### **PYG-Medium**

Trypton aus Casein	5 g
Pepton aus Soja	5 g
Hefeextrakt	10 g
Fleischextrakt	5 g
Glukose	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	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
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml pH 8

#### **DMM-Medium**

Mineral 3B	50 ml
0,2 % L-Methionin	10 ml
FeSO <sub>4</sub> -Lösung	1,5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml pH 8

**Hämin-Lösung:** Für die Hämin-Lösung wurden 50 mg Hämin in 1 ml 1 M NaOH gelöst und auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgefüllt und steril filtriert. Gelagert wurde die Lösung bei 4 °C.

**Vitamin K1-Lösung:** 0,1 ml Vitamin K1 wurden in 20 ml 96 % Ethanol gelöst und steril filtriert. Gelagert wurde die Lösung im Dunkeln bei 4 °C.

**FeSO<sub>4</sub>-Lösung:** Für die FeSO<sub>4</sub>-Lösung wurden 0,278 g FeSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O mit 2 Tropfen HCl versetzt und in 100 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst und steril filtriert.

<b>Salz-Lösung</b>	
MgSO <sub>4</sub>	0,5 g
CaCl <sub>2</sub>	0,25 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1 g
NaHCO <sub>3</sub>	10 g
NaCl	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

<b>Mineral 3B</b>	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	18 g
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	0,52 g
NaCl	18 g
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,4 g
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	0,02 g
CoCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	0,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Nach Einstellen des pH-Wertes auf 8,0 wurde das jeweilige Medium solange begast (80 % N<sub>2</sub>/20 % CO<sub>2</sub>, v/v) bis der pH-Wert auf 7 gesenkt war. Die Kulturflaschen wurden anschließend luftdicht verschlossen und autoklaviert. Die Vitamin K1-, Hämin-Lösung, die Glukose und L-Cystein wurden nach dem Autoklavieren zugefügt.

### 2.3.2 Antibiotika

Für die Reinheit der Kulturen und als Selektionsmarker bei Klonierungen wurde die in Tabelle 7 aufgeführten Antibiotika verwendet.

**Tabelle 7:** Verwendete Antibiotika mit Konzentrationsangaben.

<b>Antibiotikum</b>	<b>Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration</b>
Ampicillin	100 mg/ml in 50 % Ethanol, steril filtriert	100 µg/ml
Kanamycin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	50 µg/ml

### 2.3.3 Kultivierung von *E. coli*

In dieser Arbeit wurde *E. coli* unter aeroben oder anaeroben Bedingungen kultiviert. Der Organismus wurde grundsätzlich bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 180 rpm inkubiert. Die Inkubation für die Überproduktion von Proteinen erfolgte entweder bei 30 °C und 120-150 rpm für 3-5 h oder bei 18 °C und 100 rpm über Nacht.

### 2.3.4 Kultivierung von *P. copri* und *P. vulgatus*

*P. copri* und *P. vulgatus* wurden stets anaerob bei 37 °C mit einer Gasatmosphäre aus N<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> (80 %/20 %) kultiviert. Die Organismen wurden in luftdicht verschließbaren Kulturflaschen (Glasgerätebau Ochs, Bovenden, Deutschland) in Flüssigmedium inkubiert.

### 2.3.5 Stammkulturhaltung

*E. coli*: Zur langfristigen Lagerung wurden *E. coli*-Übernachtulturen in 20 % Glycerin überführt und bei -70 °C aufbewahrt.

*P. copri* und *P. vulgatus*: Die langfristige Lagerung erfolgte indem 2 ml der jeweiligen Kultur mit 2 ml 50 % [v/v] anaerober Saccharose versetzt und in anaeroben Fläschchen bei -70 °C weggefroren wurden.

### 2.3.6 Wachstumsbestimmung

Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde über die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Da *P. copri* und *P. vulgatus*-Medien Resazurin als Redoxindikator enthielten und sich daher bei Sauerstoffkontakt pink verfärbten, wurde den Proben Natriumdithionit zugegeben, um das Resazurin zu reduzieren. Der Effekt der Mehrfachstreuung wurde umgangen, indem die Kulturen bei einer OD<sub>600nm</sub> > 0,3 entsprechend mit Medium verdünnt wurden.

### 2.3.7 Präparation von ruhenden Zellen

Ruhende Zellen von *P. copri* wurden hergestellt, indem 500 ml einer PY+Xylose-Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase bei 8000 rpm für 10 min geerntet wurden. Die Zellen wurden zweimal mit 100 ml DMM-Medium (ohne C-Quelle + 1 mM Cystein + 1 mM DTT) gewaschen und schließlich in 60 ml DMM-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die resuspendierten Zellen in 15 ml Aliquots aufgeteilt und zum vollständigen Aushungern für 30 min bei 37 °C inkubiert. Außerdem wurden die Suspensionen für 30 s mit CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub>-Gasgemisch übergast. Daraufhin wurde den Zellen jeweils das zu untersuchende Substrat (in dieser Arbeit 50 mM Xylose oder 50 mM Glukose) zugefügt. Für die Analyse wurden jeweils 100 µl der Suspension alle 20 min entnommen und über HPLC untersucht.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden in dieser Arbeit spezifische DNA-Abschnitte amplifiziert (Mullis *et al.*, 1986). Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmente, die für spätere Klonierungen verwendet werden sollten, wurde die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) mit einer Umsatzrate von 20 – 30 sec/kb eingesetzt. Gegenüber anderen DNA-Polymerasen besitzt die Q5<sup>®</sup> High-Fidelity Polymerase eine hohe Genauigkeit (280 x genauer als die *Taq*-Polymerase) und ist somit ideal für eine fehlerfreie Amplifikation. Als Matrize für die Amplifikation wurde genomische DNA verwendet. Tabelle 8 und Tabelle 9 repräsentieren den PCR-Reaktionsansatz und das verwendete Programm. Für die Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide wurde eine Gradienten-PCR (55-72 °C) durchgeführt.

**Tabelle 8:** Standard PCR-Reaktionsansatz für eine Klonierung.

Komponente	Menge
5 x Q5 Reaction Buffer	10 µl
Q5 High GC Enhancer	2 µl
Vorwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärts-Primer (10 pmol/µl)	1 µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,5 µl
Template	1 µl
Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase	0,25 µl
rH <sub>2</sub> O	ad 50 µl

**Tabelle 9:** PCR-Programm für eine Klonierung.

Phase	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min
Denaturierung	98 °C	10 s
Anlagerung der Primer	T <sub>A</sub>	20 s
Elongation	72 °C	x min
finale Elongation	72 °C	2 min

} 30 x

T<sub>A</sub>: Anlagerungstemperatur der Primer

x: Elongationszeit der einzelnen Gene, 20-30 sec/kb

Um zu überprüfen, ob bakterielle Klone ein gewünschtes Plasmid besaßen, wurden diese mit Hilfe einer Kolonie-PCR untersucht. Dafür wurden die jeweiligen Klone gepickt und in 10 µl rH<sub>2</sub>O resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 5 µl in den aufgeführten PCR-Reaktionsansatz (Tab. 10) eingesetzt, wohingegen die restlichen 5 µl in 100 µl LB-Medium mit Amp überimpft wurden. Letzteres diente zu Absicherung des Klons. Die Amplifikation der DNA-Sequenz erfolgte über eine modifizierte *One-Taq*<sup>®</sup>-DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland). Das verwendete Programm ist in

Tabelle 11 aufgeführt. Bei einem positiven Ergebnis (positiver Klon) wurde die Absicherung als Grundlage weiterer Versuche verwendet.

**Tabelle 10:** Standard PCR-Reaktionsansatz für eine Kolonie-PCR.

Komponente	Menge
5x One <i>Taq</i> Standard Reaction Buffer	5 $\mu$ l
Vorwärts-Primer (10 pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Rückwärts-Primer (10pmol/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
One <i>Taq</i> DNA-Polymerase	0,125 $\mu$ l
dNTP-Mix (25 mM)	0,5 $\mu$ l
Template-DNA	5 $\mu$ l
rH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l

**Tabelle 11:** PCR-Programm für eine Kolonie-PCR.

Phase	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	94 °C	3 min	} 30 x
Denaturierung	94 °C	30 s	
Anlagerung der Primer	T <sub>A</sub>	20 s	
Elongation	68 °C	x min	
finale Elongation	68 °C	5 min	

T<sub>A</sub>: Anlagerungstemperatur der Primer

x: Elongationszeit der einzelnen Gene; 1 min per kb

#### 2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der sogenannten Agarose-Gelelektrophorese wurden in dieser Arbeit Nukleinsäuren entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch aufgetrennt. Grundsätzlich wurden in dieser Arbeit 1 %ige Agarosegele verwendet. Hergestellt wurden die Gele mit 1 x TAE-Puffer. Die Agarosegele wurden für den späteren Nachweis der Nukleinsäuren mit 1  $\mu$ l Roti<sup>®</sup>-GelStain Red (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt. Neben den Proben wurde stets ein Größenstandard auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der Quick-Load<sup>®</sup> Purple 1 kb DNA Ladder (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Proben, die nicht mit dem One *Taq* Standard Reaction Buffer versetzt waren, wurden vor Beladen des Gels mit DANN-Ladepuffer (6x Gel Loading Dye, Purple (6x), NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) vermischt. Die Nukleinsäuren wurden im elektrischen Feld bei 90 V aufgetrennt und anschließend unter UV-Licht analysiert.

### 2.4.3 DNA-Isolierung aus PCR-Ansätzen

Für die Isolation von DNA-Fragmenten aus PCR-Ansätzen wurde das Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Dabei basiert die Isolierung auf einer Silikatmembran, wodurch die DNA von Salzen, Primern, dNTPs und anderen Reaktionskomponenten befreit wird.

### 2.4.4 Restriktionsverdau

Bei einem Restriktionsverdau werden DNA-Sequenzen durch Restriktionsendonukleasen an bestimmten Erkennungssequenzen erkannt und spezifisch geschnitten. Die Enden der Schnittstellen sind entweder glatt (*blunt ends*) oder weisen einen kurzen einzelsträngigen Überhang (*sticky ends*) auf. Die Überhänge zweier DNA-Fragmente sind bei Verwendung des gleichen Restriktionsenzym somit zueinander komplementär und können ligiert werden. In dieser Arbeit wurde für die Klonierungen mit dem Restriktionsenzym *BsaI* die pASK-3/5-Vektoren und die PCR-Produkte im Doppelverdau zerschnitten. In den Restriktionsansatz wurden 15 µl Vektor oder 20 µl PCR-Produkt, 2,5 µl CutSmart® Puffer (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland), jeweils 1 µl *BsaI* gegeben und auf 25 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde bei 37 °C, wobei nach 30 min dem Vektor-Verdau 1 µl einer alkalische Phosphatase (FastAP) zugesetzt wurde, wodurch eine spätere Re-Ligation verhindert wurde. Die Ansätze wurden im Anschluss mit dem Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) aufgereinigt.

### 2.4.5 DNA-Ligation

Mithilfe der Ligation wurden verdaute PCR-Produkte mit dem verdauten Vektor über die zueinander kompatiblen Enden verbunden. Dazu wurde die T4-DNA-Ligase (Thermo-Scientific; Schwerte, Deutschland) verwendet, welche die 3'-Hydroxygruppen und 5'-Phosphatgruppen der Fragmente miteinander verbindet. Es wurden 12 µl des Inserts (geschnittenes PCR-Produkt), 4 µl des geschnittenen Vektors, 2 µl Ligase-Puffer (Thermo-Scientific; Schwerte, Deutschland) und 1 µl T4-DNA-Ligase miteinander vermischt und über Nacht bei 4 °C oder für 1 h bei RT inkubiert. Im Anschluss wurde die Ligation für 5 min bei 65 °C abgestoppt.

### 2.4.6 Sequenzierung von DNA

Über die Sequenzierung der erstellten Vektoren wurden diese auf Fehler oder putative Mutationen überprüft. Dazu wurden die Reaktionsansätze nach den Angaben von Eurofins Scientific SE (Wesseling, Deutschland) angefertigt. Die Sequenzierungsdaten wurden mit dem Programm Chromas Lite 2.1.1 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, Australien) und Clone Manager 9 (Sci-Ed Software, Denver, USA) ausgewertet.

### 2.4.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA wurde mit dem Monarch® Plasmid Miniprep Kit (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) isoliert. Dazu wurden 5 ml einer Übernachtskultur bei 8,000 rpm für 5 min pelletiert und nach den Angaben des Kits das entsprechende Plasmid isoliert. Das Prinzip der Isolierung beruht auf die Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikatmembran.

### 2.4.8 Transformation von *E. coli* durch Hitzeschock

Die Hitzeschock-Transformation wurde durchgeführt, um fremde Plasmid-DNA in *E. coli* einzubringen. Dabei wurde der Organismus Hitze ausgesetzt, um die DNA-Aufnahme zu steigern. Es wurden 10 µl kompetente *E. coli*-Zellen mit 2 µl Ligationsansatz (klonierter Vektor) für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für *E. coli* DH5α für 30 sec (10 Sekunden bei *E. coli* BL21) bei 42 °C. Darauf folgte eine 5-minütige Inkubation auf Eis. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Mediums wurden die Zellen für 60 min bei 37 °C zur Regeneration inkubiert. Darauf wurden 100 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die restlichen 900 µl wurden abzentrifugiert (8,000 rpm, 2 min), in 100 µl rH<sub>2</sub>O resuspendiert, ebenfalls auf LB-Agarplatten ausgestrichen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.4.9 RNA-Isolierung

RNA von *P. copri* oder *P. vulgatus* wurde mittels TRI-Reagent® Extraktion isoliert. Dazu wurden 50 ml Kultur während der exponentiellen Wachstumsphase bei 8 000 rpm für 10 min bei 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in 5 ml TRI-Reagent® resuspendiert, in 1 ml Volumen aliquotiert und bei -70 °C für 15 min weggefroren. Nachdem die Lösung wieder aufgetaut war, wurden pro 1 ml TRI-Reagent® 100 µl 1-Brom-3-chlorpropan zugefügt und gut vermischt. Die Mischung wurde für 15 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und anschließend bei 12 000 rpm, 4 °C für 10 min zentrifugiert. Durch die Phasenbildung wurden RNA, DNA und Proteine voneinander getrennt. Die wässrige Phase beinhaltet die RNA, die Interphase die DNA und die organische Phase die gesamten Proteine. Die obere Phase wurde pro 1 ml TRI-Reagent® mit 500 µl iso-Propanol versetzt, gevortext und bei -20 °C für 10 min inkubiert. Danach wurde die RNA bei 12 000 rpm, 4 °C für 10 min gefällt. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 75 % Ethanol pro 1 ml TRI-Reagent® gewaschen, resuspendiert und erneut bei 12,000 rpm, 4 °C für 5 min gefällt. Das RNA-Pellet wurde getrocknet und in 90 µl rH<sub>2</sub>O (RNase frei) aufgenommen. DNA-Verunreinigungen wurden durch einen Verdau bei 37 °C für 3 h mit 2 µl DNase I (Thermo- Scientific, Schwerte, Deutschland) und 10 µl DNase Puffer (Thermo- Scientific, Schwerte, Deutschland) entfernt. Nach 2 h wurden dem Ansatz zusätzlich 2 µl DNase I hinzugefügt. Die Aufreinigung der RNA erfolgte mit dem QUIAGEN RNeasy Mini Kit. Potenzielle DNA-Verunreinigungen wurden über eine PCR mit Primern für die entsprechenden Gene überprüft. Der DNA-Verdau wurde wenn nötig solange wiederholt, bis die

DNA-Banden im Agarose-Gel nicht mehr sichtbar waren. Darauf wurde mithilfe des Spektralphotometers BioSpectrometer® die RNA quantifiziert.

#### 2.4.10 RT-qPCR

Mit Hilfe der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) wurde die relative Menge der mRNA für bestimmte Gene in Relation zu nicht regulierten Referenzgenen (Housekeeping genes) beurteilt. Die notwendigen Oligonukleotide wurden mit dem Programm Primer3 erstellt, sodass eine Produktgröße von 100 – 200 bp amplifiziert wurde. Für die Durchführung der RT-qPCR wurde das Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (NEB, Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet und nach den entsprechenden Herstellerangaben gearbeitet. In einem Ansatz wurden zwischen 250 – 500 ng RNA eingesetzt. Die relative Quantifizierung der mRNA-Menge wurde für jedes zu untersuchende Gen in dreifacher Ausführung durchgeführt. Der CFX Connect™ RT-PCR Cycler von BioRad (München, Deutschland) wurde verwendet, um die Fluoreszenz des Farbstoffs zu messen. Das RT-qPCR-Programm wurde nach Herstellerangaben des Kits angewendet. Grundsätzlich korrelierte das messbare Fluoreszenzsignal mit der Menge an enthaltener doppelsträngiger DNA. Die Zykluszahl bei der ein bestimmter Schwellenwert (threshold) der Intensität der Fluoreszenz erreicht wird, wird als Ct-Wert definiert. Daher gilt, je geringer dieser Ct-Wert, desto mehr mRNA eines Gens befand sich in der Probe, wobei ein hoher Ct-Wert eine geringe Menge an RNA widerspiegelt. Für die Auswertung wurden die Ct-Werte der Gene von Interesse mit dem Ct-Wert eines Housekeeping-Genes verglichen ( $\Delta Ct$ ).

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Produktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

**Aerobe Produktion:** Für die aerobe Produktion rekombinanter Proteine wurden die *E. coli*-Zellen mit entsprechendem Plasmid in einer LB-Vorkultur mit Amp über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Die 200 ml MI-Hauptkultur mit Amp wurde 1 %ig inokuliert und bis zu einer  $OD_{600nm}$  0,3-0,5 bei 37 °C schüttelnd (180 rpm) inkubiert. Darauf erfolgte die Induktion der Überproduktion durch Anhydrotetracyclin (AHT; 200 ng/ml). Die Expression des klonierten Gens wird solange durch den *tet*-Repressor des pASK-IBA3/5 Vektor inhibiert, bis der *tet*-Promotor durch AHT induziert wird. Dabei bindet AHT an den *tet*-Repressor und löst diesen von der DNA, sodass das Zielgen hinter dem *tet*-Promotor transkribiert werden kann. Für die optimale Proteinproduktion wurden die Kultur entweder für 3-5 h bei 30 °C oder über Nacht bei 18 °C unter Schütteln (100 rpm) weiter inkubiert. Die Zellen wurden bei 8,000 rpm für 10 min geerntet.

**Anaerobe Produktion** (nach Kuchenreuther et al. 2010): Bei Proteinen mit sauerstoffsensitiven Cofaktoren oder prosthetischen Gruppen wie beispielsweise Eisen-Schwefel-Cluster, wurde die Produktion unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Durchgeführt wurden die Produktionen mit dem *E. coli*  $\Delta$ *iscR*-Stamm, da dem Organismus der Regulator IscR fehlt und dadurch die Beladung der [FeS]-Cluster nicht reguliert wird. Die *E. coli*  $\Delta$ *iscR*-Stämme mit entsprechendem Plasmid wurden in einer LB-Vorkultur (+ 100  $\mu$ g/ml Amp und 50  $\mu$ g/ml Kan) über Nacht bei 37 °C und 180 rpm angezogen. Die 200 ml Miller-LB-Hauptkultur (+ 100  $\mu$ g/ml Amp und 50  $\mu$ g/ml Kan) wurde mit 2 mM Eisenammoniumcitrat versetzt und 1 %ig inokuliert. Die Kultivierung wurde bei 37 °C und 180 rpm durchgeführt, bis eine OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,7 erreicht war. Nun wurde für die Induktion der Proteinproduktion 0,2  $\mu$ g/ml AHT zugefügt. Außerdem wurden 2 mM Cystein und und 25 mM Natrium-Fumarat zugegeben. Diese Zugaben erfolgten unter anaeroben Bedingungen (anaeroben-Zelt; 98 % N<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub>). Anschließend wurde die Kultur luftdicht mit einem Gummistopfen verschlossen und über Nacht bei 18 °C und 120 rpm inkubiert.

### 2.5.2 Zell-Lyse

Sowohl für die heterologe Proteinproduktion mit *E. coli*-Zellen als auch für die Produktion von Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri* und *P. vulgatus*, mussten die bakteriellen Zellen lysiert werden. Generell erfolgte der Aufschluss von *E. coli*, indem zunächst das Zellpellet der 200 ml Hauptkultur (2.5.1) in 10 ml Puffer W resuspendiert und mit 2  $\mu$ l Protease-Inhibitor versetzt wurde. Handelte es sich um die Zell-Lyse bei einer anaeroben Produktion, wurde das Pellet in anaeroben Puffer W mit 1  $\mu$ g/ml Resazurin und 5 mM DTT aufgenommen. Anschließend wurde pro 1 ml Kultur 1 min bei halbmaximaler Leistung mit gepulstem Ultraschall die Zellen aufgeschlossen. Zur Vermeidung der Protein-Denaturierung wurde die Lyse bei 4 °C vollzogen. Durch Zentrifugation (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) des Lysats wurden Zelltrümmer entfernt. Sollten Membranen und Cytoplasma präpariert werden, so wurde das *P. copri*- oder *P. vulgatus* Zellpellet in anaeroben Kaliumphosphatpuffer (40 mM Kaliumphosphatpuffer, 5 mM Dithioerythritol, 1  $\mu$ g/ml Resazurin, pH 7) resuspendiert und über gepulstem Ultraschall aufgeschlossen.

### 2.5.3 Proteinaufreinigung

Für die Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurde die Strep-Tag-Affinitätschromatographie verwendet. Diese Chromatographie basiert auf spezifischen Wechselwirkungen des Strep-Tags mit Strep-Tactin. Strep-Tactin wird als Säulenmaterial verwendet (Strep-Tactin® Superflow® Säulenmaterial, IBA, Göttingen, Deutschland), es handelt sich dabei um ein Derivat des Streptavidins. Das Säulenmaterial bindet Biotin, dessen Derivat Desthiobiotin und den Strep-Tag. Der verwendete

Strep-Tag ist eine acht Aminosäuren lange Sequenz und wird am C- oder N-Terminus mit Proteinen fusioniert. Rekombinante Proteine binden somit mit hoher Affinität über den fusionierten Strep-Tag an das Säulenmaterial und können im Anschluss aufgereinigt werden. Dazu wurde das Zell-Lysat über 1 ml (= 1 Säulenvolumen (CV)) Säulenmaterial gegeben, welches zuvor mit 4 CV Puffer W äquilibriert wurde. Darauf folgte ein Waschschriff mit 5 CV Puffer W, um unspezifisch bindende Proteine von der Säule zu lösen. Schließlich wurde das rekombinante Protein mit 6 x 0,5 CV Puffer E von der Säule eluiert. Dabei bindet Desthiobiotin mit einer viel höheren Affinität an das Strep-Tactin und verdrängt somit das rekombinante Protein. Die Elutionsfraktionen standen für nachfolgende Versuche zur Verfügung und wurden bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.5.4 Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen**

Für die Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri* und *P. vulgatus* wurde der jeweilige Organismus in 500 ml PYG Medium bis zu einer  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  von ca. 1,5 angezogen und bei 8000 rpm für 15 min geerntet. Das Zellpellet wurde in anaeroben Kaliumphosphatpuffer (40 mM Kaliumphosphatpuffer, 5 mM Dithioerythritol, 1  $\mu\text{g/ml}$  Resazurin, pH 7) resuspendiert und über gepulsten Ultraschall aufgeschlossen. Das Zell-Lysat wurde anschließend zentrifugiert (15000 rpm, 15 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und der erhaltende Überstand ultrazentrifugiert (150000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 1,5 h), wodurch letztlich Membranfragmente von der löslichen Proteinfraction abgetrennt wurden. Der Überstand der Ultrazentrifugation stellte die Cytoplasmafraction der Zellen dar und konnte in anaeroben Serumflaschen bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Die pelletierten Membranfraktionen wurden mit anaeroben Kaliumphosphatpuffer gewaschen, erneut für 1 h ultrazentrifugiert und anschließend ebenfalls in Glasflaschen bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **2.5.5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford (1976)**

In dieser Arbeit wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Bradford Reagenzes bestimmt (Bradford, 1976; Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland). Dabei handelt es sich um eine photometrische Methode zur Quantifizierung von Proteinen. Dafür wurden 20  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe mit 980  $\mu\text{l}$  Bradford-Reagenz versetzt und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Währenddessen bindet der im Reagenz enthaltende Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G-250 mit den positiv geladenen Seitenketten der Proteine, wodurch ein Komplex gebildet wird, der bei einer Wellenlänge von 595 nm absorbiert. Dabei nimmt die Absorption proportional zur Proteinkonzentration zu. Als Standard wurde eine BSA-Kalibrierungskurve verwendet.

### 2.5.6 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page, Laemmli, 1970) wurde in dieser Arbeit verwendet, um Proteine in einer Matrix aus Polyacrylamid elektrophoretisch aufzutrennen. Vor der Auftrennung wurden die Protein-Proben 1:1 mit SDS-Ladepuffer bei 95 °C für 10 min gekocht. Durch die Hitze wurden die Proteine denaturiert und das im Puffer enthaltene 2-Mercaptoethanol reduzierte die Disulfidbrücken zwischen den Proteinen. SDS (Natriumdodecylsulfat) lagerte sich an die Proteine an und führte zu einer einheitlichen negativen Ladung, sodass die Proteine lediglich nach ihrer Größe im Trenngel aufgetrennt wurden. Die Porengröße der Matrix kann durch die Konzentration an Polyacrylamid bestimmt werden. Bei der diskontinuierlichen SDS-Page handelt es sich um das Prinzip eines weitporigen Sammel- und feinporigen Trenngels. Die Proteine werden im Sammelgel (pH 6,8) angesammelt und aufkonzentriert. Im anschließenden Trenngel (pH 8,8) erfolgt dann die Auftrennung nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld. Neben den Proben wurde der Größenstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo-Scientific, Schwerte, Deutschland) aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte im Sammelgel bei 60 V und im Trenngel bei 90 V für ca. 3 h. In Tabelle 12 findet sich die Auflistung der verwendeten Polyacrylamidgele.

**Tabelle 12:** Zusammensetzung der verwendeten Polyacrylamidgele.

Komponente	Sammelgel 5 %	Trenngel 12,5 %
Trenngelpuffer	-	1,2 ml
Sammelgelpuffer	400 µl	-
Rotiophorese 40 Acrylamid-Lösung	250 µl	2,0 ml
SDS-Lösung (0,5 %)	400 µl	1,2 ml
APS-Lösung (10 %)	30 µl	30 µl
TEMED	5 µl	5 µl
rH <sub>2</sub> O	950 µl	1,6 ml

### 2.5.7 Silberfärbung

Mit Hilfe der Silberfärbung können Proteine, die durch eine denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, im Polyacrylamidgel sichtbar gemacht werden (Blum *et al.*, 1987). Das Grundprinzip dieser Methode basiert auf der Bindung von Silberionen durch die negativ geladenen Seitenketten der Proteine. Durch anschließende Reduktion der Silberionen durch Formaldehyd zu elementarem Silber werden die gebundenen Proteine sichtbar. Die Prozedur der Silberfärbung wurde bei Raumtemperatur und konstantem Schütteln durchgeführt. Dafür wurden die Polyacrylamidgele zunächst in Fixierlösung für 20 min und im Anschluss für 10 min in 50 % [v/v] Methanol inkubiert. Nach einem Waschschriff mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wurde für 1 min Thiosulfatlösung hinzugegeben und erneut zweimal mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Das Gel wurde für 20 min in der Imprägnierlösung gelegt und danach erneut mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen. Durch das Hinzufügen der Entwicklerlösung und einer Inkubation im Dunkeln bei 4 °C wurde die beschriebene Silberreaktion sichtbar.

### 2.5.8 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis rekombinanter Proteine, wurden die Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Nitrocellulosemembran (Bio-Rad, München, Deutschland) transferiert und anschließend spezifisch über Immundetektion angefärbt. Die Detektion erfolgte über die Bindung des Streptactin-HRP (Meerrettichperoxidase)-Konjugat an den Strep-Tag der rekombinanten Proteine. Über die gekoppelte HRP war ein Farbnachweis möglich, bei dem die Peroxidase 4-Chloro-1-Naphthol reduzierte und Wasserstoffperoxid oxidierte, wodurch eine dunkel violette Färbung entstand. Dadurch konnten Proteine, die mit dem Strep-Tag fusioniert waren, über Immundetektion nachgewiesen werden. Der Transfer der Proteine auf die Membran wurde mittels Semi-Dry-Blot durchgeführt. Dazu wurde das Polyacrylamidgel mit der Nitrocellulosemembran zwischen in Towbin-Puffer äquilibrierten Whatman-Papieren in der Semi-Dry-Blot-Kammer gelegt. Die Übertragung wurde bei 15 V für 25 min vollzogen. Nachdem der Transfer abgeschlossen war, wurde die Membran für 1 h in Blockierlösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren und anschließend dreimal für 5 min mit 1 x PBS gewaschen. Die Nitrocellulosemembran wurde in 10 ml 1 x PBS und 2,5 µl Streptactin-HRP-Konjugat unter Schütteln für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgten erneut drei Waschschrte mit 1 x PBS. Zum Schluss wurde die Membran in 20 ml 1 x PBS, 200 µl 4-Chloro-1-Naphthol und 25 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) gelegt und im Dunkeln gefärbt.

### 2.5.9 Probenanalyse mittels HPLC

**Analyse von Kulturüberständen:** Die Kulturüberstände wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) untersucht. Dadurch konnte der Substratverbrauch und die Produktbildung mithilfe von Standardsubstanzen bestimmt werden. Dafür wurde eine HPLC-Anlage der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) mit einer Aminex-HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule (Bio-Rad, München) verwendet. Als Laufmittel wurde 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einer Flussrate von 0,6 ml pro min bei 65 °C eingesetzt. Die Proben wurden sowohl mit einem Brechungsindexdetektor als auch mit einem UV-Detektor bestimmt.

**Detektion der Intermediate des SBPPs:** Die Aktivitäten der Enzyme des SBPPs in *P. copri* wurden über die Detektion der Intermediate und Produkte der enzymatischen Reaktionen nachgewiesen. Für die Untersuchungen wurde das SpectraSYSTEM HPLC System (Thermo- Scientific; Schwerte, Deutschland) verwendet, welches mit einem Entgaser (SpectraSystem SCM1000), einer Pumpe (SpectraSystem P4000), einem Autosampler (SpectraSYSTEM AS3000) und einem Brechungsindex (RI)-Detektor (Shodex RI 101; Showa Denko Europe GmbH, München, Deutschland) ausgestattet war. Die Trennung der Substanzen erfolgte mit einer Shodex-Säule Asahipak NH<sub>2</sub>P-50G 3E (250 x 3,0 mm) in Kombination

mit der Guardsäule Asahipak-Säule NH<sub>2</sub>P-50G 3A (10 x 3,0 mm) und dem Linienfilter Asahipak NH<sub>2</sub>P-LF (75 x 8,0 mm) bei 40 °C unter Verwendung von 15 oder 130 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 4,4 als mobile Phase.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl-Puffer pH 7, 0,2 mM TPP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM R5P, 5 mM PPI und 50 µg der jeweiligen Enzyme des SBPPs. Die Ansätze wurden 30 Minuten bei RT inkubiert, wobei der FBP-Aldolase-Assay für 2,5 Stunden bei RT inkubiert wurde und 85 µg FBP-Aldolase enthielt. Für den Nachweis der Produkte der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase wurde 15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> als mobile Phase verwendet. Zur Verkürzung der Retentionszeit und zum Nachweis von SBP wurde 130 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> für die Reaktionen der PPI-PFK und der FBP-Aldolase als Laufmittel verwendet. Von jeder Reaktionsmischung wurden 50 µl entnommen und mit 50 µl reinem Ethanol gemischt. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation (20000 x g, 1 min) abgetrennt und der Überstand wurde mit 100 µl der mobilen Phase verdünnt. Anschließend wurde der Überstand auf die HPLC-Anlage gegeben.

**Detektion des Intermediate des Citratzyklus:** Die Aktivitäten der Enzyme des Citratzyklus aus *P. vulgaris* wurden über die Detektion der Intermediate und Produkte der enzymatischen Reaktionen nachgewiesen. Für die Untersuchungen wurde die HPLC-Anlage der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) mit einer Aminex-HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule (Bio-Rad, München) verwendet. Als mobile Phase wurde 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einer Flussrate von 0,6 ml pro min bei 65 °C eingesetzt. Die Proben wurden sowohl mit einem Brechungsindexdetektor als auch mit einem UV-Detektor bestimmt.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 100 µg *P. vulgaris* Membranfraktion, 0,25 mM NAD<sup>+</sup>, 0,25 mM NADH, 10 mM Citrat, 10 µM Ferredoxin, 10 mM Oxalacetat, 10 mM Acetat, 0,5 mM CoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7 und jeweils 10 µg der rekombinant aufgereinigten Citrat-Synthase, Aconitase, Isocitrat-Dehydrogenase, Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, SCACT, Malat-Dehydrogenase und Fumarase. Die Ansätze wurden bei 37 °C anaerob inkubiert und nach bestimmten Zeitabständen 150 µl zur Analyse entnommen. Zum Abstoppen der Reaktionen wurden die Proben bei 65°C für 20 min inkubiert und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 3 min). Anschließend wurde der Überstand auf die HPLC-Anlage gegeben.

**Aktivitätsbestimmung der SCACT im Cytoplasma von *P. vulgaris*:** Die Aktivität der SCACT im Cytoplasma erfolgte in einem gekoppelten Enzymtest mithilfe des gereinigten Proteins α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978-0979). Dabei wurde α-Ketoglutarat zu Succinyl-CoA mithilfe des Hilfsenzym α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase umgewandelt. Anschließend wurde Succinyl-CoA zu Succinat und Acetyl-CoA katalysiert durch die SCACT umgeformt. Das gebildete Succinat konnte über die HPLC bestimmt werden. Durch die Succinat Konzentration in µmol pro mg

Cytoplasma-Protein, konnte die Aktivität der SCACT berechnet werden. Für die Untersuchungen wurde die HPLC-Anlage der Firma Knauer (Berlin, Deutschland) mit einer Aminex-HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule (Bio-Rad, München) verwendet. Als mobile Phase wurde 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit einer Flussrate von 0,6 ml pro min bei 65 °C eingesetzt. Die Proben wurden sowohl mit einem Brechungsindexdetektor als auch mit einem UV-Detektor bestimmt.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 40 mM Tris/HCl Puffer pH 7, 7 mM Methylviologen, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CoA, 10 mM α-Ketoglutarat, 10 mM Acetat, 5 µg α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und 0-0,2 mg Cytoplasma. Die Ansätze wurden bei 37 °C anaerob inkubiert und nach bestimmten Zeitabständen 100 µl zur Analyse entnommen. Zum Abstoppen der Reaktionen wurden die Proben mit 30 µl 3 M Perchlorsäure versetzt und anschließend zentrifugiert (13000 rpm, 3 min). Darauf wurde der Überstand auf die HPLC-Anlage gegeben.

### 2.5.10 Photometrische Messungen zur Bestimmung von Enzymaktivitäten

In dieser Arbeit wurden über photometrische Messungen die Aktivitäten verschiedener Enzyme in aufgereinigter Form, im Cytoplasma oder in Membranfraktionen charakterisiert. Dabei wurde insbesondere darauf geachtet, ob die Enzyme die bioinformatisch hervorgesagte Reaktion katalysierten und welche Reaktionsgeschwindigkeit dabei vorlag.

In nahezu allen Messungen wurden die enzymatischen Reaktionen photometrisch über ein Substrat, welches während der Reaktion seine Absorption ändert (beispielsweise NADH/NAD<sup>+</sup> oder Methylviologen), verfolgt. Für einige Enzyme erfolgte die Aktivitätsbestimmung über die Kopplung mit weiteren Enzymreaktionen, über die eine photometrische Messung möglich war. Dabei wurden die Hilfsenzyme generell in einer nicht-limitierenden Menge eingesetzt. Häufig wurden kommerziell erworbene Hilfsenzyme verwendet, die von den Firmen Sigma-Aldrich (Schwerte, Deutschland) oder Megazyme (Bray, Irland) bezogen wurden. Somit konnte über die Änderung der Absorption pro min ( $\Delta E/\text{min}$ ) die Enzymgeschwindigkeit und die Menge der umgesetzten Substratmoleküle ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) bestimmt werden.

#### 2.5.10.1 Aktivitätsmessungen der aufgereinigten Enzyme des SBPPs aus *P. copri*:

**R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase:** Die Aktivitäten der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase wurden mithilfe der kommerziell erworbenen Enzyme Triosephosphat-Isomerase und α-Glycerophosphat-Dehydrogenase in einem gekoppelten Enzym-Assay bestimmt. Ausgehend von R5P wurde die Isomerisierung zu Ru5P katalysiert durch die R5P-

Isomerase, die Umwandlung zu Xu5P durch die RuP-3-Epimerase und die Umformung von Xu5P und R5P zu GAP und S7P katalysiert durch die Transketolase bestimmt. Dies erfolgte indem GAP durch die Triosephosphat-Isomerase zu DHAP umgeformt wurden. DHAP wurde anschließend zu  $\alpha$ -Glycerophosphat reduziert, wobei die Elektronen von NADH auf DHAP übertragen wurden. Die letztere Reaktion konnte aufgrund des Absorptionsverhalten von NADH photometrisch bei 340 nm verfolgt werden.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM R5P, 125  $\mu$ M NADH, jeweils 20  $\mu$ g der Enzyme (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase) und jeweils 2 U der Hilfsenzyme (Triosephosphat-Isomerase und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase).

**PPi-PFK:** Die Aktivität der PPi-PFK wurde in einem gekoppelten Enzymtest mit den Hilfsenzymen R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase ausgehend von R5P bestimmt. Das entstehende S7P wurde durch die PPi-PFK zu SBP phosphoryliert, wobei der Phosphoryl-Donor PPi darstellte. Der Nachweis erfolgte über die Detektion von freiwerdenden Pi über einen photometrischen Assay nach Saheki et al. (1985). Pi reagiert in dem photometrischen Assay als blauer Molybdat-Komplex, welcher bei 850 nm ein Absorptionsmaximum aufweist. Die zunehmende Absorption des Chromophors korrelierte mit der Zunahme an freigesetztem Pi.

Der 1 ml Ansatz beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM R5P, 2 mM PPi und jeweils 20  $\mu$ g der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase und PPi-PFK. Für den Nachweis wurden alle 5 min 25  $\mu$ l aus dem Enzymtest entnommen und mit 1 ml Molybdat-Reagenz (15 mM Ammoniummolybdat, 100 mM Zinkacetat, pH 5) und 250  $\mu$ l 10 % (w/v) Ascorbinsäure gemischt. Die Suspension wurde 15 min bei 30 °C inkubiert und anschließend wurde die Absorption des Chromophors bei 850 nm gemessen. Eine Eichkurve mit Pi ( $KH_2PO_4$  und  $K_2HPO_4$  pH 7; 0-1 mM) wurde zur Berechnung der Phosphatkonzentration erstellt. Die Hintergrundreaktion wurde subtrahiert, indem der Enzymtest ohne R5P eingesetzt wurde.

**FBP-Aldolase:** Die Aktivität der FBP-Aldolase wurde ausgehend von R5P mithilfe der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPi-PFK und dem kommerziell erworbenen Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase bestimmt. Die Spaltung von SBP in E4P und DHAP durch die FBP-Aldolase konnte durch die Reduktion von DHAP katalysiert durch die  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase photometrisch bei 340 nm beobachtet werden. Dabei wurden die Elektronen von NADH auf DHAP übertragen.

Der 1ml Ansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM R5P, 2 mM PPi, 125  $\mu$ M NADH und jeweils 20  $\mu$ g der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPi-PFK und FBP-Aldolase und 2 U des Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase.

**Transketolase:** Die Aktivität der zweiten Transketolase-Reaktion im SBPP, konnte mithilfe der kommerziell erworbenen Hilfsenzyme Glucose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase ermittelt werden. Ausgehend von R5P wurde mit den Enzymen R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPI-PFK und FBP-Aldolase die Umformung von Xu5P und E4P zu F6P und GAP katalysiert durch die Transketolase bestimmt. Anschließend wurde F6P zu G6P durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase umgewandelt und G6P durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert. Bei der letzteren Reaktion werden die Elektronen auf NADP<sup>+</sup> übertragen, weshalb die Enzymaktivität bei 340 nm beobachtet werden konnte.

Der 1ml Assay beinhaltetete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH 7, 0,2 mM TPP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM R5P, 2 mM PPI, 125 µM NADP<sup>+</sup> und jeweils 20 µg der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPI-PFK, FBP-Aldolase und 2 U der Hilfsenzyme Glukose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Der Versuchsansatz wurde ohne Hilfsenzyme und NADP<sup>+</sup> 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 125 µM NADP<sup>+</sup> gestartet.

**Charakterisierung der PPI-PFK und der ATP-PFK:** In dieser Arbeit wurden die beiden Enzyme PPI-PFK (PREVCOP\_03899) und ATP-PFK (PREVCOP\_04138) aus *P. copri* enzymatisch genauer charakterisiert. Grundsätzlich erfolgte dies über einen gekoppelten Assay mithilfe der kommerziell erworbenen Enzyme FBP-Aldolase und α-Glycerophosphat-Dehydrogenase. Dabei wurde entweder F6P oder S7P durch die entsprechende PFK phosphoryliert und das Produkt (FBP, SBP) durch die FBP-Aldolase gespalten (DHAP und GAP oder DHAP und E4P). DHAP wurde durch die α-Glycerophosphat-Dehydrogenase zu α-Glycerophosphat reduziert, wobei die Elektronen von NADH auf DHAP übertragen wurden. Aufgrund der NADH-Oxidation konnte die Reaktion bei 340 nm beobachtet werden. Mithilfe der Änderung der Absorption pro Minute (ΔE/min) und dem Lambert-Beer'schen-Gesetz wurde die spezifische Aktivität berechnet. Die spezifische Aktivität wird durch U/mg definiert, wobei ein U der Umsetzung von 1 µmol Substrat pro Minute entspricht.

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\frac{\Delta E}{\text{min}} \times V}{\epsilon_{340\text{nm}} \times d \times v \times c}$$

ΔE/min = Absorptionsänderung pro min

V = Totales Volumen des Assays [ml]

ε<sub>340nm</sub> = Extinktionskoeffizient von NADH [6,22 mM<sup>-1</sup> x cm<sup>-1</sup>]

d = Küvettendicke [1 cm]

v = Probenvolumen des Proteins [ml]

c = Proteinkonzentration [mg/ml]

Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde bei einer konstanten Temperatur von 25 °C gemessen. Der eingesetzte Puffer variierte zwischen einem pH-Wert von 5-10. Dabei wurde ein kombinierter Puffer verwendet (50 mM Acetat, 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM Tris-HCl). Bei der Ermittlung des Temperaturoptimums wurde Tris-HCl Puffer pH 8 verwendet und der Temperaturbereich von 20-70 °C abgedeckt.

Der 1 ml Assay beinhaltet: 50 mM Puffer, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 U FBP-Aldolase, 2 mM F6P, 2 U  $\alpha$ -Glycerophosphat Dehydrogenase, 2,5  $\mu\text{g}$  ATP-PFK (2 mM ATP) oder 0,1  $\mu\text{g}$  PPI-PFK (2 mM PPI) und 250  $\mu\text{M}$  NADH.

Für die Bestimmung der Substrataffinität ( $K_m$ -Wert) und der maximalen spezifischen Enzymaktivität ( $V_{\text{max}}$ ) der jeweiligen PFK für F6P/S7P und PPI/ATP wurden die Substrate in folgenden Konzentrationen variiert: F6P 0 - 20 mM, S7P 0-10 mM, ATP 0 – 3 mM und PPI 0 – 1,5 mM. Die Messungen erfolgten beim optimalen pH Wert von 8 und physiologischer Temperatur von *P. copri* (37 °C). Für das Substrat S7P wurde das Assay-Volumen auf 60  $\mu\text{l}$  reduziert und die Enzymmenge auf 20  $\mu\text{g}$  ATP-PFK und 0,2  $\mu\text{g}$  PPI-PFK erhöht. Für die Kinetik in Bezug auf F6P und S7P wurden ATP und PPI in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt. Im Gegensatz dazu erfolgte für die Erfassung der kinetischen Daten für ATP und PPI, ein Einsatz von 5 mM F6P für die ATP-PFK und von 10 mM F6P für die PPI-PFK. Die errechneten spezifischen Aktivitäten der ATP-PFK und der PPI-PFK wurden graphisch gegen jeweils die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen und mit dem Programm GraphPad Prism 7 über eine nicht-lineare Regression analysiert.

#### **2.5.10.2 Messungen der FBP-Aldolase und PPI-PFK im Cytoplasma von *P. copri*:**

Im Cytoplasma von *P. copri* wurden die Aktivitäten der PPI-PFK und der FBP-Aldolase in Kombination untersucht. Dabei wurde ausgehend von S7P die Phosphorylierung von S7P zu SBP katalysiert durch die PPI-PFK und die darauf folgende Spaltung von SBP zu DHAP und E4P durch die FBP-Aldolase mithilfe des Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase nachgewiesen. Die  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase reduzierte das Reaktionsprodukt DHAP zu  $\alpha$ -Glycerophosphat, wobei die Elektronen von NADH auf DHAP übertragen wurden. Die NADH-Oxidation konnte bei 340 nm beobachtet werden. Die Reaktion der FBP-Aldolase im Cytoplasma wurde nachgewiesen, indem heterolog produzierte PPI-PFK (20  $\mu\text{g}$ ) zugefügt wurde. Für den Nachweis der PPI-PFK im Cytoplasma wurde wiederum heterolog produzierte FBP-Aldolase (20  $\mu\text{g}$ ) hinzugegeben.

Der 60  $\mu\text{l}$  Ansatz beinhaltet: 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM PPI, 1 mM S7P, 250  $\mu\text{M}$  NADH and 80  $\mu\text{g/ml}$  Cytoplasma.

Außerdem wurde untersucht, ob eine potenzielle Transaldolase-Reaktion im Cytoplasma nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die Hilfsenzyme Glucose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase sowie die Substrate S7P und GAP verwendet. Bei einer vorhandenen Transaldolase-Reaktion würden S7P und GAP durch die Transaldolase in F6P und E4P umgeformt. Das gebildete Produkt F6P würde durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase in G6P umgewandelt und anschließend durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert. Die Elektronen würden von G6P auf  $\text{NADP}^+$  übertragen, weshalb die Aktivität bei 340 nm detektiert werden könnte. Um den Assay zu überprüfen wurde 1 mM F6P zugefügt.

Der 60  $\mu\text{l}$  Ansatz beinhaltet: 50 mM Tris/HCl Puffer pH 8, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM S7P, 1 mM GAP, 250  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  und 80  $\mu\text{g/ml}$  Cytoplasma.

### 2.5.10.3 Aktivitätsmessung von BVU\_3333

In dieser Arbeit wurde die Aktivität des Enzyms BVU\_3333 aus *P. vulgatus* auf F6P-Aldolase- und Transaldolase Aktivität untersucht.

**Überprüfung der potenziellen F6P-Aldolase-Aktivität:** Die Analyse der F6P-Aldolase-Aktivität erfolgte über zwei verschiedene Nachweismethoden. Bei der ersten Messung wurde die Spaltung von F6P in DHA und GAP putativ katalysiert durch BVU\_3333 mithilfe der kommerziell erworbenen GAP-Dehydrogenase analysiert. Die GAP-Dehydrogenase oxidiert GAP zu Phosphoglycerat, wobei die Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  übertragen werden und die Reaktion deshalb bei 340 nm beobachtet werden kann. Außerdem wurde die mögliche Bildung von F6P aus DHA und GAP katalysiert durch BVU\_3333 mithilfe einer G6P-Isomerase und einer G6P-Dehydrogenase überprüft. Das Reaktionsprodukt F6P würde durch das erste Hilfsenzym zu G6P isomerisiert und daraufhin würde G6P durch die G6P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert. Bei der letzteren Reaktion würden die Elektronen von G6P auf  $\text{NADP}^+$  übertragen, weshalb die Reaktion bei 340 nm nachweisbar wäre.

Der 1 ml Ansatz für die Bestimmung der F6P-Spaltung enthielt: 50 mM Tris/HCl pH 8; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM F6P, 2 U GAP-Dehydrogenase, 250  $\mu\text{M}$   $\text{NAD}^+$  und 0-15  $\mu\text{g}$  BVU\_3333.

Der 1 ml Ansatz für die Bestimmung der F6P-Bildung enthielt: 50 mM Tris/HCl pH 8; 2 mM DHA, 2 mM GAP, 2 U G6P-Isomerase, 2 U G6P-Dehydrogenase, 250  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  und 0-15  $\mu\text{g}$  BVU\_3333.

**Überprüfung der Transaldolase-Aktivität:** Die Transaldolase-Aktivität von BVU\_3333 wurde mithilfe der kommerziell erworbenen Enzyme G6P-Isomerase und G6P-Dehydrogenase bestimmt. Dabei

formte BVU\_3333 GAP und S7P zu E4P und F6P um, wobei das Produkt F6P durch die G6P-Isomerase zu G6P umgeformt und G6P durch die G6P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert wurde. Bei dieser Oxidation wurden die Elektronen von G6P auf  $\text{NADP}^+$  übertragen, weshalb die Reaktion bei 340 nm detektiert werden konnte.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl pH 8; 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 mM S7P, 0,5 mM GAP, 2 U G6P-Isomerase, 2 U G6P-Dehydrogenase, 250  $\mu\text{M}$   $\text{NADP}^+$  und 0-15  $\mu\text{g}$  BVU\_3333.

#### **2.5.10.4 Aktivitätsmessungen der aufgereinigten Enzyme des Citratzyklus aus *P. vulgatus*:**

In dieser Arbeit wurden die Aktivitäten der Enzyme des Citratzyklus bestimmt. Teilweise mussten die Assays anaerob durchgeführt werden, weshalb im Anaeroben-Zelt (98 %  $\text{N}_2$  und 2 %  $\text{H}_2$ ) und mit anaeroben Substraten (Lösungen wurden mit  $\text{N}_2$  begast und luftdicht verschlossen) gearbeitet wurde. Der notwendige Puffer der anaeroben Enzymtests wurde außerdem mit 5 mM DTT und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Resazurin versetzt. Die Messungen wurden grundsätzlich bei 37 °C durchgeführt.

**Citrat-Synthase:** Der Aktivitätsnachweis der Citrat-Synthase basierte auf dem Absorptionsverhalten der Substrate Oxalacetat und Acetyl-CoA und dem Produkt Citrat bei einer Wellenlänge von 295 nm. Acetyl-CoA und Citrat wiesen bei 295 nm kaum eine Absorption auf, wohingegen Oxalacetat bei dieser Wellenlänge im Vergleich stark absorbierte. Für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Oxalacetat bei 295 nm, wurde die Absorption von verschiedenen Oxalacetat-Konzentrationen 0,5 – 4 mM bei 295 nm bestimmt und darüber der Extinktionskoeffizient berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient von Oxalacetat bei 295 nm betrug  $\epsilon = 0.34 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Die Umsetzung von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat konnte deshalb photometrisch bei 295 nm beobachtet werden.

Der 500  $\mu\text{l}$  Ansatz beinhaltete: 40 mM Phosphat Puffer pH 7, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM Oxalacetat, 1 mM Acetyl-CoA und 0-20  $\mu\text{g}$  Citrat-Synthase.

**Aconitase:** Die Aktivität der Aconitase wurde in einem gekoppelten Enzymtest mithilfe der Isocitrat-Dehydrogenase BVU\_1960 bestimmt. Da die Aconitase sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Cluster aufweist, wurden die Enzymtest im Anaeroben-Zelt (98 %  $\text{N}_2$  und 2 %  $\text{H}_2$ ) durchgeführt. Citrat wurde katalysiert durch die Aconitase zu Isocitrat umgewandelt und anschließend konnte Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat durch die Isocitrat-Dehydrogenase oxidiert werden. Die Elektronen wurden dabei von Isocitrat auf  $\text{NAD}^+$  übertragen, weshalb die Reaktion bei 340 nm beobachtet werden konnte.

Der 1 ml Ansatz beinhaltete: 50 mM Phosphat Puffer pH 7, 5 mM Citrat, 0,25 mM  $\text{NAD}^+$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10  $\mu\text{g}$  Isocitrat-Dehydrogenase und 0-20  $\mu\text{g}$  Aconitase.

**Isocitrat-Dehydrogenase:** Die Oxidation von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat katalysiert durch die Isocitrat-Dehydrogenase wurde bei 340 nm gemessen, da die Elektronen von Isocitrat auf  $\text{NAD}^+$  übertragen wurden.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 50 mM Tris-HCl pH 8, 0,25 mM  $\text{NAD}^+$ , 5 mM Isocitrat, 5 mM  $\text{MgCl}_2$  und 0-4  $\mu\text{g}$  Isocitrat-Dehydrogenase.

**$\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase:** Die Aktivität der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase konnte über den natürlichen Elektronenakzeptor Ferredoxin als auch mit einem alternativen Elektronenakzeptor Methylviologen bestimmt werden. Da die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Cluster aufweist, wurden die Enzymtest im Anaeroben-Zelt (98 %  $\text{N}_2$  und 2 %  $\text{H}_2$ ) durchgeführt. Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase oxidierte  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA, wobei die Elektronen entweder auf oxidiertes Ferredoxin oder oxidiertes Methylviologen übertragen wurden. Photometrisch konnte die Oxidation von  $\alpha$ -Ketoglutarat aufgrund des Absorptionsverhalten der Elektronencarrier bei 390 nm für Ferredoxin und bei 604 nm für Methylviologen verfolgt werden.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 40 mM Phosphat Puffer pH 7, 7 mM Methylviologen, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM CoA, 10 mM Ketoglutarat und 0,15-0,8  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase.

Für den Einsatz von oxidiertem Ferredoxin als Elektronenakzeptor, wurde Ferredoxin aus *Clostridium pasteurianum* (zur Verfügung gestellt von F. Steiniger, Doktorand AG Deppenmeier) verwendet. Der 700  $\mu\text{l}$  Ansatz enthielt: 40 mM Phosphat Puffer pH 7, 9  $\mu\text{M}$  Ferredoxin, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM CoA, 10 mM Ketoglutarat und 0,2-0,8  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase.

**Succinyl-CoA:Acetat-CoA-Transferase:** Die Aktivität der SCACT wurde über einen gekoppelten Enzymtest mit den Hilfsenzymen  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase BVU\_0978-0979 und der Acetyl-CoA-Synthetase aus *Methanosaeta thermophila* in einem diskontinuierlichen Enzymassay bestimmt.  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in Abhängigkeit von Methylviologen zu Succinyl-CoA oxidiert. Succinyl-CoA wurde daraufhin durch die SCACT in Succinat umgeformt. Bei dieser Reaktion wurde CoA von Succinyl-CoA auf ein Acetat-Molekül übertragen, wobei Acetyl-CoA gebildet wurde. Für den Nachweis erfolgte dann die Umformung von Acetyl-CoA, P<sub>i</sub> und AMP zu Acetat, CoA und ATP mithilfe des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase. Das gebildete ATP konnte über einen Luciferin-Luciferase-Assay quantifiziert werden.

Der 500  $\mu\text{l}$  Ansatz beinhaltete: 50 mM HEPES Puffer pH 7, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 7 mM Methylviologen, 0,5 mM CoA, 10 mM Ketoglutarat, 10  $\mu\text{g}$   $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, 10  $\mu\text{g}$  Acetyl-CoA-Synthetase, 10 mM Acetat, 2 mM P<sub>i</sub>, 5 mM AMP und 0 oder 0,5  $\mu\text{g}$  SCACT.

Der Assay wurde bei 37 °C inkubiert und jeweils 50 µl Probe entnommen. Diese Proben wurden zum Abstoppen der Reaktionen mit 20 µl 3 M Perchlorsäure versetzt. Anschließend wurden 6,5 µl gesättigte Kaliumcarbonat-Lösung und 40 µl 400 mM Natrium-TES-Puffer pH 7,4 zugefügt. Die Proben wurden bei 13000 rpm für 3 min zentrifugiert und 20 µl des Überstandes mit 180 µl ATP-Bestimmungspuffer (5 mM Natrium-Arsenat, 4 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glycylglycin pH 8) versetzt. Für den Luciferin-Luciferase-Assay wurden anschließend 50 µl Glühwürmchen-Laternen-Extrakt (nach Herstellerangaben angesetzt, Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Lichtemissionen konnten mithilfe des Plattenlesegeräts Infinite<sup>®</sup> (Tecan, Männedorf, Schweiz) detektiert werden. Über eine ATP-Kalibrierungskurve mit bekannten ATP-Konzentrationen konnte die ATP-Konzentration in den Proben bestimmt werden. Der Nachweis basiert darauf, dass die Luciferase im Glühwürmchen-Laternen-Extrakt mit molekularem Sauerstoff Luciferin zu Oxoluciferin oxidiert und gleichzeitig ATP hydrolysiert. Bei der Oxidation wird ein Lichtquant abgegeben, wobei die Menge des erzeugten Lichts proportional zur Menge des umgesetzten ATP ist.

**Malat-Dehydrogenase:** Der Aktivitätsnachweis der Malat-Dehydrogenase erfolgte über die Reduktion von Oxalacetat zu Malat. Die Elektronen wurden von NADH auf Oxalacetat übertragen, wobei die NADH-Oxidation bei 340 nm verfolgt werden konnte.

Der 1 ml Ansatz enthielt: 50 mM Phosphatpuffer pH 7; 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Oxalacetat, 0,25 mM NADH und 0-2,5 µg Malat-Dehydrogenase.

**Fumarase:** Der Nachweis der Fumarase-Aktivität basierte auf dem Absorptionsverhalten des Substrats Malat und des Produkts Fumarat bei einer Wellenlänge von 290 nm. Malat absorbierte bei 290 nm kaum, wohingegen Fumarat bei dieser Wellenlänge stark absorbierte. Für die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten von Fumarat bei 290 nm, wurde die Absorption von verschiedenen Fumarat-Konzentrationen 0,5 – 4 mM bei 290 nm bestimmt und darüber der Extinktionskoeffizient berechnet. Der molare Extinktionskoeffizient von Fumarat bei 290 nm betrug  $\epsilon = 0.38 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Die Umsetzung von Malat zu Fumarat konnte deshalb photometrisch bei 290 nm beobachtet werden. Da die Fumarase sauerstoffsensitive Eisen-Schwefel-Cluster aufweist, wurden die Enzymtest im Anaeroben-Zelt (98 % N<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub>) durchgeführt.

Der 700 µl Ansatz enthielt: 50 mM Phosphatpuffer pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM D/L-Malat und 0-4 µg Fumarase.

### 2.5.10.5 Messungen des Citratzyklus im Cytoplasma und in Membranfraktionen von *P. vulgatus*:

Die Aktivitäten der Enzyme des Citratzyklus wurden in cytoplasmatischen- und Membran-Fractionen aus *P. vulgatus* bestimmt. Die Messungen wurden unter anaeroben Bedingungen im Anaeroben-Zelt (98 % N<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub>) durchgeführt. Generell wurden dieselben Messmethoden der Aktivitätsbestimmungen der aufgereinigten Enzyme des Citratzyklus angewendet (s. 2.5.10.4), dabei wurde anstelle von aufgereinigtem Enzym cytoplasmatische Fractionen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Allerdings gab es auch einige Abwandlungen und neue Methoden die im Folgenden aufgelistet werden:

**Aconitase:** Die Aktivität der Aconitase im Cytoplasma wurde durch einen gekoppelten Enzymtest mit den gereinigten Enzymen Isocitrat-Dehydrogenase (BVU\_1960) und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978-0979) bestimmt. Die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat katalysiert durch die Aconitase, konnte deshalb photometrisch bei 604 nm bestimmt werden. Dabei wurde Isocitrat durch das Hilfsenzym Isocitrat-Dehydrogenase zu  $\alpha$ -Ketoglutarat oxidiert und  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde anschließend durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Succinyl-CoA umgeformt. In der letzteren Reaktion werden die Elektronen von  $\alpha$ -Ketoglutarat auf oxidiertes Methylviologen übertragen, weshalb die Enzymaktivität der Aconitase bei 604 nm beobachtet werden konnte.

Der 700  $\mu$ l Ansatz enthielt: 40 mM Phosphatpuffer pH 7, 10 mM Citrat, 5 mM NAD<sup>+</sup>, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CoA, 5 mM Methylviologen, 21  $\mu$ g Isocitrat-Dehydrogenase, 5  $\mu$ g  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase und 0-1 mg Cytoplasma.

**$\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase:** Die Aktivität der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase im Cytoplasma wurde mithilfe des artifiziellen Elektronenakzeptor Methylviologen bei 604 nm bestimmt.

Der 1 ml Ansatz beinhaltete: 40 mM Phosphatpuffer pH 7; 7 mM Methylviologen, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CoA, 5 mM  $\alpha$ -Ketoglutarat und 0-0,4 Cytoplasma.

**Fumarat-Reduktase:** Die Aktivität der Fumarat-Reduktase in den Membranfraktionen von *P. vulgatus* wurde über die Übertragung der Elektronen von reduziertem Methylviologen auf Fumarat bestimmt. Die Reduktion von Fumarat konnte deshalb bei 604 nm beobachtet werden.

Der 700  $\mu$ l Ansatz enthielt: 40 mM Tris/HCl Puffer pH 7, 7 mM Methylviologen, 10 mM Fumarat, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0-0,25 mg Membranfraktionen. Für die Reduktion von Methylviologen wurden dem Ansatz Titan(III)-Citrat zugefügt, bis die Absorption bei 604 nm 1,5-2 betrug.

**NADH:Fumarat-Oxidoreduktase-System:** Für die Bestimmung der kombinierten Aktivität der Membrankomplexe Nqr und Fumarat-Reduktase wurde die Übertragung der Elektronen von NADH auf Fumarat gemessen. Dabei katalysierte der Komplex Nqr den Elektronentransfer von NADH auf Menachinon und die Fumarat-Reduktase katalysierte wiederum die Übertragung der Elektronen von Menachinon auf Fumarat. Diese kombinierte Reaktion konnte aufgrund der NADH-Oxidation bei 340 nm beobachtet werden.

Der 700 µl Ansatz beinhaltete: 40 mM Phosphatpuffer pH 7, 0,18 mM NADH, 10 mM Fumarat, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0-0,25 mg Membranfraktionen.

## 2.6 Bioinformatische Analysen

In dieser Arbeit wurden verschiedene bioinformatische Analysen durchgeführt. Grundsätzlich wurden die Gen- oder Protein-Sequenzen aus den Datenbanken NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>), UniProt (<https://www.uniprot.org/>) oder JGI IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) bezogen. Um zu untersuchen, ob der untersuchte Organismus bestimmte Proteine aufweist, wurden die BlastP-Programme von NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) und JGI IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) verwendet.

**Bioinformatische Analyse zum SBPP:** Für die bioinformatische Analyse zur Verteilung des SBPPs in Darmbakterien wurden alle verfügbaren Genome der jeweiligen Arten aus den oben genannten Datenbanken bezogen. Diese werden im Folgenden aufgelistet, wobei Stämme mit F6P-Aldolase unterstrichen sind:

*Akkermansia muciniphila* - EB-AMDK-8, EB-AMDK-7, EB-AMDK-17, EB-AMDK-14, EB-AMDK-18, EB-AMDK-20, AMDK-2, CBA5201, EB-AMDK-15, YL44 (sequenziert durch das Max von Pettenkofer-Institut München), YL44 (sequenziert durch die Universität Bern), AMDK-3, ATCC BAA-835, AMDK-4, EB-AMDK-19, EB-AMDK-16, 139, EB-AMDK-13, H2, AMDK-1, EB-AMDK-10, EB-AMDK-22, EB-AMDK-11, EB-AMDK-21, EB-AMDK-12.

*Alistipes putredinis* - DSM 17216.

*Alistipes shahii* - WAL 8301, ETR2\_14.

*Anaerobutyricum hallii* - 2789STDY5834835, 2789STDY5834966, AF31-17AC, AF45-14BH, AM34-3LB, AM48-23BH, DSM 3353, L2-7, TM10-1AC.

*Bacteroides caccae* - 2789STDY5834880, 2789STDY5834946, ATCC 43185, CL03T12C61.

*Bacteroides cellulosilyticus* - CL02T12C19, CL09T06C25, WH2, DSM 14838.



*Blautia hansenii* - DSM 20583.

*Butyrivibrio crossotus* - DSM 2876, CAG:259.

*Catenibacterium mitsuokai* - JCM 10609.

*Clostridium asparagiforme* – AF04-15, DSM 15981.

*Clostridium leptum* - DSM 753 (sequenziert durch die Aarhus Universität), DSM 753 (sequenziert durch die Washington Universität St. Louis).

*Clostridioides difficile* - DSM 27640, 630 delta erm, CD196, DSM 28669, 08ACD0030, 09-00072, M68, R1, 020711, 020688, 630, 12-00008, R2, 020474, BI1, 020709, CD161, 08-00495, DSM 29688, R0104a, CF5, DSM 28196, 10-00253, Z31, DSM 28668.

*Collinsella aerofaciens* - 2789STDY5608823, 2789STDY5834902, ATCC 25986, C11, indica, NCTC 118382789STDY5608842.

*Coprococcus comes* – ATCC 27758, 2789STDY5834913, 2789STDY5834866, 2789STDY5834962, 2789STDY5608832, AM22-12LB, AF16-31, AF18-12LB, AM23-3, TM07-19.

*Coprococcus eutactus* - AF22-21, 2789STDY5608843, 2789STDY5608888, ATCC 27759, 2789STDY5608829, 2789STDY5834963, CAG:665.

*Dialister invisus* - DSM 15470.

*Dorea formicigenerans* - 4\_6\_53AFAA, AF12-11, AF19-13, AF19-4AC, AF21-25, AF25-11, AF31-13BH, AF36-1BH, AF42-21, AM23-7AC, AM29-11, AM35-12, AM37-11, AM37-5, AM40-15AC, AM42-8, AM46-16, ATCC 27755, OM02-12, OM03-2, TF09-3, TF11-11, TF12-1, TM05-5, TM09-16AC.

*Dorea longicatena* - 2789STDY5608851, 2789STDY5608866, 2789STDY5834867, 2789STDY5834914, 2789STDY5834961, AF17-8AC, AGR2136, AM22-22, AM23-13, AM25-9, DSM 13814, OM02-16.

*Enterococcus faecalis* - 110, 7L76, 10244, KB1, AMB05, V583, Portland ATCC 29212, 62, DENG1, Symbioflor 1, L12, FDAARGOS 324, LD33, W11, OG1RF ATCC 47077, sorialis, C25,D32, L9.

*Enterococcus faecium* - 2014-VREF-268, 64/3, 6E6, ATCC 700221, Aus0004, Aus0085, CFSAN059071, DO, E1, E39, E745, EFE10021, ERS2703571, ERS2704016, ISMMS\_VRE\_12, ISMMS\_VRE\_9, LS170308, NRRL B-2354, RBWH1, SC4, UAMSEF\_08, UW7606x64/3 TC1, UW8175, VRE001.

*Eubacterium rectale* - AF06-19, AF12-8, AF18-16LB, AF19-3AC, AF24-9LB, AF36-2BH, AF38-24, AF39-14AC, AM16-11, AM22-4, AM26-2LB, AM29-10, AM36-3AA, AM42-1, AM44-2AT, AM47-6BH, AM48-7, AM54-25XD, ATCC 33656, DSM 17629, M104/1, OM08-12AT, T1-815 TF11-15AC, TM10-3.

*Eubacterium siraeum* - DSM 15702, V10Sc8a, 70/3.

*Eubacterium ventriosum* - AM44-11BH, Am43-2, Am23-22, Am42-30, ATCC 27560, AM40-7BH, AM32-23AC, AF37-4.

*Faecalibacterium prausnitzii* - 2789STDY5608869, 2789STDY5834930, 2789STDY5834970, 942/30-2, A2165, A2-165, AF10-13, AF29-11BH, AF31-14AC, AF32-8AC, AF36-11AT, AM33-14AC, AM36-18BH, AM37-13AC, AM39-7BH, AM42-11AC, APC918/95b, APC922/41-1, APC923/51-1, APC923/61-1, APC924/119, APC942/18-1, APC942/32-1, APC942/8-14-2, ATCC 27766, ATCC 27768, CNCM 4573, CNCM 4574, CNCM 4575, CNCM 4644, Indica, L2-6, M21/2, SL3/3.

*Holdemania filiformis* AF24-29, DSM 12042.

*Lachnoclostridium scindens* - VE202-05, ATCC 35704.

*Lactococcus lactis cremoris* - AI06, 158, 3107, A76, IBB477, JM1, JM2, JM3, JM4, KW2, MG1363, NZ9000, SK11, UC109, UC509.9;

*Lactococcus lactis lactis*- IL6288, 14B4, 184, 229, 275, A12, bv. *diacetylactis* FM03, C10, CV56, F44, G423, G50, II1403, II1403, IO-1, KF147, KLDS 4.0325, NCDO 2118, S0, UC06, UC063, UC08, UL8, SRCM103457.

*Lactobacillus ruminis* - ATCC 27780, ATCC 27782, DPC 6830, DPC 6832, DSM 20403 (sequenziert durch Shanghai Majorbio Bio-pharm Technology Co.), DSM 20403 (sequenziert durch das DOE Joint Genome Institut (JGI)), E 194e, NBRC 102161, S23, TH14.

*Megamonas hypermegale* - ART12/1, NCTC 10571, DSM 1672, NCTC 10570, An288.

*Odoribacter splanchnicus* - An39, An45, NCTC 10826, AM43-5, AM30-21, AF16-14, OF03-11, AF15-47, AM42-31, AF36-2, AF14-6AC, 1651/6, DSM 20712.

*Parabacteroides johnsonii* - DSM 18315, CL02T12C29, ERS2913216, An42, CAG:246.

*Prevotella copri* - DSM 18205, JCM 13464, CAG:164.

*Prevotella stercorea* - DSM 18206, CAG:629.

*Pseudoflavonifractor spp.* – An187, An184, YL31, 2.1-1, SRB521, ATCC 29799, 3BBH22, 524-17, An184, AF19-9Ac, An85, An44, AN176, BIOML-A14, BIOML-A15, BIOML-A16.

*Roseburia intestinalis* - L1-82, 2789STDY5834960, AM22-21LB, AM43-11, AM37-1AC, AF36-10AT, M50/1, XB6B4, L1-82.

*Roseburia inulinivorans* - AF21-31, L1-83, 2789STDY5608835, AM27-11, AF24-4, 2789STDY5608887, AM32-8LB, AF28-15, AM42-1AC, DSM 16841, AM23-23AC, CAG:15.

*Ruminococcus bromii* - ATCC 27255, 5AMG, L2-63, YE282, AM46-2BH.

*Ruminococcus torques* - 2789STDY5608833, 2789STDY5608867, 2789STDY5834918, L2-14, ATCC 27756, 2789STDY5834965, 2789STDY5834889, 2789STDY5834841.

*Streptococcus salivarius* – JF, NCTC 8618, HSISS4, PS4, KB005, CCHSS3, ATCC 7073, M18, UC3162, YU10, 57.I, K12, NU10, SK126, JIM8777, CAG: 79.

*Sutterella wadsworthensis* - DSM 14016, 2\_1\_59BFAA, 3\_1\_45B, HGA0223, MGS:135, CAG:135.

*Veillonella parvula* - ACS-068-V-Sch12, AF04-47, AM48-14BH, ATCC 17745, DNF00876, HSIVP1, KHUD\_VP2, NCTC 11810, SHI-1, DSM 2008, UMB0371, UTDB1-3.

*Victivallis vadensis* - DSM 14823, ATCC BAA-548

Um festzustellen, ob die untersuchten Stämme Gene für eine Transaldolase und eine PPI-PFK besitzen, wurden die folgenden Enzyme als Referenz verwendet (Angabe der UniProt ID). Die Referenzenzyme für Transaldolasen können nach Samland & Sprenger (2009) in Unterfamilien eingeteilt werden.

Unterfamilie 1: *E. coli* (TalB, P0A870); *Homo sapiens* (P37837); *Saccharomyces cerevisiae* (P15019); *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (J9MJK9).

Unterfamilie 2: Tomate *Solanum lycopersicum* (ToTal2, Q941R1).

Unterfamilie 3: Kartoffel *Solanum tuberosum* (PotTal1, O04894); *Corynebacterium glutamicum* (Q8NQ64); *Bifidobacterium longum subsp. infantis* (AAL15881).

Unterfamilie 4: *Bacillus subtilis* (P19669); *Thermotoga maritima* (Q9WYD1); *Bacteroides vulgatus* (BVU\_3333, A6L5J5); *Methanocaldococcus jannaschii* (Q58370).

Unterfamilie 5: *E. coli* (FsaB, P32669); *E. coli* (FsaA, P78055).

Die für die Identifizierung von PPI-PFKs verwendeten Referenzenzyme können nach Siebers et al. 1998 in verschiedene Gruppen der PFKs eingeteilt werden. Dabei sind für die PPI-PFKs die Gruppen 2 und 3 relevant.

Gruppe 2: *Pseudoclostridium thermosuccinogenes* (PNT94038); *Entamoeba histolytica* (C4LZC2); *Spirochaeta thermophile* (Q9EZ02); *Thermotoga maritima* (Q9WYC5); *Trichomonas vaginalis* (A2EF58);

*Methylococcus capsulatus* (Q609I3); *Borrelia burgdorferi* (P70826); *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* (P29495); *Methylomicrobium alcaliphilum* (G4STG9); *Giardia intestinalis* (E2RU81); *Treponema pallidum* (O83553); *Rhodospirillum rubrum* (Q2RNU4); *Xanthomonas campestris* (B0RP51); *Methylomonas methanica* (Q3KSV5); *Porphyromonas gingivalis* (Q9FAF8).

Gruppe 3: *Amycolatopsis methanolica* (Q59126); *Thermoproteus tenax* (G4RK16); *Dictyoglomus thermophilum* (Q9KH71).

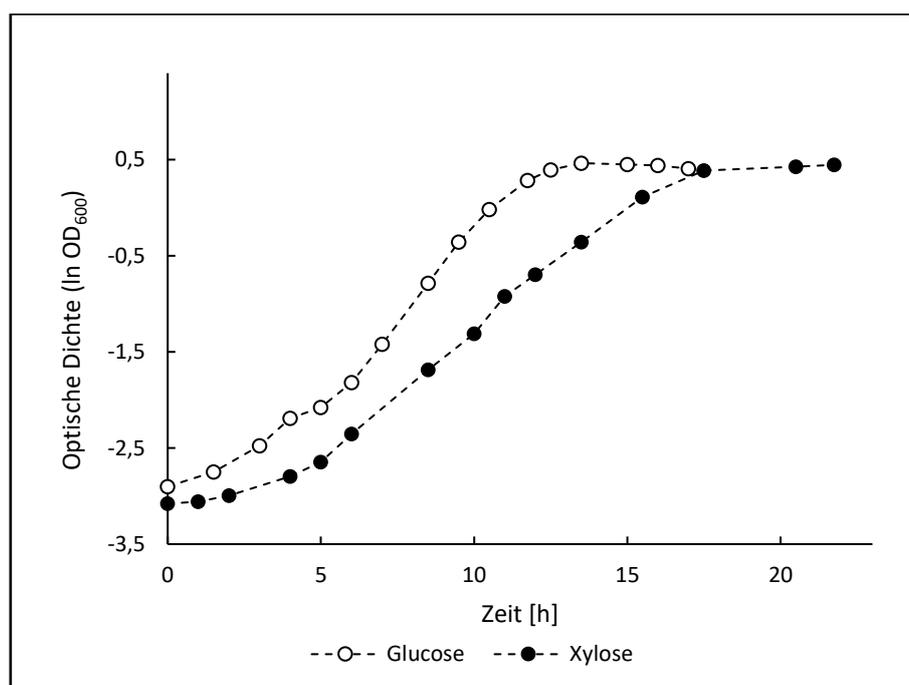
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Der Pentose-Metabolismus in *P. copri*

Wie in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einer ballaststoffreichen im speziellen Xylan-reichen Ernährung und dem vermehrten Auftreten des Organismus *P. copri* festgestellt. Xylan ist vorwiegend aus der Pentose Xylose aufgebaut, weshalb der Pentose-Stoffwechsel maßgebend für die Verwertung von pflanzlichen Ballaststoffen durch *P. copri* ist. Gegenwärtig ist aber nicht bekannt, wie *P. copri* Pentosen verstoffwechselt, weshalb in der vorliegenden Abhandlung der Pentose-Metabolismus zunächst bioinformatisch und anschließend biochemisch untersucht wurde.

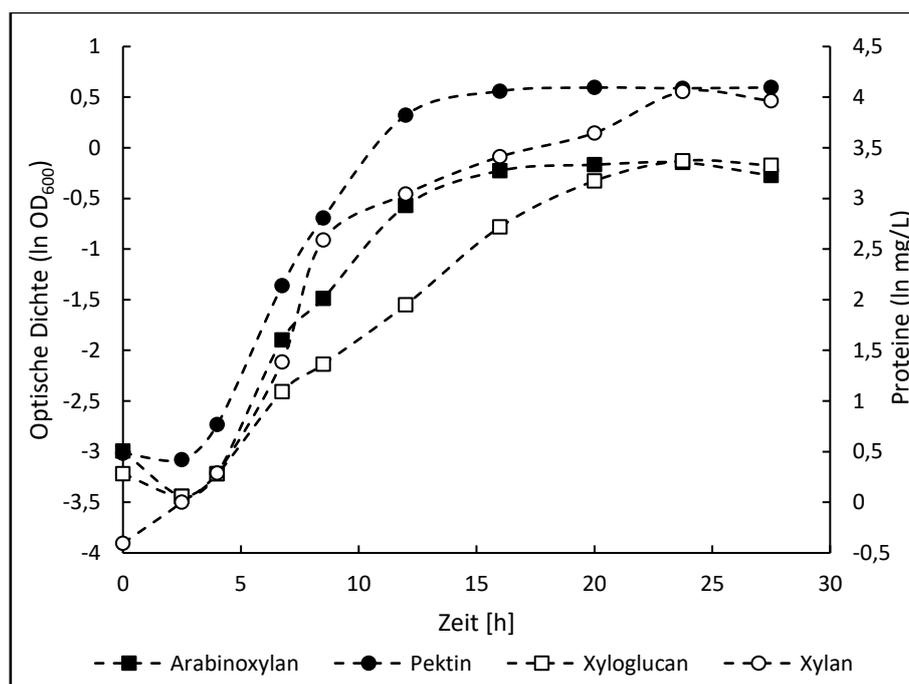
##### 3.1.1 Wachstum von *P. copri* auf Xylose und Hemicellulosen

Für das Verständnis des Pentose-Metabolismus in *P. copri*, wurde das Wachstum des Organismus auf unterschiedlichen Substraten untersucht und verglichen. Generell konnte durch das Wachstum von *P. copri* auf Minimalmedium (DMM) mit Xylose gezeigt werden, dass ein biochemischer Weg zur Pentose-Umwandlung im Organismus vorhanden sein muss (Abb. 1.). Im Vergleich zum Substrat Glukose zeigte das Bakterium auch für Xylose eine typische exponentielle Wachstumsphase. *P. copri* erreichte in DMM + Glukose eine Verdopplungszeit von  $1,8 \pm 0,4$  h und in DMM + Xylose war die Verdopplungszeit mit  $2,6 \pm 0,5$  h etwas höher. Auf beiden Substraten wurde eine maximale optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 1,6 erzielt.



**Abbildung 1:** Logarithmierte Wachstumskurven von *P. copri* in DMM mit Glukose (o) und Xylose (•) als Substrat. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei sich die Ergebnisse sehr ähnelten. Ein Experiment ist exemplarisch abgebildet. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Von besonderem Interesse war auch die Untersuchung natürlicher Wachstumssubstrate wie pflanzliche Polysaccharide. Dazu wurden unterschiedliche Hemicellulosen und Pektine als Wachstumssubstrate eingesetzt (Abb. 2), da diese Polysaccharide vor allem aus Pentosen aufgebaut sind oder zumindest Seitenketten aus C5-Körpern besitzen. Bei Wachstum auf Weizen-Arabinoxyylan zeigte *P. copri* eine Verdopplungszeit von  $2,7 \pm 0,3$  h. Wohingegen sich die Verdopplungszeit auf  $3,5 \pm 0,6$  h erhöhte, wenn Tamarinden-Xyloglucan als Substrat vorlag. Beim Einsatz von Apfel-Pektin als Substrat teilte sich der Organismus im Vergleich mit  $2 \pm 0,3$  h am schnellsten. Die maximalen OD<sub>600</sub> mit den Substraten Arabinoxyylan und Xyloglucan waren mit ungefähr 0,9 ähnlich. Wohingegen mit Pektin eine maximal OD<sub>600</sub> von 1,8 erzielt werden konnte. Bei der Verwendung von Xylan aus Haferspelzen, trübte sich das Kulturmedium so stark, dass das Wachstum nicht über die Messung der OD<sub>600</sub> erfolgen konnte. Daher wurde das Wachstum über die Bestimmung der Proteinkonzentration ermittelt. Es wurde ein ähnliches Wachstumsverhalten wie für das Substrat Xylose beobachtet. Bei Wachstum auf Xylan aus Haferspelzen wies *P. copri* eine Verdopplungszeit von  $2,4 \pm 0,7$  h auf.



**Abbildung 2:** Wachstumskurven von *P. copri* in DMM mit Arabinoxyylan aus Weizen (■), Pektin aus Apfel (●), Xyloglucan aus Tamarinden (□) und Xylan aus Haferspelzen (○). Das Experiment wurde dreimal durchgeführt, wobei sehr ähnliche Ergebnisse erzielt wurden. Ein Versuch ist repräsentativ abgebildet. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

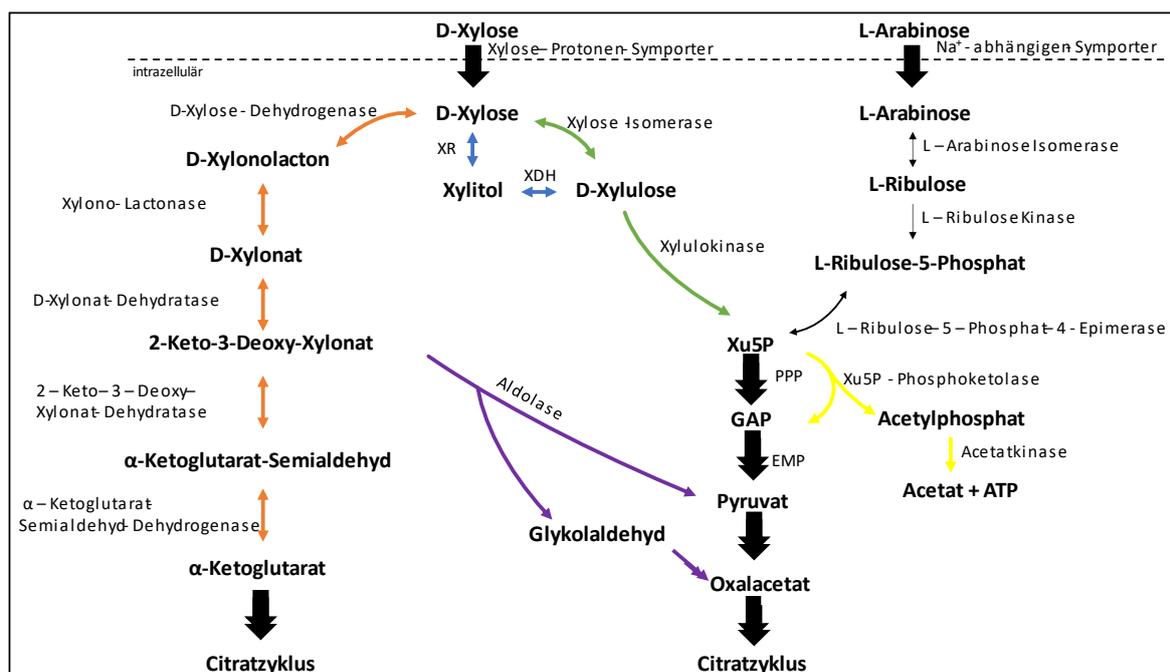
### 3.1.2 Bioinformatische Analyse des Pentose-Stoffwechsels in *P. copri*

Über die Untersuchungen zur Verwertung von Pentose-haltigen Substraten (Hemicellulosen, Pektin, Xylose) durch *P. copri* (3.1.1), wurde nachgewiesen, dass der Organismus nicht nur ein Enzym-Set für den Abbau von pflanzlichen Polysacchariden, sondern auch einen Stoffwechselweg für die Verwertung von Pentosen besitzen muss.

Darauf aufbauend wurde das Genom des Typ-Stamms *P. copri* DSM 18205 auf die Gene relevanter Enzyme der bekannten Pentose-Verstoffwechslung untersucht, wobei Sequenzen von gut charakterisierten Enzymen als Referenz herangezogen wurden. Mithilfe von BLAST-Analysen wurden die Genomdaten von *P. copri* verglichen. Darüber konnte ein Stoffwechselschema zur Umsetzung von Pentosen für *P. copri* entwickelt werden.

In dieser Arbeit stand die Verstoffwechslung von Pentosen durch *P. copri* im Fokus. Natürlicherweise kommen Pentosen als Monomer im humanen Darm als zugeführte Nahrung kaum vor, sondern finden sich hauptsächlich als Bestandteile von pflanzlichen Polysacchariden wie Hemicellulosen oder Pektinen wieder. Diese werden durch die Darmflora, unter anderem auch durch *P. copri*, über ein Arsenal an extrazellulären Enzymen in ihre Oligomere und Monomere hydrolysiert. Bei diesen Monomeren handelt es sich hauptsächlich um D-Xylose und L-Arabinose. Im Folgenden wird deshalb ausgehend von diesen beiden Zuckern, die Verstoffwechslung von Pentosen auf bioinformatische Ebene analysiert (Abb. 3).

Die freigesetzte L-Arabinose wird über einen Na<sup>+</sup>-abhängigen-Symporter (PREVCOP\_04056) in die Zelle aufgenommen und intrazellulär in L-Ribulose durch die L-Arabinose-Isomerase (PREVCOP\_04059) umgewandelt. Darauf wird L-Ribulose durch die L-Ribulose-Kinase (PREVCOP\_04060) phosphoryliert und anschließend wird L-Ribulose-5-Phosphat mithilfe der L-Ribulose-5-Phosphat-4-Epimerase (PREVCOP\_04058) in D-Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) umgewandelt (Abb. 3). Im Vergleich dazu wird D-Xylose über einen Xylose-Protonen-Symporter (PREVCOP\_05160) in die Zelle transportiert. Intrazellulär wird D-Xylose in D-Xylulose umgewandelt und anschließend durch eine Xylulokinase (PREVCOP\_06339) zu Xu5P phosphoryliert (Abb. 3). Erstaunlicherweise ließ sich im Genom von *P. copri* kein Gen einer typischen Xylose-Isomerase finden, die D-Xylose in D-Xylulose umwandelt. Die Thematik der Xylose-Isomerisierung wird im Abschnitt (3.1.6) genauer behandelt.



**Abbildung 3:** Überblick von bekannten Wegen zur Umwandlung von Pentosen (D- Xylose und L-Arabinose). D- Xylose wird entweder über den Xylose-Isomerase-Weg (grün), dem Weimberg-Weg (orange) oder dem „Xylose-Oxidoreduktase“-Weg (blau) verstoffwechselt. Das Intermediat 2-Keto-3-Deoxy-Xylonat des Weimberg-Wegs kann alternativ über den Dahms-Weg umgewandelt werden (lila). Das Schlüsselintermediat des Pentose-Metabolismus Xu5P wird entweder über den PPP oder den Phosphoketolase-Weg (gelb) verstoffwechselt. XR= Xylose-Reduktase; XDH= Xylit-Dehydrogenase; Xu5P= Xylulose-5-Phosphat; PPP= Pentosephosphatweg; EMP= Embden-Meyerhof-Parnas.

Es wurde außerdem festgestellt, dass die Schlüsselenzyme des klassischen Pentosephosphatwegs (PPP) die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und die Transaldolase fehlen (Abb. 4.1). Demnach besitzt *P. copri* weder einen vollständigen oxidativen noch vollständigen nicht-oxidativen PPP. Da der Organismus aber auf Pentose-haltigem Medium wachsen kann wurde angenommen, dass *P. copri* einen alternativen Pentose-Stoffwechsel aufweisen muss.

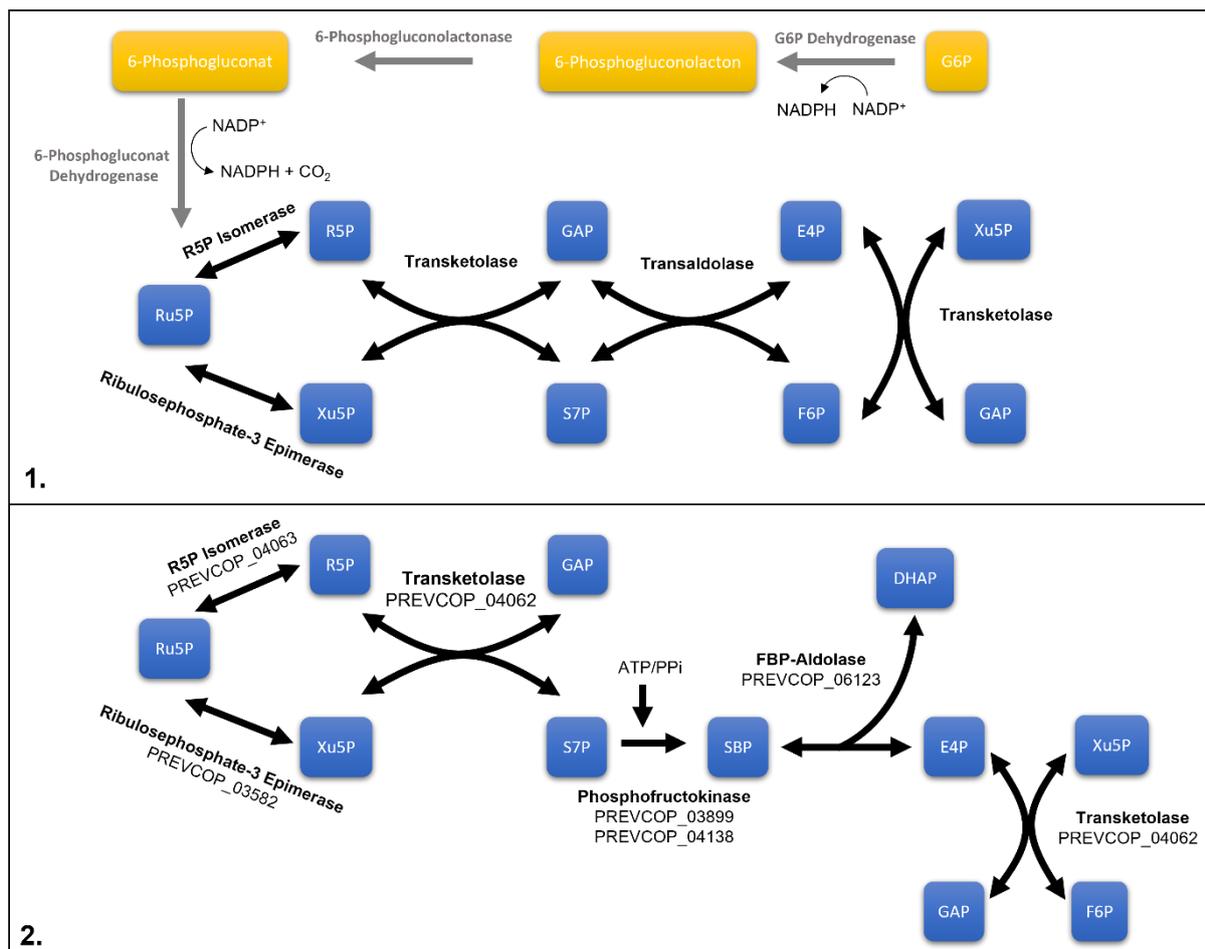
Die Transaldolase spielt neben der Transketolase eine entscheidende Rolle innerhalb des nicht-oxidativen PPP, da beide Enzyme für die Umformung von C3-, C5- und C6-Körpern essentiell sind. Entscheidend ist außerdem, dass der nicht-oxidative PPP reversibel abläuft und deshalb unerlässlich für den Abbau von Pentosen als auch für den Anabolismus bei Wachstum auf anderen Substraten ist. Die meisten Organismen verwenden zwar die Kombination aus Transaldolase und Transketolase um C3-,C5- und C6-Intermediate ineinander umzuwandeln, dennoch existieren andere mögliche Stoffwechselwege, die für *P. copri* aufgrund fehlender Transaldolase in Betracht gezogen wurden.

Wie erwartet fehlten die entsprechenden Gene für den Phosphoketolase-Weg im Genom von *P. copri*. Der Phosphoketolase-Weg tritt vornehmlich in Milchsäurebakterien auf. In diesem Stoffwechselweg wird das Schlüsselintermediat Xu5P in Acetylphosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GAP) gespalten (Abb. 3). Acetylphosphat wird daraufhin durch eine Acetatkinase unter Gewinnung von ATP

zu Acetat umgeformt und GAP wird in den Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Stoffwechselweg eingespeist (Kim und Woo, 2018). Ebenfalls konnten im Genom von *P. copri* keine Gene für den Weimberg/Dahms-Weg gefunden werden. Beim Weimberg-Weg wird D-Xylose über fünf enzymatische Schritte in  $\alpha$ -Ketoglutarat umgeformt, welches wiederum in den Citratzyklus geleitet werden kann (Abb. 3). Beim Dahms-Weg wird zunächst das Intermediat des Weimberg-Wegs 2-Keto-3-Deoxy-Xylonat durch eine Aldolase in Pyruvat und Glycolaldehyd gespalten. Die Reaktionsprodukte können anschließend in den zentralen Stoffwechsel eingespeist werden (Weimberg, 1961; Dahms, 1974).

Als letzte Alternative verblieb die Möglichkeit des Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat-Wegs (SBPP). Bei diesem ungewöhnlichen Stoffwechselweg wird die fehlende Transaldolase-Reaktion durch die Kombination der Reaktionen einer Phosphofruktokinase (PFK) und einer Fruktose-Bisphosphat-Aldolase (FBP-Aldolase) ersetzt (Abb. 4.2). Im SBPP phosphoryliert die PFK Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) zu Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat (SBP) und die FBP-Aldolase spaltet anschließend SBP zu Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) (Koendjibiarie et al., 2020). Die Produkte DHAP und E4P können anschließend über die Triosephosphat-Isomerase und die Transketolase in den zentralen Stoffwechsel geleitet werden. Interessanterweise kodiert das Genom von *P. copri* für zwei PFKs, von denen eine als ATP- (ATP-PFK; PREVCOP\_04138) und die andere als Pyrophosphat- (PPi; PPi-PFK; PREVCOP\_03899) -abhängig annotiert ist. Ebenfalls ließ sich das Gen der FBP-Aldolase (PREVOP\_06123) finden.

Aufbauend auf den in dieser Arbeit durchgeführten bioinformatischen Analysen, ließ sich der folgende Stoffwechselweg beschreiben (Abb. 4.2): Ausgehend von Xu5P erfolgt die Umwandlung durch die Ribulosephosphat-3-Epimerase (RuP-3-Epimerase; PREVCOP\_03582) zu Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) und anschließend wird Ru5P mithilfe der Ribose-5-Phosphat-Isomerase (R5P-Isomerase; PREVCOP\_04063) zu Ribose-5-Phosphat (R5P) isomerisiert. Die Produkte R5P und Xu5P werden über die Umlagerung der Glycolaldehyd-Einheit von Xu5P auf R5P mithilfe der Transketolase (PREVCOP\_04062) zu GAP und S7P umgeformt. Das Intermediat GAP kann in den EMP-Stoffwechselweg eingespeist werden. Über eine Phosphorylierung wird S7P durch die PPi- oder ATP-PFK (PREVCOP\_04138 oder PREVCOP\_03899) in SBP umgewandelt. Anschließend wird SBP durch die FBP-Aldolase (PREVCOP\_06123) in E4P und DHAP gespalten, wobei DHAP durch die Triosephosphat-Isomerase (PREVCOP\_06387) ebenfalls in den EMP-Weg eingeschleust werden kann. Über einen erneuten Transfer der Glycolaldehyd-Einheit von Xu5P auf E4P wird durch die Transketolase (PREVCOP\_04062) GAP und Fruktose-6-Phosphat (F6P) gebildet. Beide Produkte können dann ebenfalls in den EMP-Stoffwechselweg eingespeist werden.

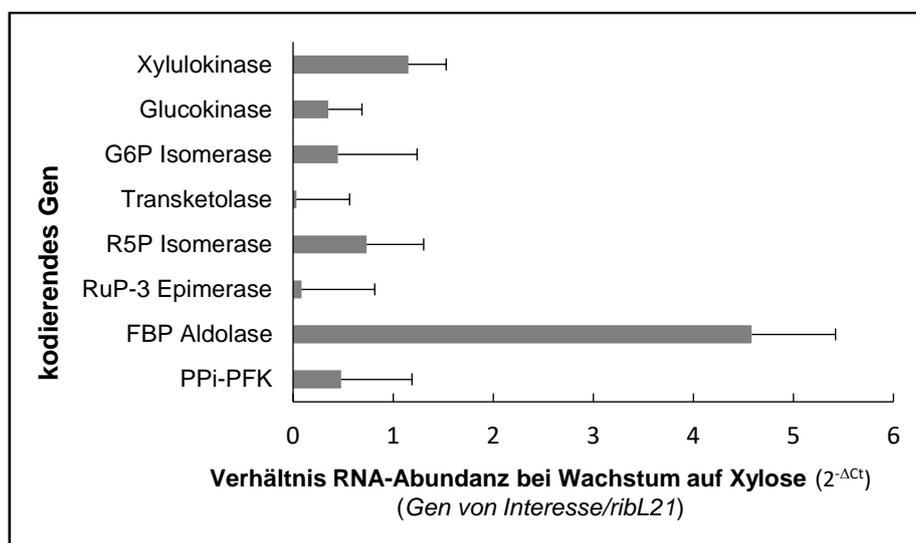


**Abbildung 4:** 1. Modell des regulären PPP aufgeteilt in den oxidativen Zweig (gelb) und in den nicht-oxidativen Zweig (blau). 2: Schema des SBPPs in *P. copri* zur Pentose Verwertung. G6P = Glucose 6-Phosphat, Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Xu5P = Xylulose-5-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, S7P = Sedoheptulose-7-Phosphat; SBP = Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, E4P = Erythrose-4-Phosphat, F6P = Fruktose-6-Phosphat, FBP = Fruktose-1,6-Bisphosphat, PPi = Pyrophosphat.

### 3.1.3 Transkriptionsanalysen zum Pentose-Metabolismus in *P. copri*

Nachdem das Modell der Pentose-Umwandlung in *P. copri* mit bioinformatischen Methoden aufgestellt wurde, erfolgte eine Analyse der Transkription entsprechender Gene. Dadurch sollte der vorhergesagte Pentose-Stoffwechsel bestätigt werden. Außerdem wurde die Transkript-Abundanz beim Wachstum auf Hexosen und Pentosen verglichen. Grundsätzlich wurde für diese Analyse die Gesamt-RNA von in Minimalmedium mit Glukose oder Xylose exponentiell wachsenden *P. copri*-Zellen extrahiert. Die mRNA-Konzentration wurde mittels RT-qPCR unter Verwendung spezifischer Primer der Gene der Schlüsselenzyme des Pentose-Stoffwechsels und des Hexose-Stoffwechsels bestimmt. Als Referenz wurde die Transkriptmenge des Gens, welches für das ribosomale Protein L21 (PREVCOP\_06002) kodiert, verwendet. Da das entsprechende Gen (*rib21*) für ein Bestandteil der Ribosomen kodiert, wird *rib21* während der exponentiellen Wachstumsphase konstant exprimiert. Die

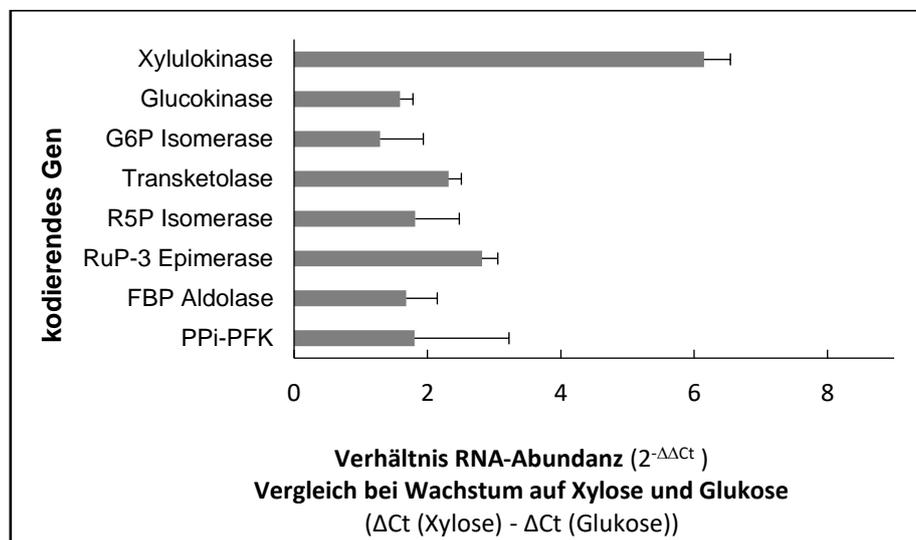
Methodik der RT-qPCR und die entsprechende Auswertung ist im Abschnitt 2.4.10 beschrieben. Grundsätzlich wurden die RNA-Konzentrationen der Gene von Interesse mit der Transkriptmenge des Referenzgens verglichen ( $\Delta Ct$ ; Abb. 5). Über diese Normierung der Transkriptmengen der Gene mit dem konstant exprimierten Referenzgen, konnte anschließend der Vergleich der  $\Delta Ct$ -Werte zwischen zwei Wachstumsbedingungen (Xylose vs. Glukose) erfolgen (Abb. 6).



**Abbildung 5:** Verhältnis der mRNA-Abundanz von Genen, die für die Enzyme der Pentose-Verstoffwechslung in *P. copri*, kodieren. Analysiert wurden die Transkriptmengen bei Wachstum des Organismus mit dem Substrat Xylose. Als Vergleich wurden Gene des Hexose-Stoffwechsel von *P. copri* dargestellt (Glucokinase, G6P-Isomerase). Für die Bestimmung der mRNA-Abundanz wurde zunächst die Differenz des jeweiligen Ct-Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Referenzgens (*rib21*, *prevcop\_06002*) gebildet ( $\Delta Ct$ ). Die mRNA-Abundanz wurde mit Hilfe der Funktion  $2^{-\Delta Ct}$  berechnet. G6P = Glukose-6-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, RuP-3-Epimerase = Ribulosephosphat-3-Epimerase, FBP = Fruktose-1,6-Bisphosphat, PPI-PFK = Pyrophosphat-abhängige Phosphofruktokinase.

Unabhängig vom eingesetzten Substrat erzielten alle untersuchten Gene mindestens 10-70 % der Transkriptmenge des Referenzgens *prevcop\_06002*. In Abbildung 5 ist die RNA-Abundanz der Gene des Pentose-Stoffwechsels in *P. copri* bei Wachstum auf Xylose dargestellt. Da die RNA von den untersuchten Genen in angemessener Menge nachgewiesen wurden und somit die Transkription der Gene sowohl auf Glukose und Xylose ausreichend erfolgte, konnte angenommen werden, dass der postulierte Stoffwechselweg (3.1.2) zum Pentose-Metabolismus in *P. copri* vorhanden war. Erstaunlicherweise war die Transkription des ATP-PFKs-Gens (*prevcop\_04138*) für beide Substrate (Xylose und Glukose) sehr gering und erreichte weniger als 0.1 % der Transkriptmenge des Referenzgens. Deshalb wurde das Gen *prevcop\_04138* nicht in den Abbildungen der Transkript-Abundanz dargestellt. Aufgrund der auffallend niedrigen Transkription des Gens der ATP-PFK, konnte die putative Funktion der ATP-PFK innerhalb des Pentose-Metabolismus und auch im EMP-Weg in Frage gestellt werden. Hingegen erzielte das Gen der PPI-PFK 50 % der Transkript-Abundanz und das

Gen der FBP-Aldolase eine 4,5-fach höhere Transkriptmenge als das Gen des ribosomalen Proteins L21 bei Einsatz von Xylose als Substrat (Abb. 5). Die starke Transkription der Gene der Schlüsselenzyme des SBPPs, die PPI-PFK und die FBP-Aldolase, bekräftigte die für *P. copri* vorhergesagte Verstoffwechslung von Pentosen über den SBPP.



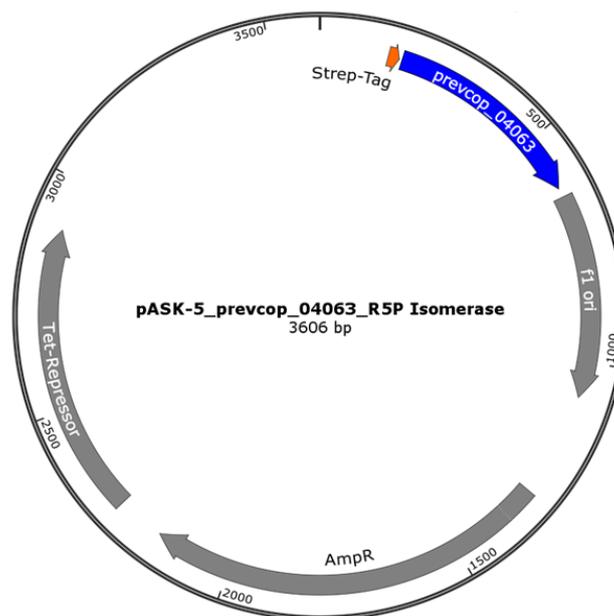
**Abbildung 6:**  $\Delta\Delta C_t$ -Methode im Vergleich der Wachstumssubstrate Xylose und Glukose zur Darstellung der mRNA-Abundanz von Genen, die für Enzyme der Pentose-Verstoffwechslung in *P. copri* kodieren. Als Vergleich wurden Gene des Hexose-Stoffwechsels von *P. copri* dargestellt (Glucokinase, G6P-Isomerase). Für die Bestimmung der mRNA-Abundanz wurde zunächst für beide Substrate die Differenz des jeweiligen Ct-Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Referenzgens (*rib21*, *prevcop\_06002*) gebildet ( $\Delta C_t$ ), wobei die Transkriptmenge bei Wachstum auf Glukose als Kontrolle verwendet wurde ( $\Delta\Delta C_t$ ). Die mRNA-Abundanz wurde mit Hilfe der Funktion  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  berechnet. G6P = Glukose-6-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, RuP-3-Epimerase = Ribulosephosphat-3-Epimerase, FBP = Fruktose-1,6-Bisphosphat, PPI-PFK = Pyrophosphat-abhängige Phosphofruktokinase.

Beim Vergleich der Substrate (Xylose und Glukose) erzielten alle Gene eine ungefähr 1,6 – 2,8-fach höhere Transkriptmenge, wenn *P. copri* in Xylose-haltigem Medium kultiviert wurde (Abb. 6). Besonders interessant war das Gen, welches für die Xylulokinase (PREVCOP\_06339) kodiert. Während des Wachstums auf Xylose war die Transkriptmenge des Xylulokinase-Gens sechsfach höher als bei Wachstum auf Glukose. Im Vergleich zur entsprechenden Kinase des Hexose-Stoffwechsels (Glucokinase; PREVCOP\_03592), wurde deutlich, dass das Gen der Xylulokinase bei Verwendung von Xylose als Wachstumssubstrat 2,5-fach stärker exprimiert wurde. Diese starke Gen-Transkription deutete auf die relevante Funktion der Xylulokinase bei der Verstoffwechslung von Xylose hin.

Wie zuvor beschrieben, sprach die nachgewiesene RNA und somit die vorhandene Transkription der untersuchten Gene des SBPPs dafür, dass *P. copri* Pentosen tatsächlich über den SBPP verstoffwechselt und der SBPP somit für *P. copri* den Ersatz des klassischen PPP darstellt. Im Folgenden waren biochemische Untersuchungen bedeutsam, um die enzymatischen Funktionalität des SBPPs zu bestätigen.

### 3.1.4 Biochemischer Nachweis des SBPPs in *P. copri*

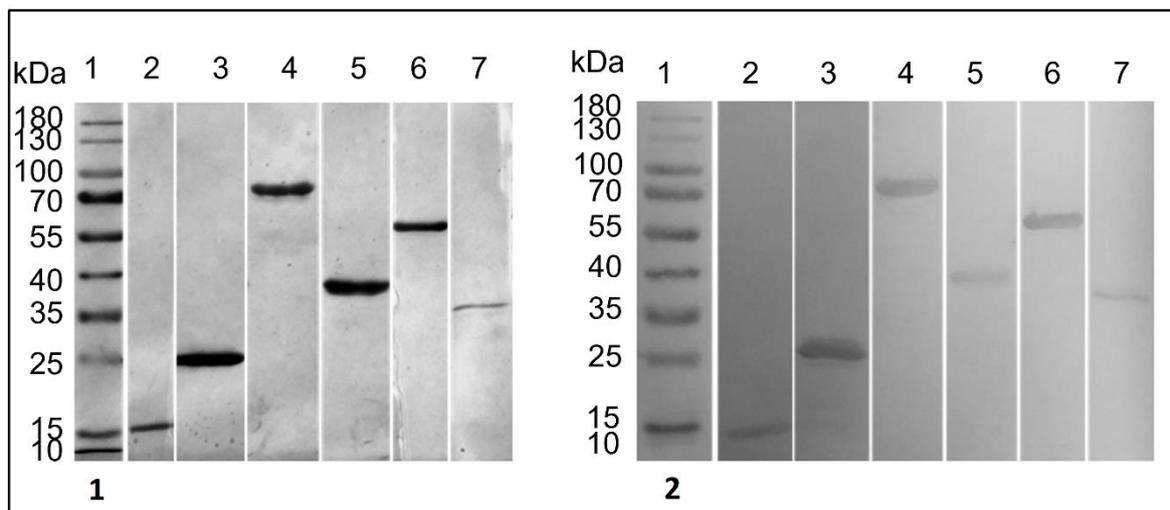
Die funktionale Aktivität des SBPPs auf Proteinebene in *P. copri*, wurde durch Enzymaktivitätstests ausgehend von R5P bestätigt. Dafür waren die folgenden Enzyme in aufgereinigter Form nötig: R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, ATP-PFK, PPI-PFK und FBP-Aldolase. Die entsprechenden Gene aus *P. copri* wurden mit der DNA-Sequenz eines entweder N- oder C-terminalen Strep-Tag fusioniert. Dieses Konstrukt wurde in den jeweiligen Expressionsvektor pASK-IBA5 oder pASK-IBA3 kloniert. Beispielhaft ist die Plasmidkarte für das Gen der R5P-Isomerase (PREVCOP\_04063) im pASK-IBA5 Vektor dargestellt (Abb.7).



**Abbildung 7:** Vektorkarte pASK-5\_prevcop\_04063\_R5P-Isomerase. Dieser Vektor wurde für die Überproduktion der R5P-Isomerase aus *P. copri* verwendet. AmpR = Ampicillin Resistenz Kasette; Tet = Tetracyclin; f1 ori = f1 Bacteriophage origin of replication.

Die rekombinanten Proteine wurden heterolog in *E. coli* DH5 $\alpha$  produziert und anschließend über Strep-Tactin® (IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland) Affinitätschromatographie aufgereinigt. Daraufhin wurden die heterolog produzierten Proteine mittels SDS/PAGE und Western Blotting analysiert (Abb. 8). Es konnte festgehalten werden, dass die über die Aminosäuresequenz berechneten Massen und die aus den Banden im SDS-Gel abgeleiteten Molekülmassen übereinstimmten (R5P-Isomerase 16,2 kDa, RuP-3-Epimerase 23,9 kDa, Transketolase 72,9 kDa, FBP-Aldolase 36,9 kDa, PPI-PFK 59,8 kDa und ATP-PFK 35,4 kDa). Da weder auf dem silberfärbten SDS-Gel noch auf der Western-Blot-Membran Proteinverunreinigungen festgestellt werden konnten, wurden alle genannten Proteine in reiner Form ohne sichtbaren Kontaminationen aufgereinigt. Daher konnte bei der anschließenden funktionalen

Charakterisierung der Proteine eindeutig die enzymatische Aktivität zugewiesen werden. Die Enzyme des SBPPs wurden über gekoppelte enzymatische Tests und durch HPLC-Analyse auf ihre Aktivitäten untersucht.



**Abbildung 8:** Darstellung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Enzyme des SBPPs von *P. copri*.

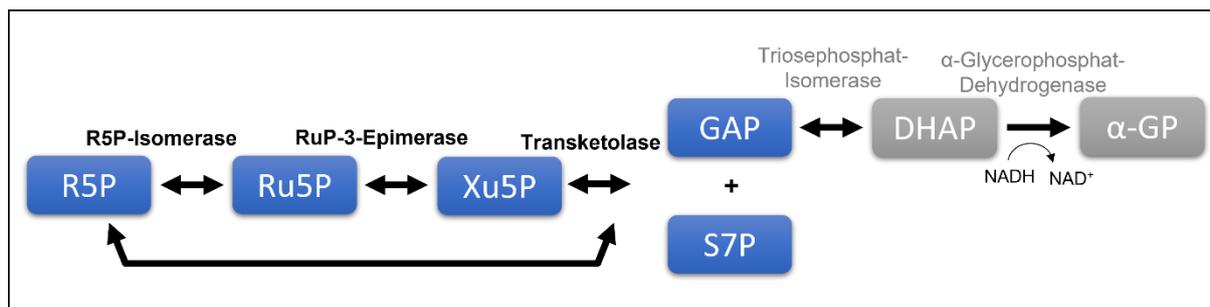
**1.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: R5P-Isomerase (PREVCOP\_04063; 16,2 kDa; 3  $\mu\text{g}$  Protein); Spur 3: RuP-3-Epimerase (PREVCOP\_03582; 23,9 kDa; 3  $\mu\text{g}$  Protein); Spur 4: Transketolase (PREVCOP\_04062; 72,9 kDa; 3  $\mu\text{g}$  Protein); Spur 5: FBP-Aldolase (PREVCOP\_06123; 36,9 kDa; 3  $\mu\text{g}$  Protein); Spur 6: PPi-PFK (PREVCOP\_03899; 59,8 kDa; 3  $\mu\text{g}$  Protein) und Spur 7: ATP-PFK (PREVCOP\_04138; 35,4 kDa; 1  $\mu\text{g}$  Protein).

**2.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von Abb. 8.1. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

### 3.1.4.1 Nachweis eines funktionellen SPBBs mit heterolog produzierten Enzymen

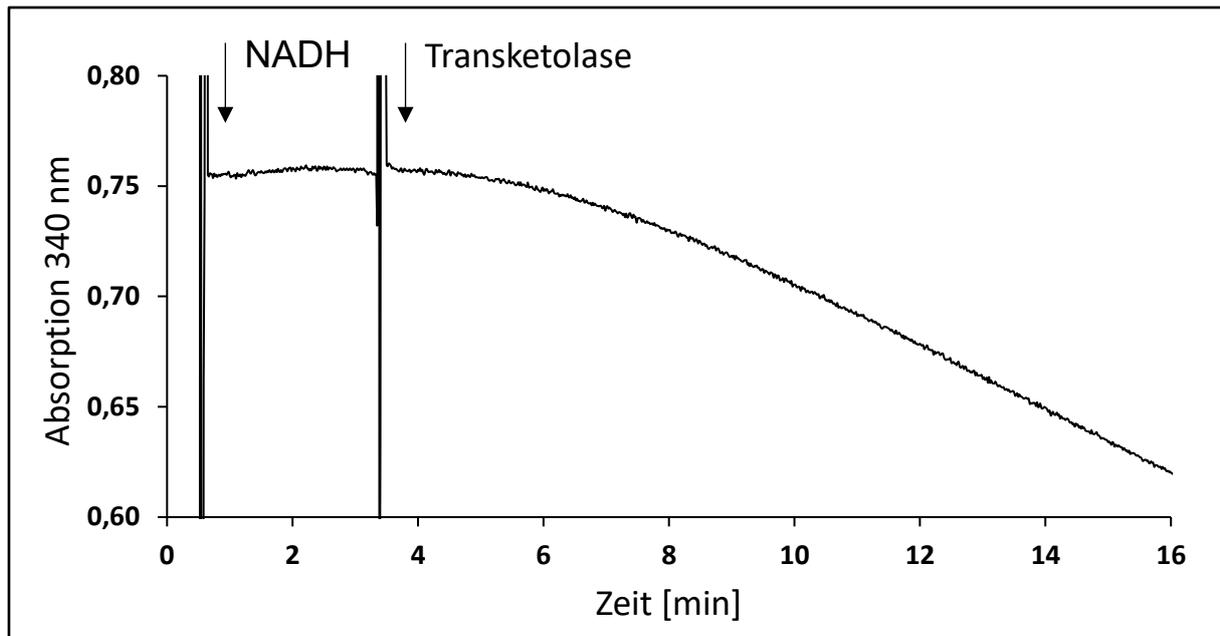
Die Aktivitäten der heterolog produzierten Enzyme des SBPPs wurden über unterschiedliche enzymatische Tests nachgewiesen.

Der erste photometrische Nachweis erfolgte ausgehend von dem Substrat R5P, über die Aktivitäten der R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase mithilfe der kommerziell erworbenen Hilfsenzyme Triosephosphat-Isomerase und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase (Abb. 9).



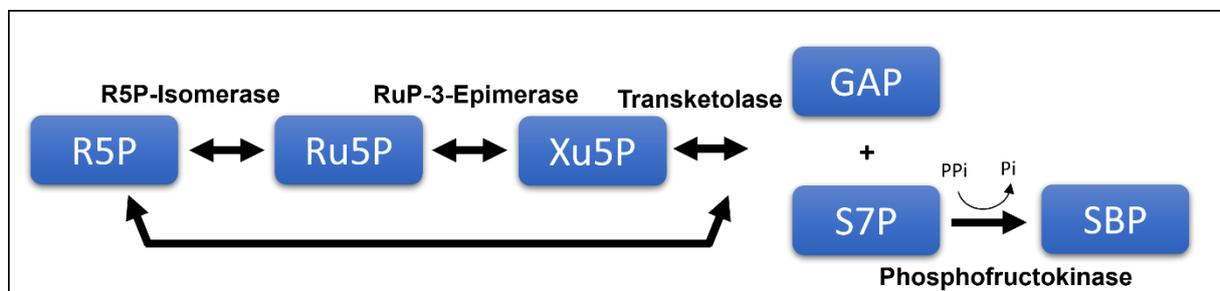
**Abbildung 9:** Schematische Darstellung der Analyse der ersten drei Enzyme des SBPPs (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase) mithilfe der Enzyme (grau) Triosephosphat-Isomerase und α-Glycerophosphat-Dehydrogenase. Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Xu5P = Xylulose-5-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, S7P = Sedoheptulose-7-Phosphat; DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, α-GP = α-Glycerophosphat.

Über die bei 340 nm photometrisch nachgewiesene Oxidation von NADH, konnten die Aktivitäten der drei Enzyme bestätigt werden (Abb. 10). Dabei wurde nachgewiesen, dass das Ausgangssubstrat R5P durch die R5P-Isomerase zu Ru5P isomerisiert wurde. Darauf erfolgte die Umwandlung von Ru5P durch die RuP-3-Epimerase zu Xu5P und direkt anschließend die Umformung von Xu5P und R5P zu GAP und S7P katalysiert durch die Transketolase. Der Nachweis dieser Reaktionen erfolgte zunächst durch das Hilfsenzym Triosephosphat-Isomerase, welches das entstandene GAP zu DHAP umformte. Darauf reduzierte die α-Glycerophosphat-Dehydrogenase DHAP zu α-Glycerophosphat, wobei NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert wurde und diese Reaktion deshalb photometrisch bei 340 nm verfolgt werden konnte. Unter den angewandten Bedingungen wurden  $2,25 \times 10^{-3} \mu\text{mol GAP ml Assay}^{-1} \text{min}^{-1}$  gebildet (Abb. 10). Es wurde somit nachgewiesen, dass die drei ersten Enzyme des SBPPs (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase) tatsächlich die bioinformatisch postulierte Aktivitäten aufwiesen. Die Reaktionsabfolge von R5P zu GAP und S7P, sollte daher auch auf zellulärer Ebene in *P. copri* möglich sein.



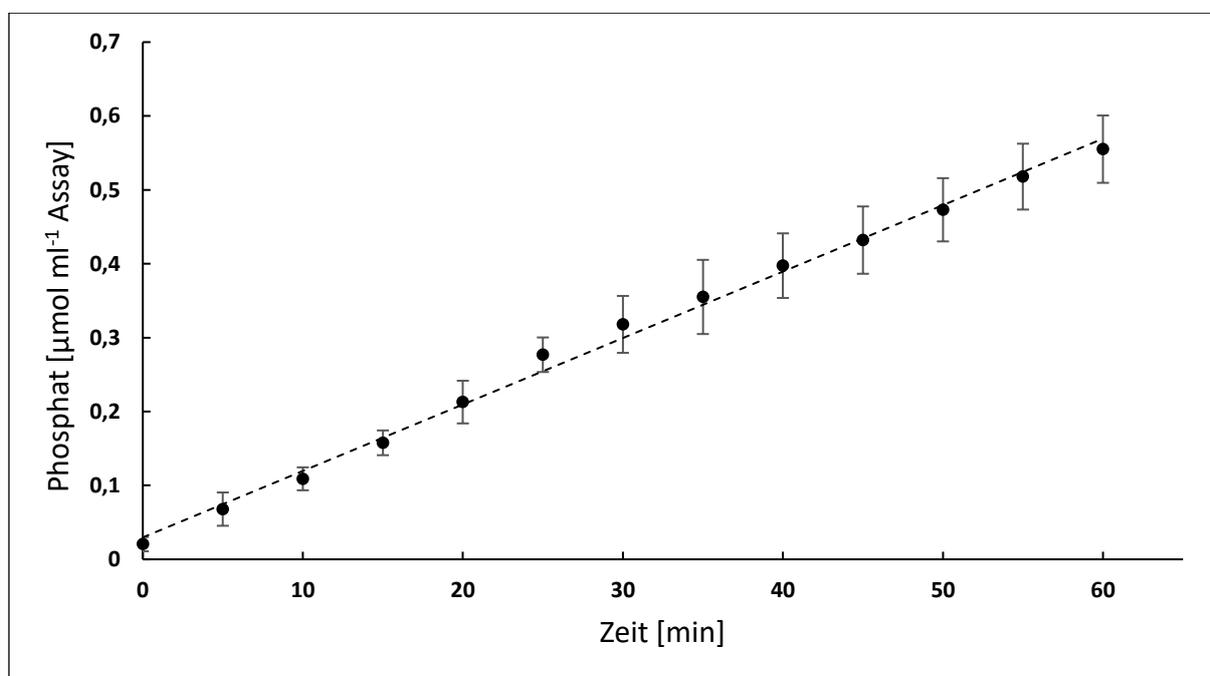
**Abbildung 10:** Analyse der Enzymaktivitäten der R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase. Ausgehend von R5P wurden mithilfe der Enzyme Triosephosphat-Isomerase und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase die Aktivitäten über die NADH-Oxidation bei 340 nm bestimmt. Dargestellt ist die Absorptionsänderung bei 340 nm pro min. Der 1 ml Ansatz beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $MgCl_2$ , 2 mM R5P, 125  $\mu$ M NADH, jeweils 20  $\mu$ g der Enzyme (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase) und jeweils 2 U der Hilfsenzyme (Triosephosphat-Isomerase und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase). Die Pfeile geben die Zugabe von NADH und der Transketolase an. Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Versuch dargestellt ist. Fehlte eines der genannten Enzyme konnte keine Reaktion nachgewiesen werden. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Anschließend konnte die im SBPP entscheidende Reaktion, die Phosphorylierung von S7P, katalysiert durch die PPI-PFK nachgewiesen werden (Abb. 11). Der Aktivitätsnachweis erfolgte über die Detektion von anorganischem Phosphat (Pi), welches bei der Phosphorylierung von S7P in Abhängigkeit von PPI durch die PPI-PFK freigesetzt wurde.



**Abbildung 11:** Schema des Aktivitätsnachweis der PPI-PFK-Reaktion des SBPPs. Die Untersuchung erfolgte über einen gekoppelten Enzym-Assay ausgehend von R5P mithilfe der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase. Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Xu5P = Xylulose-5-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, S7P = Sedoheptulose-7-Phosphat, SBP = Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat, PPI = Pyrophosphat.

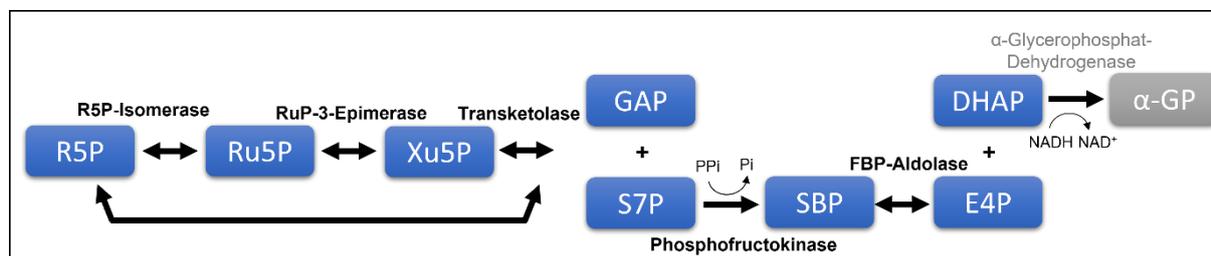
Die Aktivität der PPI-PFK wurde ausgehend von R5P und mithilfe der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase analysiert. Über die Zeit konnte dabei ein Anstieg an Pi detektiert werden (Abb. 12). Somit wurde durch die Freisetzung von Pi aus PPI die Phosphorylierung von S7P katalysiert durch die PPI-PFK bestätigt. Das freigesetzte Pi wurde über einen photometrischen Nachweis verändert nach Saheki et al. (1985) als blauer Molybdat Komplex bei 850 nm bestimmt. Die zunehmende Absorption des Chromophors korrelierte mit der Zunahme an freigesetztem Pi über die Zeit. Bei dem durchgeführten Versuchsansatz wurden  $9 \times 10^{-3} \mu\text{mol S7P ml Assay}^{-1} \text{ min}^{-1}$  durch die PPI-PFK phosphoryliert. Wurde anstelle der PPI-PFK die ATP-PFK aus *P. copri* für die Phosphorylierung von S7P eingesetzt, so konnte interessanterweise keine Enzymaktivität nachgewiesen werden. Deshalb wurde ergänzend zu den Transkriptionsanalysen (3.1.3) auch hier wieder die Beteiligung der ATP-PFK innerhalb des SBPPs in Frage gestellt. Weitere Untersuchungen zum Aktivitätsvergleich der ATP-PFK und PPI-PFK wurden in Abschnitt 3.1.4.2 durchgeführt.



**Abbildung 12:** Bestimmung der Aktivität der PPI-PFK über einen gekoppelten Assay mit den Enzymen R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase. Die Aktivität wurde über das freigesetzte anorganische Phosphat (Pi), welches bei der Phosphorylierungsreaktion von S7P aus PPI stammte, bestimmt. Pi wurde als blauer Molybdat Komplex bei 850 nm gemessen (verändert nach Saheki et al., 1985). Dargestellt ist die gebildete Pi Menge [ $\mu\text{mol/ml Assay}$ ] pro min. Der 1 ml Ansatz beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM R5P, 2 mM PPI und jeweils 20  $\mu\text{g}$  der Enzyme (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase und PPI-PFK). Jedes Experiment wurde dreimal durchgeführt, wobei der Mittelwert der Pi-Menge mit Standardabweichung dargestellt wird. Wenn eines der Enzyme fehlte, konnte keine Freisetzung von Pi nachgewiesen werden. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

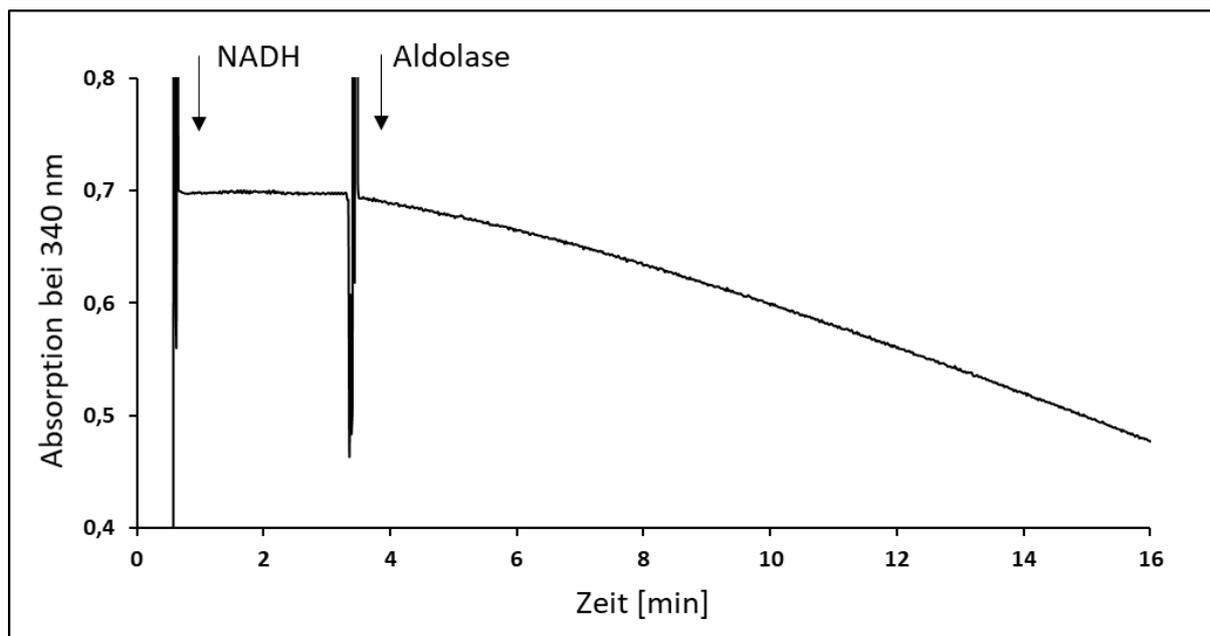
Im Anschluss wurde die zweite relevante Reaktion des SBPPs, die Umwandlung von SBP, photometrisch analysiert. In dem gekoppelten Enzymtest wurde die Spaltung von SBP zu E4P und DHAP katalysiert durch die FBP-Aldolase bestimmt. Der Nachweis erfolgte ebenfalls ausgehend von

R5P und mithilfe der Aktivitäten der R5P-Isomerase, der RuP-3-Epimerase, der Transketolase und der PPI-PFK. Für die Detektion war zusätzlich das kommerziell erworbene Hilfsenzyme  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase nötig (Abb. 13).



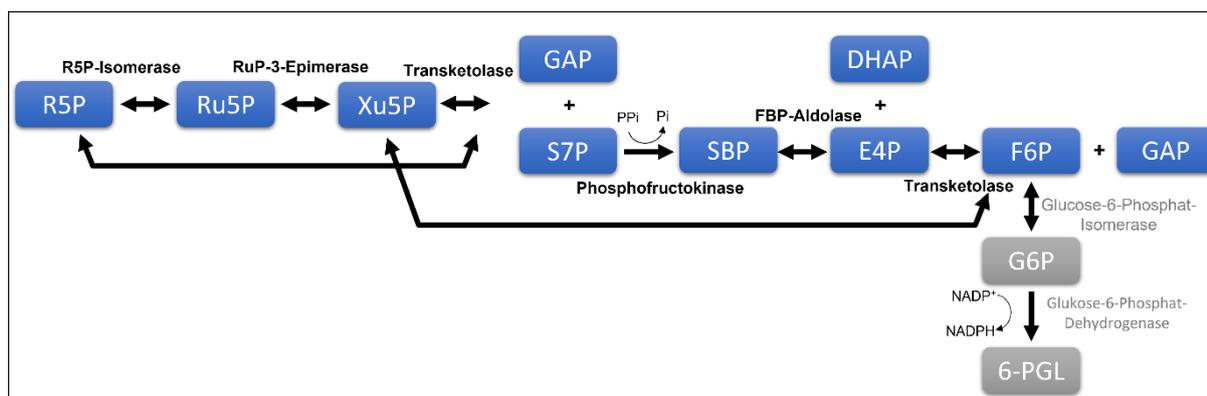
**Abbildung 13:** Schematische Darstellung des angewandten Enzymaktivitätstests zur Bestimmung der FBP-Aldolase Aktivität im SBPP. Die Aktivität wurde ausgehend von R5P mithilfe der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase und PPI-PFK bestimmt. Die enzymatische Spaltung von SBP katalysiert durch die FBP-Aldolase wurde mithilfe einer  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase (grau) nachgewiesen. Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Xu5P = Xylulose-5-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, S7P = Sedoheptulose-7-Phosphat, SBP = Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, E4P = Erythrose-4-Phosphat, FBP = Fruktose-1,6-Bisphosphat, PPI = Pyrophosphat,  $\alpha$ -GP =  $\alpha$ -Glycerophosphat.

Über die photometrisch nachweisbare Oxidation von NADH durch das Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase, wurde die Aktivität der FBP-Aldolase im gekoppelten Enzymtest ausgehend von R5P nachgewiesen (Abb. 14). Aufgrund der Absorptionsabnahme bei 340 nm, wurde bestätigt, dass die FBP-Aldolase die Spaltung von SBP in DHAP und E4P katalysiert. Unter den angewandten Versuchsbedingungen wurden  $3,1 \times 10^{-3} \mu\text{mol DHAP ml Assay}^{-1} \text{ min}^{-1}$  durch die FBP-Aldolase gebildet.



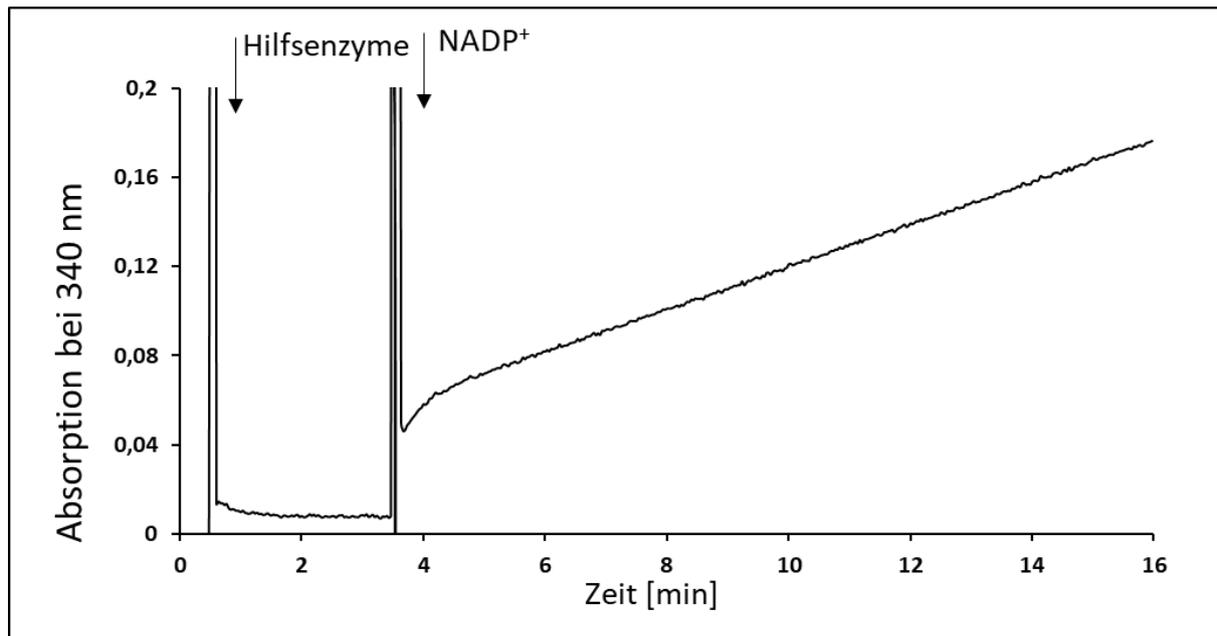
**Abbildung 14:** Nachweis der Enzymaktivität der FBP-Aldolase ausgehend von R5P mithilfe der Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase und PPI-PFK. Die Aktivität wurde mittels NADH-Oxidation bei 340 nm über das Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase gemessen. Dargestellt ist die Absorptionsänderung bei 340 nm pro min. Der 1ml Ansatz beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM R5P, 2 mM PPI, 125  $\mu$ M NADH und jeweils 20  $\mu$ g der Enzyme (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPI-PFK und FBP-Aldolase) und 2 U des Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase. Die Pfeile zeigen die Zugabe von NADH und der FBP-Aldolase an. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Ansatz dargestellt ist. Wenn eines der Enzyme fehlte konnte keine Reaktion detektiert werden. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Der letzte Schritt des SBPPs, die Umformung von Xu5P und E4P zu F6P und GAP, erneut katalysiert durch die Transketolase, wurde mithilfe der Hilfsenzyme der Glucose-6-Phosphat-Isomerase und der NADP<sup>+</sup>-abhängigen Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt (Abb. 15).



**Abbildung 15:** Schematischer Ablauf zur Analyse des gesamten SBPP ausgehend von R5P mit der finalen Bildung von F6P und GAP. Für die Aktivitätsbestimmung wurden die Enzyme R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPI-PFK, FBP-Aldolase und die Hilfsenzyme (grau) Glukose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase eingesetzt. Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Xu5P = Xylulose-5-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, S7P = Sedoheptulose-7-Phosphat, SBP = Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat; E4P = Erythrose 4-Phosphat, FBP = Fruktose-1,6-Bisphosphat, PPI = Pyrophosphat, F6P = Fruktose-6-Phosphat, G6P = Glukose-6-Phosphat, 6-PGL = 6-Phosphogluconolacton.

Photometrisch wurde die Aktivität der zweiten Transketolase-Reaktion über die messbare Reduktion von NADP<sup>+</sup> bei 340 nm nachgewiesen (Abb. 16). Das Produkt der Transketolase-Reaktion, F6P, wurde durch das Enzym Glucose-6-Phosphat-Isomerase in Glukose-6-Phosphat (G6P) umgeformt und weiter durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in 6-Phosphogluconolacton oxidiert. Die letztere Reaktion ist dabei NADP<sup>+</sup> abhängig, weshalb die Aktivität bei 340 nm bestimmt werden konnte. Unter den angewandten Bedingungen wurden  $1,5 \times 10^{-3} \mu\text{mol F6P ml Assay}^{-1} \text{ min}^{-1}$  gebildet.



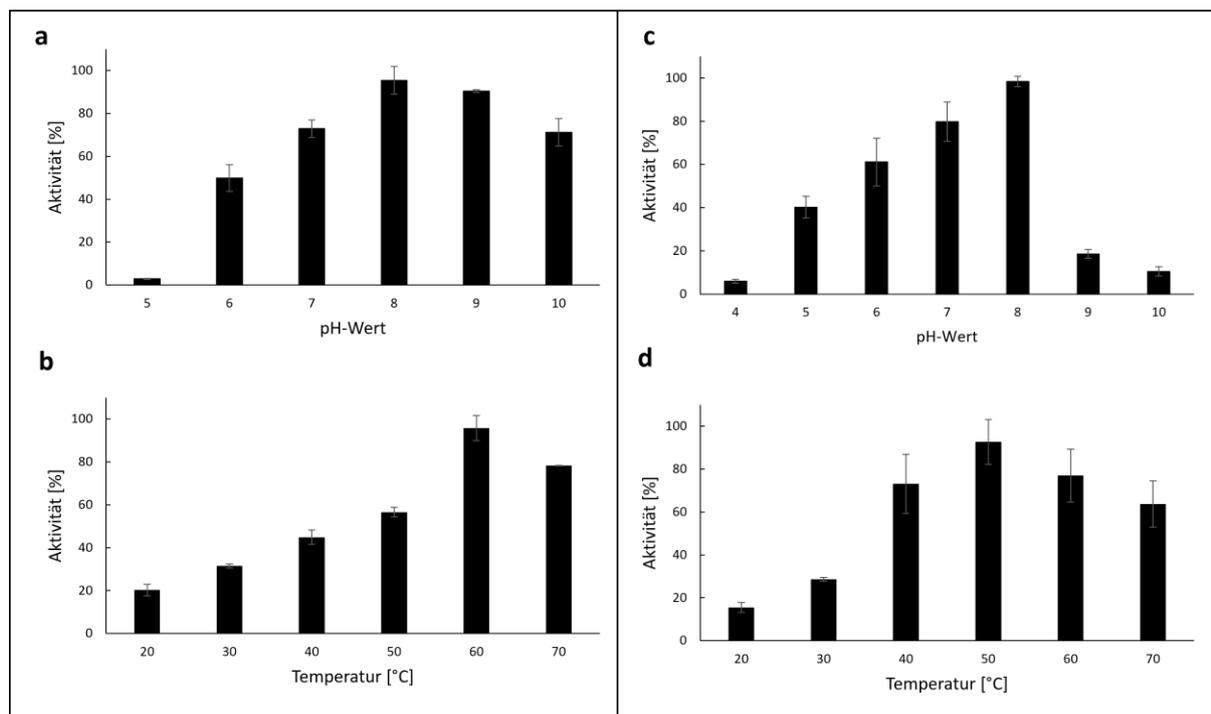
**Abbildung 16:** Nachweis der Aktivität aller Enzyme des SBPPs ausgehend von R5P mit der finalen Bildung von F6P und GAP. Die Aktivität wurde über die NADP<sup>+</sup>-Reduktion bei 340 nm mithilfe der Hilfsenzyme Glucose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase bestimmt. Der 1ml Assay beinhaltet: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM R5P, 2 mM PPI, 125  $\mu\text{M}$  NADP<sup>+</sup> und jeweils 20  $\mu\text{g}$  der Enzyme (R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPI-PFK und FBP-Aldolase) und 2 U der Hilfsenzyme Glukose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase. Der Versuchsansatz wurde ohne Hilfsenzyme und NADP<sup>+</sup> 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Pfeile zeigen die Zugabe der Hilfsenzyme und von NADP<sup>+</sup> an. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Reaktionsverlauf dargestellt ist. Wenn eines der Enzyme fehlte, konnte keine Reaktion nachgewiesen werden. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Zusammenfassend konnte die Umwandlung von R5P zu F6P biochemisch über die photometrischen Aktivitätstests nachgewiesen werden und somit wurde die postulierte Pentose-Umwandlung über den SBPP (Abb. 4.2) mit gereinigten Enzymen aus *P. copri* bestätigt. Alle Reaktionen ausgehend von R5P einschließlich der hochinteressanten kombinierten Wirkung der PPI-PFK und der FBP-Aldolase wurden nachgewiesen.

### 3.1.4.2 Enzymatische Charakterisierung der zwei Phosphofruktokinasen

Die heterolog produzierten Phosphofruktokinasen aus *P. copri* (PREVCOP\_04138 und PREVCOP\_03899) wurden hinsichtlich ihrer Phosphorylierungseigenschaften von F6P und S7P untersucht. Darüber war es möglich, Aussagen über die jeweilige Funktion innerhalb des Stoffwechsels im EMP-Weg oder im SBPP zu identifizieren. Die Analyse erfolgte für beide Substrate (F6P und S7P) bei 340 nm mithilfe der kommerziell erworbenen Hilfsenzyme FBP-Aldolase und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase. Das jeweilige Substrat wurde durch die Phosphofruktokinase zu FBP oder SBP phosphoryliert und das Produkt jeweils durch das Hilfsenzym FBP-Aldolase in DHAP und GAP oder DHAP und E4P gespalten. Im nächsten Schritt wurde das gebildete DHAP durch die NADH-abhängige  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase zu  $\alpha$ -Glycerophosphat reduziert. Diese Reaktion erfolgte in Abhängigkeit von NADH, weshalb die NADH-Oxidation bei 340 nm beobachtet werden konnte. Über diesen gekoppelten Enzym-Assay konnten die Aktivitäten der Phosphofruktokinasen bestimmt werden.

Für die kinetische Charakterisierung der Enzyme wurden zunächst die optimalen Versuchsbedingungen bestimmt. Dazu gehörte unter anderem die Bestimmung der optimalen pH-Werte bei denen die Kinasen arbeiten. Die pH-Wert Ermittlung erfolgte bei einer Temperatur von 25 °C in einem kombinierten Puffer, der den pH-Bereich von 5-10 abdeckte (50 mM Acetat, 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM Tris-HCl; Abb. 17). Die optimale Reaktionstemperatur wurde in Tris-HCl Puffer pH 8 in dem Temperatur-Bereich von 20-70 °C untersucht (Abb. 17). Der grundlegende Assay bei einem Endvolumen von 1 ml beinhaltete: 50 mM Puffer, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 U FBP-Aldolase, 2 U  $\alpha$ -Glycerophosphat Dehydrogenase, 2,5  $\mu\text{g}$  ATP-PFK oder 0,1  $\mu\text{g}$  PPI-PFK und 250  $\mu\text{M}$  NADH. Für das Substrat S7P wurde das Assay-Volumen auf 60  $\mu\text{l}$  reduziert und die Enzymmenge auf 20  $\mu\text{g}$  ATP-PFK und 0,2  $\mu\text{g}$  PPI-PFK erhöht. Für die ATP-PFK konnten optimale Reaktionsgeschwindigkeiten bei 60 °C und einem pH-Wert von 8 erzielt werden (Abb. 17.a & 17.b). Maximale Phosphorylierungsaktivität wurde für die PPI-PFK bei 50 °C und einem pH-Wert von 8 beobachtet (Abb. 17.c & 17.d).

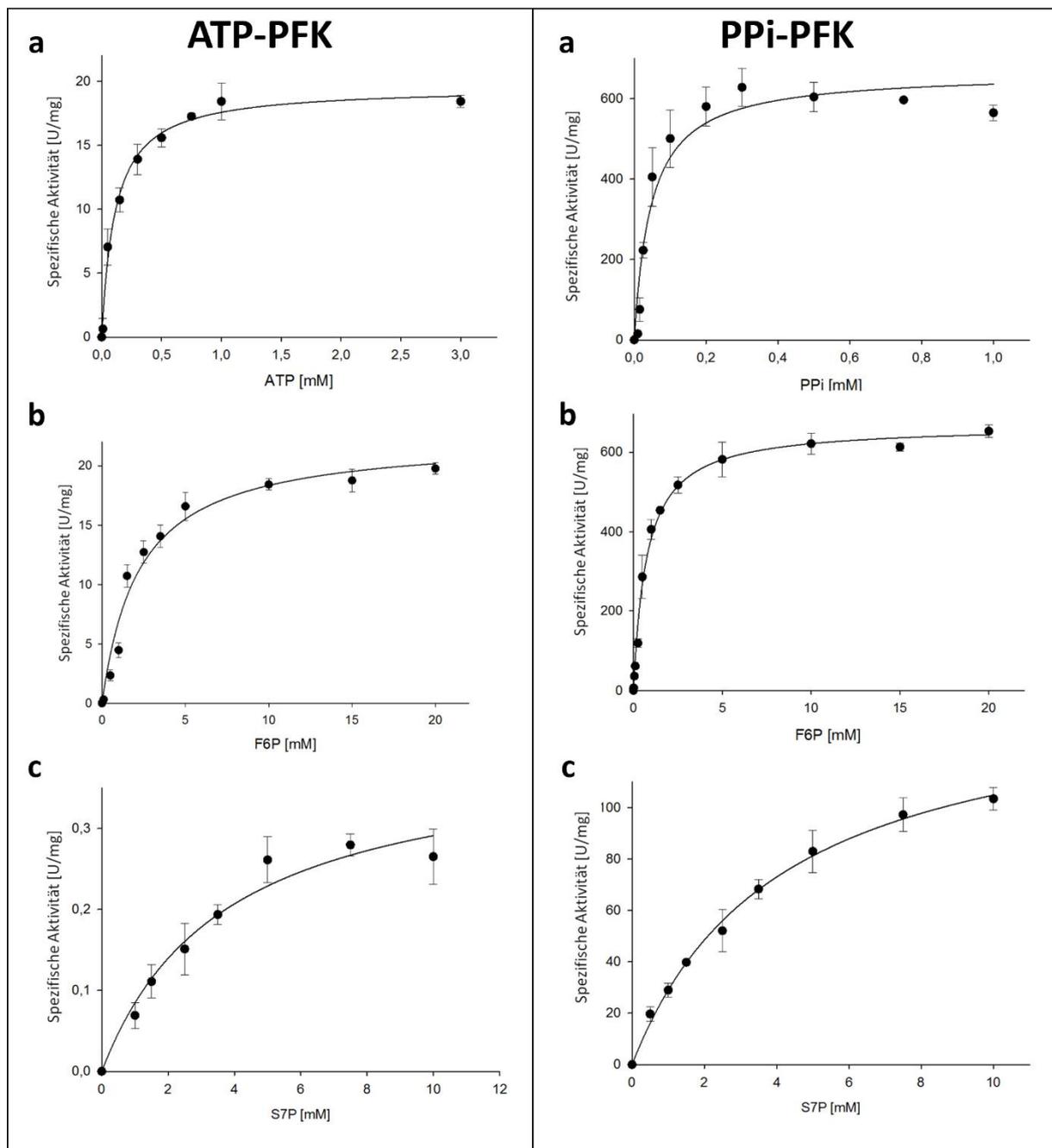


**Abbildung 17:** Aktivitäten der ATP-PFK (a & b) und der PPI-PFK (c & d) aus *P. copri* bei unterschiedlichen pH-Werten und Temperaturen zur Bestimmung der Reaktionsoptima. Das pH-Optimum wurde bei einer Temperatur von 25 °C in einem kombinierten Puffer (50 mM Acetat, 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 50 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 50 mM Tris-HCl) und das Temperaturoptimum wurde in Tris-HCl Puffer mit einem pH-Wert von 8 ermittelt. Der grundlegende Assay bei einem Endvolumen von 1 ml beinhaltete 50 mM Puffer, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 U FBP-Aldolase, 2 U  $\alpha$ -Glycerophosphat Dehydrogenase, 2,5  $\mu\text{g}$  ATP-PFK oder 0,1  $\mu\text{g}$  PPI-PFK und 250  $\mu\text{M}$  NADH. Für die ATP-PFK entsprach die Aktivität von 100 % für die Bestimmung des pH-Optimums einer spezifischen Aktivität von 5 U/mg Protein und für die Bestimmung des Temperaturoptimums 18,4 U/mg Protein. Im Vergleich dazu entsprach eine Aktivität von 100 % für die PPI-PFK bei der Bestimmung des pH-Optimums einer spezifischen Aktivität von 482 U/mg Protein und beim Optimum der Temperatur 659 U/mg Protein.

Außerdem wurde die Substratspezifität in Bezug auf den Phosphoryl-Donor ATP oder PPI der Phosphofruktokinasen bestimmt. Dabei wurde deutlich, dass die ATP-PFK PPI und die PPI-PFK ATP nicht als Phosphoryl-Donor nutzen konnten. Es wurde auch nur dann Kinase-Aktivität erhalten, wenn der jeweilige Phosphoryl-Donor im Falle der ATP-PFK ATP und für die PPI-PFK PPI vorlag. Damit wurde bestätigt, dass es sich bei PREVCOP\_04138 tatsächlich um eine ATP-abhängige PFK und bei PREVCOP\_03899 um eine PPI-abhängige PFK handelte.

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter wurden die Substratkonzentration wie folgt variiert: 0-20 mM F6P, 0-10 mM S7P, 0-3 mM ATP und 0-1,5 mM PPI. Die Messungen erfolgten beim optimalen pH Wert von 8 und physiologischer Temperatur von *P. copri* (37 °C). Für die Kinetik in Bezug auf F6P und S7P wurden ATP und PPI in einer Konzentration von 2 mM eingesetzt. Im Gegensatz dazu erfolgte für die Erfassung der kinetischen Daten für ATP und PPI, ein Einsatz von 5 mM F6P für die ATP-PFK und von 10 mM F6P für die PPI-PFK. Die kinetischen Parameter wurden aus der nichtlinearen Regression

der Michaelis-Menten-Daten bestimmt (Abb. 18). Die gesamten Daten sind in der Tabelle 13 zusammengefasst.



**Abbildung 18:** Michaelis-Menten-Kinetik der zwei Phosphofruktokinasen PREVCOP\_04138 (ATP-PFK; links) und PREVCOP\_03899 (PPI-PFK; rechts) aus *P. copri*. Dargestellt werden die ermittelten spezifischen Aktivitäten [U/mg] bezogen auf das untersuchte Substrat [mM]. **a.:** Darstellung der spezifischen Aktivitäten der PFKs in Bezug zum entsprechenden Phosphoryl-Donor (ATP oder PPI). **b.:** Spezifische Aktivitäten der PFKs für die Phosphorylierung von F6P. **c.:** Phosphorylierungsaktivität [U/mg] der PFKs in Bezug zu S7P. Die Aktivitätsmessungen erfolgte bei 340 nm mithilfe der Hilfsenzyme FBP-Aldolase und  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase. Die Abbildungen wurden mit der Software GrapPad Prism erstellt.

Zunächst konnte festgehalten werden, dass sowohl die ATP-PFK als auch die PPI-PFK das Substrat S7P phosphorylieren konnten. Dementsprechend wäre eine Funktion beider Enzyme innerhalb des SBPPs denkbar. Interessanterweise zeigten auch beide PFKs eine ähnliche Affinität zum Substrat S7P mit einem  $K_m$ -Wert von ungefähr 4 mM S7P. Dennoch wies die PPI-PFK eine ca. 370-fach höhere spezifische Aktivität ( $147,9 \pm 5,5$  U/mg) und eine ca. 600-fach höhere katalytische Effizienz ( $145 \pm 7,8$  s<sup>-1</sup>) im Vergleich zur ATP-PFK ( $0,4 \pm 0,04$  U/mg und  $0,24 \pm 0,04$  s<sup>-1</sup>) für die Phosphorylierung von S7P auf. Daher wurde deutlich, dass die PPI-PFK vermutlich die entscheidende Rolle innerhalb des SBPPs spielt.

Darüber hinaus war die PPI-PFK auch nicht nur deutlich affiner zu dem Substrat F6P ( $0,75 \pm 0,1$  mM im Vergleich zu  $2,2 \pm 0,4$  mM), sondern das Enzym zeigte auch eine etwa 30-fach höhere spezifische Aktivität ( $667,7 \pm 12,2$  U/mg) und eine 50-fach höhere katalytische Effizienz ( $654,6 \pm 16,9$  s<sup>-1</sup>) für die Phosphorylierung von F6P im Vergleich zur ATP-PFK ( $22,4 \pm 1,2$  U/mg &  $13,3 \pm 0,97$  s<sup>-1</sup>). Diese Ergebnisse deuteten ebenfalls daraufhin, dass die PPI-PFK auch im EMP-Stoffwechselweg die bedeutende Rolle für die Phosphorylierung von F6P einnimmt.

**Tabelle 13:** Kinetische Parameter der PPI-PFK und ATP-PFK aus *P. copri*.

Substrat	PPI-PFK				ATP-PFK			
	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Kcat (s-1)	Kcat/Km	Km (mM)	Vmax (U/mg)	Kcat (s-1)	Kcat/Km
F6P	$0,75 \pm$	$667,7 \pm$	$654,6 \pm$	872,8	$2,2 \pm$	$22,4 \pm$	$13,3 \pm 0,97$	6,1
	0,1	12,2	16,9		0,4	1,2		
S7P	$4,1 \pm 0,3$	$147,9 \pm$	$145 \pm$	35,4	$3,7 \pm$	$0,4 \pm$	$0,24 \pm 0,04$	0,07
		5,5	7,8		0,9	0,04		
PPI/ATP	$0,05 \pm$	$665,8 \pm$	$652,7 \pm$	13054	$0,1 \pm$	$19,5 \pm$	$11,6 \pm 0,5$	116
	0,01	39,3	55,6		0,01	0,5		

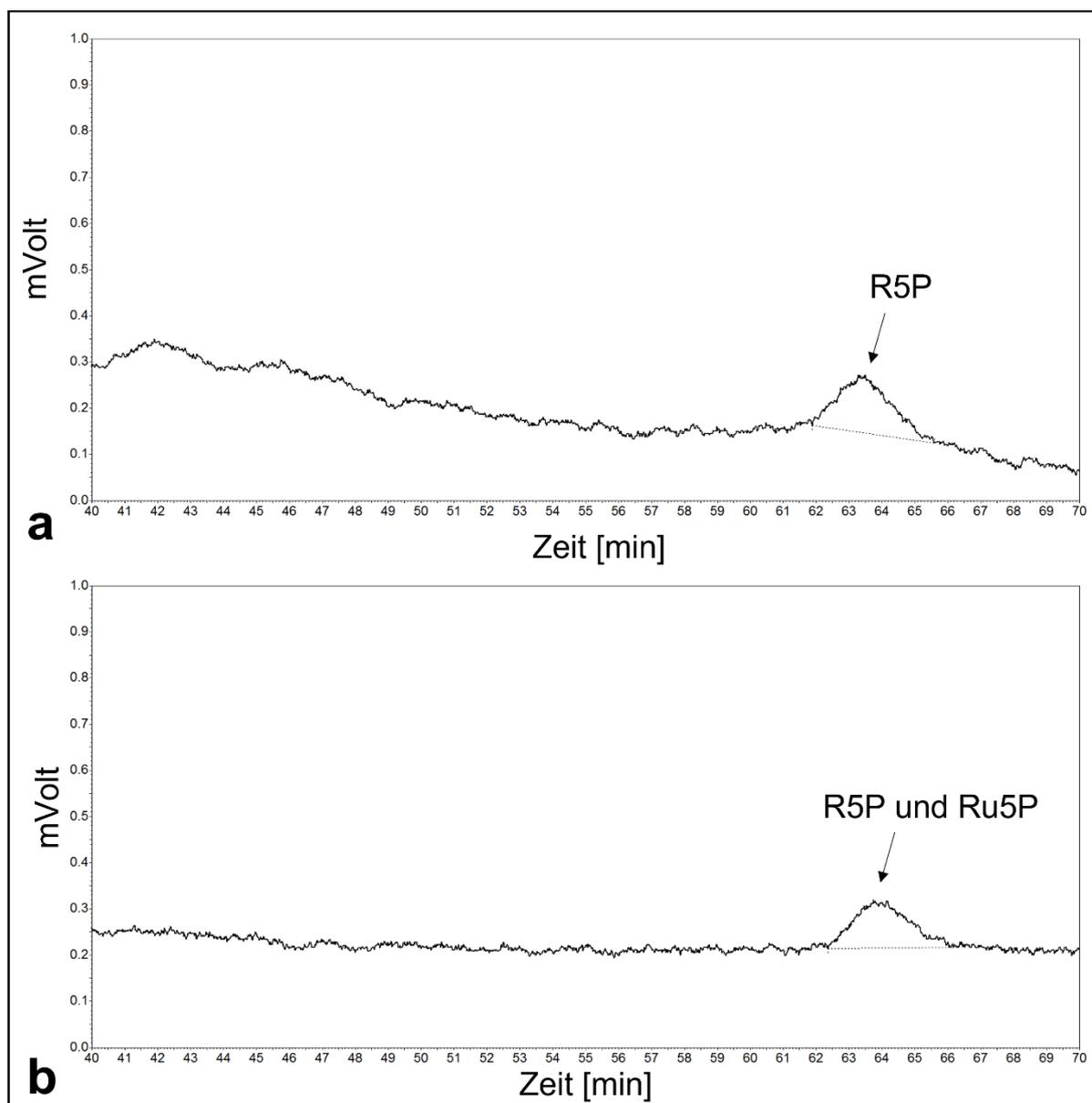
### 3.1.4.3 Bestätigung des SBPPs in *P. copri* über den Nachweis der Intermediate mittels HPLC

Neben dem Aktivitätsnachweis über photometrischen Messungen (3.1.4.1), wurde die Funktionalität des Stoffwechselwegs mit den heterolog produzierten Enzymen des SBPPs aus *P. copri* über die Detektion relevanter Intermediate mittels HPLC zusätzlich bestätigt. Ähnlich zu den Untersuchungen aus Abschnitt 3.1.4.1, wurde ausgehend von R5P, die notwendigen heterolog produzierten Enzyme schrittweise zugegeben und der Ansatz mittels HPLC analysiert. Die zu erwartenden Intermediate

konnten über Standard-Substanzen identifiziert und somit die Aktivität der Enzyme des SBPPs in *P. copri* verifiziert werden.

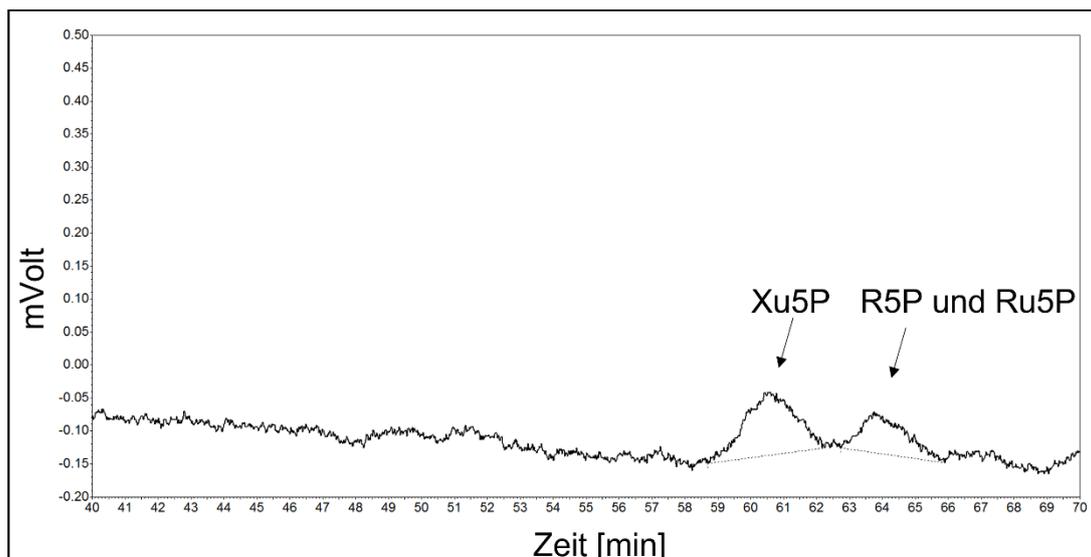
Für eine klare chromatografische Auftrennung der verschiedenen Intermediate des SBPPs, die C3-C7-Körper umfasste, wurde mit zwei unterschiedlich konzentrierten Laufmitteln (15 mM und 130 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) gearbeitet. Über den Einsatz der beiden Konzentrationen, konnten sowohl die Peaks der C5-Zucker (Xu5P und Ru5P/R5P) als auch zweifach phosphorylierte Zucker (SBP) voneinander getrennt werden.

Zu Beginn wurde die erste enzymatische Reaktion des SBPPs unter Verwendung von 15 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  als Laufmittel untersucht. Durch die Zugabe der R5P-Isomerase wurde R5P zu Ru5P isomerisiert. Diese Strukturisomere konnte allerdings chromatographisch nicht getrennt werden. Beide Substanzen traten als überlagerter Peak nach 63,8 min auf (Abb. 19.b).



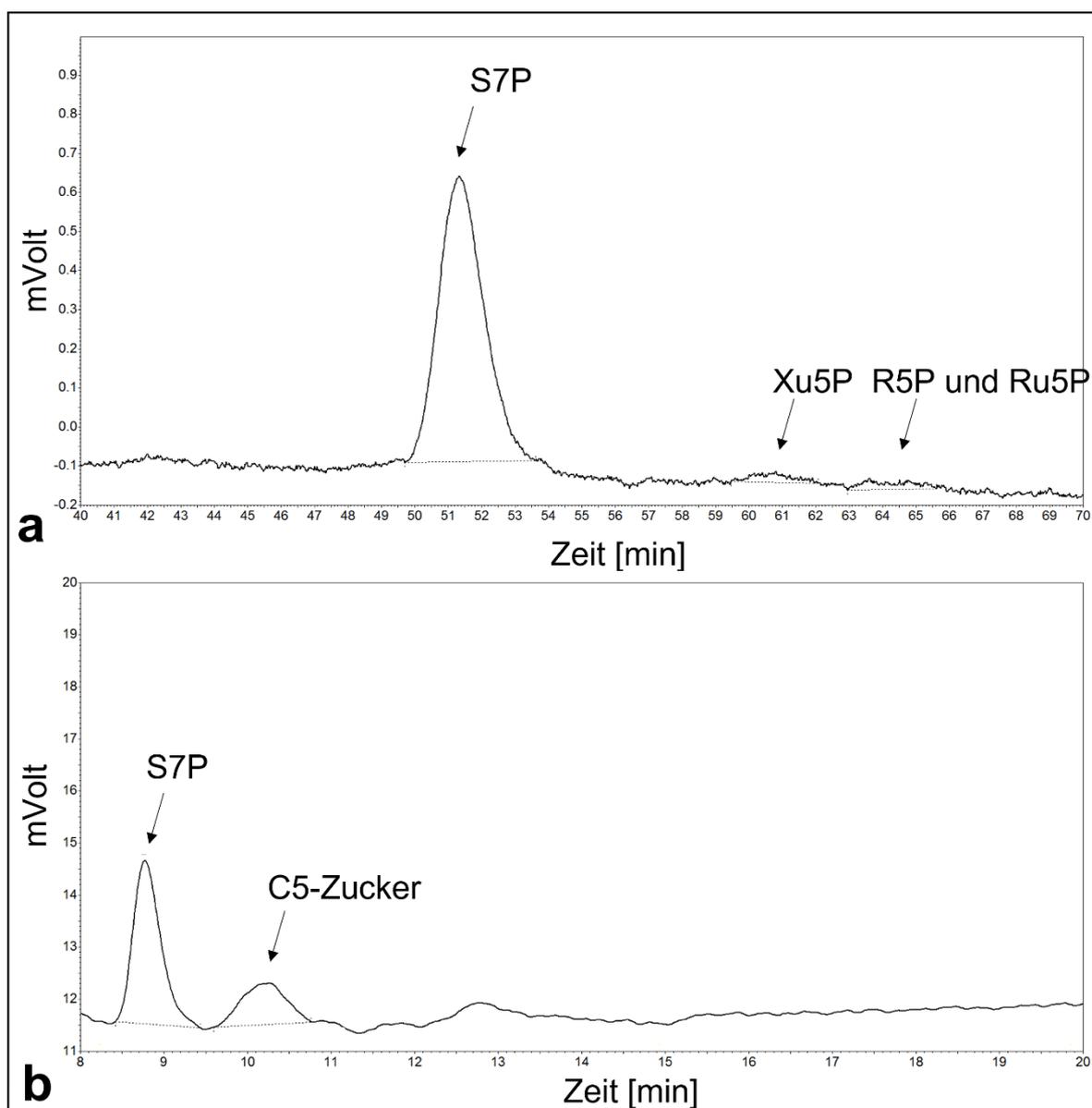
**Abbildung 19:** HPLC-Chromatogramme des Enzymassays zur Analyse der R5P-Isomerase -Reaktion aus *P. copri*. Der 1 ml Ansatz enthielt: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 5 mM R5P. 15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> wurde als mobile Phase eingesetzt. **a.** Ansatz ohne jegliche Zugabe von Enzymen (negativ Kontrolle). Das Ausgangssubstrat R5P eluierte nach 63,8 min. **b.** Ansatz mit Zugabe von 50 µg R5P-Isomerase. Der Peak bei 63,8 min entsprach den sich überlagerten Intermediaten R5P und Ru5P. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentatives Elutionsprofil dargestellt ist.

Nach Zugabe der RuP-3-Epimerase wurde das nächste Zwischenprodukt Xu5P mit einem Peak bei 60,5 min detektiert (Abb. 20). Durch die Bildung dieses Zwischenproduktes wurde somit auch indirekt die Aktivität der R5P-Isomerase bestätigt.



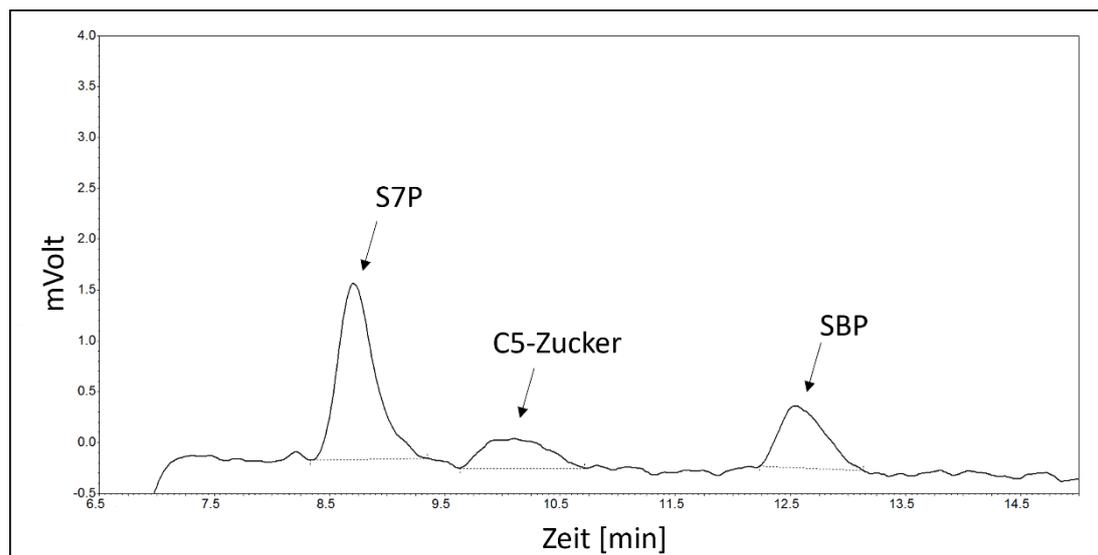
**Abbildung 20:** HPLC-Chromatogramm des Enzymassays der RuP-3-Epimerase-Reaktion aus *P. copri* ausgehend von R5P. Die Intermediate des SBPPs wurden unter Einsatz der mobilen Phase von 15 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> analysiert. Der Versuchsansatz beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM R5P und jeweils 50 µg R5P-Isomerase und RuP-3-Epimerase. Der Peak bei 63,8 min entsprach den Intermediaten R5P und Ru5P. Das Produkt der RuP-3-Epimerase-Reaktion Xu5P wurde über den Peak nach 60,5 min identifiziert. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Ansatz dargestellt ist. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Durch das Zufügen der Transketolase trat ein weiterer Peak nach 51,3 min auf. Dieser konnte dem Produkt der ersten Transketolase-Reaktion S7P zugeordnet werden (Abb. 21.a). Wurde die Laufmittelkonzentration auf 130 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> erhöht, eluierte S7P in einem distinkten Peak nach 8,7 min (Abb. 21.b). Allerdings ließen sich bei einer mobilen Phase mit 130 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> die phosphorylierten C5-Zucker nicht voneinander trennen und eluierten deshalb als überlagerter Peak nach 10,1 min. Über den Nachweis des Reaktion-Produktes S7P wurde bestätigt, dass die Transketolase Xu5P und R5P zu S7P und GAP umwandelt. Das zweite Produkt der Transketolase-Reaktion GAP, konnte über die angewandte HPLC Methode nicht nachgewiesen werden.



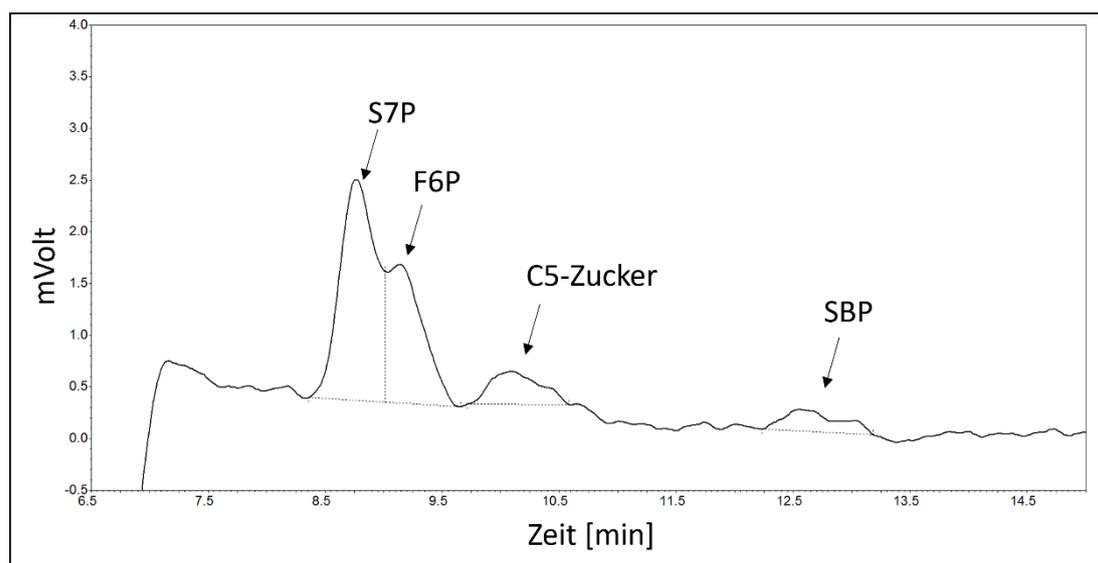
**Abbildung 21:** HPLC-Chromatogramme des Enzymassays der Transketolase-Reaktion aus *P. copri* ausgehend von dem Substrat R5P. Das Produkt-Profil wurde unter Verwendung von 15 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (a) und 130 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (b) untersucht. Der Enzymassay beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM R5P und jeweils 50  $\mu\text{g}$  R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase und Transketolase. Die Elutionsprofile waren: a. S7P nach 51,3 min, Xu5P nach 60,5 min und R5P/Ru5P nach 63,8 min. b. S7P nach 8,7 min und C5-Zucker nach 10,1 min. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Ansatz gezeigt ist. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Die für den Ersatz der fehlenden Transaldolase bedeutsame Aktivität der PPI-PFK, wurde über den chromatographischen Nachweis des Reaktionsproduktes SBP nach 12,5 min belegt (Abb. 22). Über die Detektion von SBP wurde bestätigt, dass die PPI-PFK S7P phosphorylieren kann.



**Abbildung 22:** HPLC-Chromatogramm des Enzymtests der Phosphorylierungsreaktion katalysiert durch die PPi-PFK ausgehend von R5P. Die Intermediate des SBPPs wurden unter Einsatz der mobilen Phase von 130 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  analysiert. Der Versuchsansatz beinhaltete: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM R5P, 2 mM PPi und jeweils 50  $\mu\text{g}$  R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase und PPi-PFK. Das Produkt der PPi-PFK-Reaktion, SBP, eluierte nach 12,5 min. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentatives Experiment dargestellt ist. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Durch die Zugabe der FBP-Aldolase wurde auch das letzte nachweisbare Zwischenprodukt des SBPPs F6P nach 9,1 min detektiert (Abb. 23). Dadurch wurde sowohl die Spaltung von SBP zu DHAP und E4P, katalysiert durch die FBP-Aldolase, als auch die zweite Transketolase-Reaktion, die Umformung von Xu5P und E4P zu GAP und F6P, bewiesen. Die Intermediate DHAP, E4P und GAP konnten über die verwendete HPLC-Methode nicht chromatographisch aufgetrennt bzw. detektiert werden. Wie auch bei den photometrischen Untersuchungen (3.1.4.1), konnte beim Einsatz der ATP-PFK anstelle der PPi-PFK, keine Phosphorylierung von S7P durch den Nachweis von SBP unter den verwendeten Bedingungen aufgezeigt werden.



**Abbildung 23:** HPLC-Chromatogramm des Enzymassays des gesamten SBPPs ausgehend von R5P mit der finalen Bildung von F6P. Die Intermediate wurden mithilfe von 130 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  als mobile Phase separiert. Der Enzymassay beinhaltet: 50 mM Tris/HCl Puffer pH7, 0,2 mM TPP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM R5P, 2 mM PPI und jeweils 50  $\mu\text{g}$  R5P-Isomerase, RuP-3-Epimerase, Transketolase, PPI-PFK und 85  $\mu\text{g}$  FBP-Aldolase. Das Signal für F6P nach 9,1 min wurde als finales Produkt des SBPPs nachgewiesen. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei ein repräsentativer Ansatz gezeigt wird. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

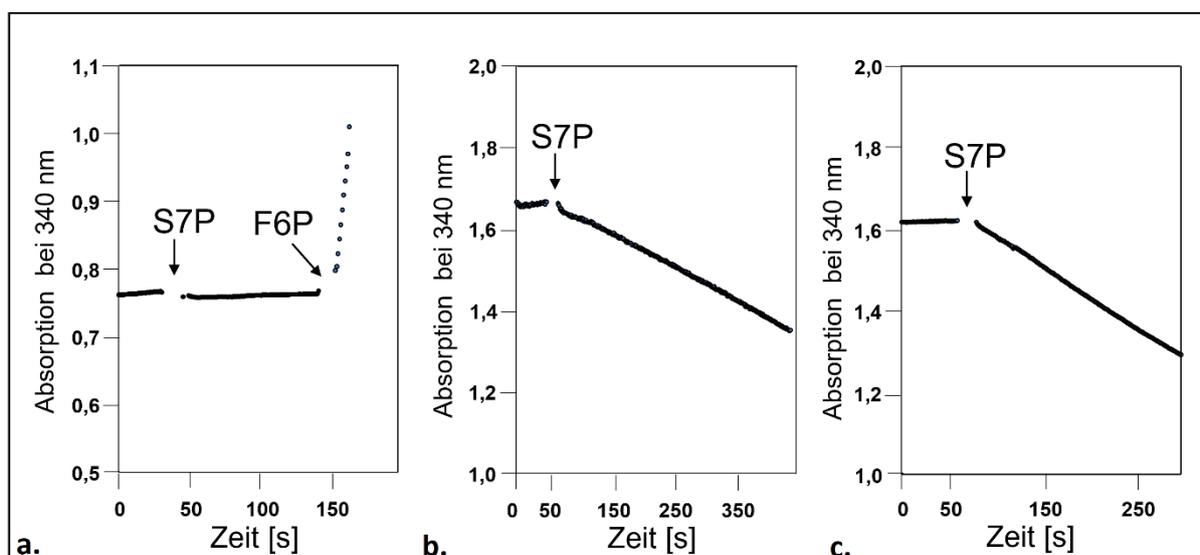
Zusammenfassend wurde zusätzlich zu der photometrischen Aktivitätsbestimmung (3.1.4.1) die enzymatische Umwandlung von R5P zu F6P über die Detektion der Intermediate mittels HPLC nachgewiesen und somit den für *P. copri* postulierten SBPP mit gereinigten Enzymen bestätigt. Alle Reaktionen ausgehend von R5P einschließlich der hochinteressanten kombinierten Reaktion der PPI-PFK und der FBP-Aldolase wurden über den chromatographischen Nachweis der Zwischenprodukte belegt.

#### 3.1.4.4 Nachweis der Kernreaktion des SPBBs im Cytoplasma von *P. copri*

Für eine Untermauerung des SBPPs in *P. copri* war ein Nachweis der Kernreaktion, also die Kombination der PPI-PFK und der FBP-Aldolase, in lebenden Zellen entscheidend. Dafür wurde das Fehlen der Transaldolase-Reaktion und das Vorhandensein der genannten Schlüsselreaktion des SBPPs im Cytoplasma von *P. copri* überprüft. Für diesen Nachweis wurden Zellen von *P. copri* auf Xylosehaltigem Medium kultiviert und geerntet. Die Zellen wurden so aufbereitet, dass die lösliche cytoplasmatische Fraktion für die Versuche verwendet werden konnte (2.5.4).

Zunächst wurde untersucht, ob eine Transaldolase-Reaktion nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden die Hilfsenzyme Glucose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase sowie die Substrate S7P und GAP verwendet. Bei einer vorhandenen Transaldolase-Reaktion wären

S7P und GAP durch die Transaldolase in F6P und E4P umgeformt worden. Das gebildete Produkt F6P würde durch die Glucose-6-Phosphat-Isomerase in G6P umgewandelt und anschließend durch die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert worden. Die letzte Reaktion ist NADP<sup>+</sup>-abhängig, weshalb die Aktivität der Transaldolase photometrisch bei 340 nm detektiert werden könnte. Den Erwartungen entsprechend wurde keine Transaldolase-Aktivität im Cytoplasma von *P. copri* detektiert (Abb. 24.a). Als Positiv-Kontrolle wurde dem Assay F6P zugefügt, wodurch die Absorption zunahm und die Funktionen der Hilfsenzyme bestätigt wurden.



**Abbildung 24:** Photometrische Untersuchungen zum Pentose-Metabolismus im Cytoplasma von *P. copri*. **a.** Die potentielle Transaldolase-Aktivität wurde über die NADP<sup>+</sup>-Reduktion bei 340 nm mithilfe der Hilfsenzyme Glucose-6-Phosphat-Isomerase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase untersucht. F6P wurde dem Assay zum Abschluss zugefügt, um die Aktivitäten der Hilfsenzyme zu bestätigen.

Die Aktivitäten der SBPP-Schlüsselenzyme wurden über die NADH-Oxidation bei 340 nm mithilfe des Enzyms  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase bestimmt. **b.** Aktivitätsnachweis der FBP-Aldolase mit Zugabe der heterolog produzierten PPI-PFK. **c.** Aktivitätsnachweis der PPI-PFK mit Zugabe der heterolog produzierten FBP-Aldolase. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt, wobei in dieser Abbildung ein repräsentativer Ansatz gezeigt wird. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Die beiden Kernreaktionen des SBPPs wurden mithilfe der  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase im Cytoplasma von *P. copri* nachgewiesen. Grundsätzlich beinhaltete der Ansatz 80  $\mu\text{g ml}^{-1}$  der cytoplasmatischen Fraktion, PPI, NADH, S7P und das Hilfsenzym  $\alpha$ -Glycerophosphat-Dehydrogenase in nicht limitierender Menge. Im ersten Versuch wurde dem Cytoplasma heterolog produzierte PPI-PFK zugefügt, um die Reaktion des FBP-Aldolase im Cytoplasma nachzuweisen (Abb. 24.b). Nach der Zugabe von S7P konnte die Oxidation von NADH beobachtet werden, wodurch die Aktivität der FBP-Aldolase im Cytoplasma bestätigt wurde. Dabei beruhte die Reaktion zunächst auf der Phosphorylierung von S7P durch die hinzugefügte PPI-PFK und anschließender Spaltung von SBP durch die FBP-Aldolase im Cytoplasma. Darauf wurde das Produkt DHAP durch das Hilfsenzym zu  $\alpha$ -

Glycerophosphat reduziert und gleichzeitig NADH oxidiert. Letztere Reaktion konnte aufgrund des Absorptionsverhalten von NADH bei 340 nm beobachtet werden. Im zweiten Ansatz wurde dann die Reaktion der PPI-PFK im Cytoplasma untersucht. Dazu wurde die heterolog produzierte FBP-Aldolase dem Assay hinzugefügt. Es konnte auch für diesen Reaktionsansatz die NADH-Oxidation beobachtet werden (Abb. 24.c). Über die Absorptionsänderung bei 340 nm wurde die Phosphorylierungsaktivität der PPI-PFK für S7P im Cytoplasma bestätigt.

Zusammenfassend wurden beide Aktivitäten der Schlüsselenzyme des SBPPs im Cytoplasma von *P. copri* nachgewiesen. Zusätzlich bestätigte das Fehlen der Transaldolase-Aktivität die bioinformatischen Analysen, dass im Genom von *P. copri* ein Transaldolase-Gen fehlt. Insgesamt wurden über die Untersuchungen im Cytoplasma erneut bewiesen, dass *P. copri* Pentosen über den SBPP metabolisiert.

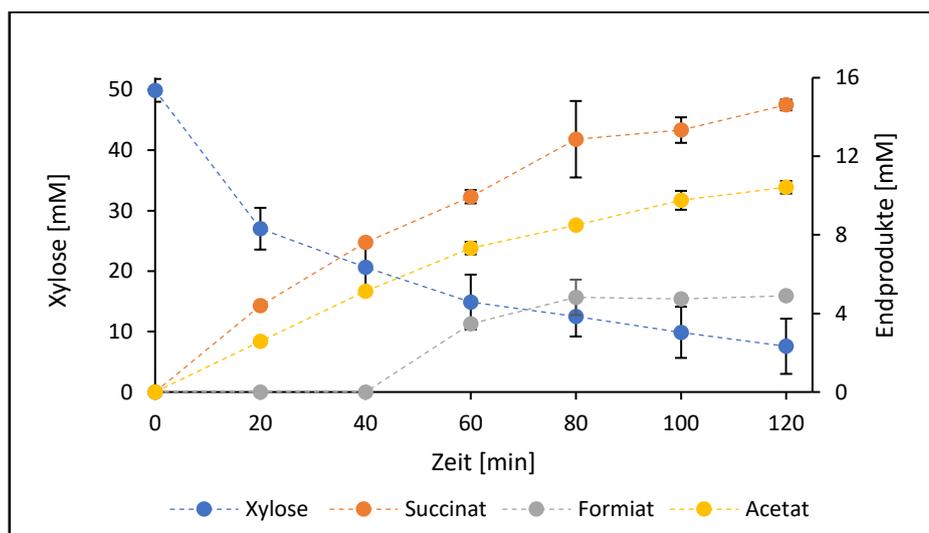
### 3.1.4.5 Analyse der Relevanz von PPI im Anabolismus von *P. copri*

In den vorherigen Abschnitten (3.1.3 - 3.1.4.3) wurde die Funktion der PPI-PFK als Schlüsselenzym innerhalb des SBPPs in *P. copri* identifiziert, weshalb angenommen werden kann, dass der zentrale Stoffwechselweg zur Umwandlung von C3-, C5- und C6- Körpern PPI-abhängig ist. Folgerichtig musste deshalb die physiologische Relevanz des Phosphoryl-Donors PPI für den Organismus *P. copri* genauer untersucht werden.

In der Regel wird PPI in einer Vielzahl von Reaktionen wie der Synthese von Zellpolymeren wie DNA, RNA und Fettsäuren sowie bei der Beladung von tRNAs mit Aminosäuren gebildet. Es ist nicht klar, ob das bei diesen anabolen Reaktionen als Nebenprodukt gebildete PPI ausreicht, um die PFK-Reaktion im PPI-abhängigen SBPP aufrechtzuerhalten. Deshalb wurden Substratverwertungsversuche von ruhenden *P. copri*-Zellen auf Xylose durchgeführt, um zu analysieren, ob nicht-wachsende Zellen dennoch in der Lage waren, Xylose zu verwerten. Ruhende Zellen stellen präparierte Zellen dar, die keine Zellteilung mehr betreiben, aber dennoch metabolische Reaktionen katalysieren können. Mithilfe von ruhenden Zellen können metabolische Reaktionen wie die Verwertung von Xylose über den SBPP unabhängig vom Anabolismus betrachtet werden. Falls PPI lediglich aus anabolen Reaktionen, also mit dem Zellwachstum verbundene Reaktionen, stammte, so müsste die Xylose-Verwertung durch die ruhenden Zellen zum Erliegen kommen.

Den ruhenden *P. copri*-Zellen wurde Xylose als Substrat zugefügt. Die mögliche Abnahme der Xylose-Konzentration und die Bildung der für den Organismus typischen Stoffwechselendprodukte wurden mittels HPLC analysiert. Interessanterweise war es den nicht-wachsenden *P. copri*-Zellen möglich, Xylose zu verwerten (Abb. 25). Dabei nahm die Xylose-Konzentration von ungefähr 50 mM auf 7,5 mM ab und die typischen Stoffwechselendprodukte von *P. copri* (Succinat 14,6 mM, Acetat 10,4 mM und

Formiat 4,9 mM) konnten nachgewiesen werden. Die ruhenden Zellen, die nicht zu anabolen Reaktionen befähigt waren, verstoffwechselten Xylose zu Succinat, Acetat und Formiat, wobei der PPI-abhängige SBPP zellulär ablief. Somit hängt die PPI-Synthese in *P. copri* nicht ausschließlich von der Biomasse-Bildung ab. Da der PPI-abhängige SBPP ohne anabole Reaktionen ablief, müssen in *P. copri* vermutlich katabole, PPI-bildende Reaktionen vorliegen, die den PPI-Bedarf des Stoffwechsels abdecken. Weitere Überlegungen zur Relevanz von PPI für den Stoffwechsel von *P. copri* werden im Abschnitt 4.3 behandelt.



**Abbildung 25:** Analyse der Xylose-Verwertung und Bildung von Stoffwechselendprodukten von ruhenden *P. copri*-Zellen mittels HPLC. Dargestellt wird die Abnahme der Xylose-Konzentration (blau) mit den resultierenden Produkten des Stoffwechsels, bestehend aus Succinat (orange), Formiat (grau) und Acetat (gelb). Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben sind.

### 3.1.5 Vorkommen des SBPPs innerhalb von Darmbakterien

Die Analysen in dieser Arbeit zeigten, dass *P. copri* als einer der bakteriellen Hauptvertreter im menschlichen Dickdarm, Pentosen nicht über den klassischen PPP verstoffwechselt. Stattdessen nutzt *P. copri* den SBPP mit der kombinierten Aktivität der PPI-PFK und der FBP-Aldolase als Schlüsselemente dieses Stoffwechselwegs.

Darauf aufbauend stellte sich die Frage, ob das Vorhandensein des SBPPs ein seltener Fall ist und nur in wenigen Organismen vorkommt oder ob der Stoffwechselweg unter den Darmbakterien weit verbreitet ist.

#### 3.1.5.1 Bioinformatische Analyse des SBPPs in bakteriellen Hauptvertretern des menschlichen Darms

Um die Fragestellung der Verteilung des SBPPs innerhalb der Darmmikrobiota zu untersuchen, wurde eine detaillierte BLAST-Analyse mit einer Reihe von zahlreich vorhandenen humanen Darmbakterien

durchgeführt. Dabei wurde das Augenmerk auf das Fehlen der Transaldolase in Kombination mit dem Auftreten einer PPI-PFK gelegt. Die häufigsten Vertreter der Darmmikrobiota wurden aus den Daten des MetaHIT-Projekts (*Metagenomics of the Human Intestinal Tract*, Qin et al., 2010) und der Übersichtsarbeit von Rinniella et al. (2019) erhalten. Für diese Analyse wurden alle verfügbaren Genome der jeweiligen Art aus den Datenbanken von NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) und IMG (<https://img.jgi.doe.gov/>) bezogen (vgl. Abschnitt 2.6). Damit wurde ausgeschlossen, dass Transaldolase-Gene übersehen wurden, die potenziell in einer nicht sequenzierten Lücke unvollendeter Genome lagen. Es wurden für jede Art mindestens zwei sequenzierte Stämme bzw. zwei unabhängige Sequenzierungsprojekte verwendet. Ausnahmen waren *Alistipes putredinis*, *Blautia hansenii* und *Catenibacterium mitsuokai*, da nur eine Genomsequenz zur Verfügung stand.

Für die bioinformatische Identifizierung einer Transaldolase im Proteom eines Organismus, musste zunächst eine Grundlage für die fünf Unterfamilien der Protein-Klasse der Transaldolasen aufgestellt werden, da sich zwei der Subfamilien in ihrer Aminosäuresequenz ähneln und häufig für Fehlannotationen sorgen (Samland und Sprenger, 2009). Über einen multiplen Sequenzabgleich, konnten die Transaldolasen und verwandte Proteine in fünf Unterfamilien eingeteilt werden (Samland und Sprenger, 2009). Die meisten Transaldolase-Proteine bestehen aus 310-350 Aminosäuren (Köhler et al., 1996; Schürmann und Sprenger, 2001; Unterfamilie 1), jedoch kommen auch größere pflanzliche (>380 Aminosäuren, Caillau & Quick, 2005; Moehs et al., 1996; Unterfamilie 2 und 3) und kleinere bakterielle (ca. 220 Aminosäuren, Inoue, 2006; Schürmann und Sprenger, 2001; Soderberg und Alver, 2004; Unterfamilie 4) vor. Die klassische Transaldolase (310-350 Aminosäuren) der Unterfamilie 1 ist in Bakterien und Menschen weit verbreitet. Erstaunlicherweise gibt es bei Prokaryoten eine größere Vielfalt der Transaldolase-Sequenzen. Damit jede bekannte Form der Transaldolase-Proteine in der bioinformatischen Analyse betrachtet werden konnte, wurden von jeder Unterfamilie mehrere Proteine mit biochemischer Charakterisierung als Referenzen verwendet. Interessanterweise ähneln sich die Enzyme der Subfamilie vier (kleine ca. 220 Aminosäuren bakterielle Transaldolase) und fünf (F6P-Aldolasen) in ihrer Sequenzlänge und Struktur sehr, weshalb diese häufig miteinander verwechselt werden. Die Proteine unterscheiden sich aber in ihrer enzymatischen Funktion, denn F6P-Aldolasen spalten F6P reversibel in Dihydroxyaceton (DHA) und GAP, wohingegen Transaldolasen GAP und S7P reversibel in E4P und F6P umformen (Schürmann und Sprenger, 2001). Der entscheidende Unterschied zwischen den aktiven Zentren der Enzyme ist das Vorhandensein von entweder einem Transaldolase-spezifischen Glutamat (Glutamin in F6P-Aldolasen) oder einem F6P-Aldolase-spezifischen Tyrosin (Phenylalanin in Transaldolasen) (Sautner et al., 2015). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden Proteine einem multiplen Alignment unterzogen und auf die enzymespezifischen Aminosäuren des aktiven Zentrums verglichen. Im Allgemeinen wurden die BLAST-Analysen nur mit

biochemisch charakterisierten Referenzenzymen der Transaldolasen und F6P-Aldolasen durchgeführt (vgl. Abschnitt 2.6).

Über die Untersuchung der Genome, wurde aufgedeckt, dass neben *P. copri* weitere wichtige Vertreter der menschlichen Darmmikrobiota keine Transaldolase-Gene besaßen (Tabelle 14). Dazu zählten beispielhaft *Akkermansia muciniphila*, *Alistipes shahii*, *Bacteroides coprocola*, *Butyrivibrio crossotus*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Prevotella stercorea* und *Ruminococcus bromii*. Interessant war dabei die Gattung *Bacteroides*, denn hier war die Verteilung einer fehlenden Transaldolase nicht konsistent. Einige *Bacteroides*-Arten besaßen keine Transaldolase-Gene (*B. coprocola*, *B. coprophilus*, *B. eggerthii*, *B. fingoldii* und *B. plebeius*), wohingegen andere wichtige *Bacteroides*-Stämme eine Transaldolase der Unterfamilie vier aufwiesen (*B. caccae*, *B. cellulosilyticus*, *B. dorei*, *B. intestinalis*, *B. stercoris*, *B. xylanisolvens*, *B. fragilis*, *B. ovatus*, *B. thetaiotaomicron* und *B. uniformis*).

**Tabelle 14:** Verteilung des SBPPs und PPPs in verschiedenen humane Darmbakterien. Fett gedruckte und hellgrau unterlegte Spezies nutzen den SBPP.

Bakterienspezies (Zahlen geben Anzahl der analysierten Stämme wieder)	Transaldolase negativ	Transaldolase positiv	F6P-Aldolase	PPi-PFK	SBPP oder PPP
<b><i>Akkermansia muciniphila</i> (25)</b>	<b>25</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>25</b>	<b>SBPP</b>
<i>Alistipes putredinis</i> DSM 17216 (1)	0	1	0	1	PPP
<b><i>Alistipes shahii</i> (2)</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>SBPP</b>
<i>Anaerobutyricum hallii</i> (9)	0	9	0	9	PPP
<i>Bacteroides caccae</i> (4)	0	4	0	4	PPP
<i>Bacteroides cellulosilyticus</i> (4)	0	4	0	4	PPP
<b><i>Bacteroides coprocola</i> (2)</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>SBPP</b>
<b><i>Bacteroides coprophilus</i> (5)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>SBPP</b>
<i>Bacteroides dorei</i> (7)	0	7	0	7	PPP
<b><i>Bacteroides eggerthii</i> (5)</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>SBPP</b>
<b><i>Bacteroides fingoldii</i> (4)</b>	<b>4</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>SBPP</b>
<i>Bacteroides fragilis</i> (8)	0	8	0	8	PPP
<i>Bacteroides intestinalis</i> (4)	0	4	0	4	PPP
<i>Bacteroides ovatus</i> (19)	0	19	0	1	PPP
<b><i>Bacteroides plebeius</i> (2)</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>SBPP</b>



<i>Holdemania filiformis</i> (2)	2	0	0	2	SBPP
<i>Lachnoclostridium scindens</i> (2)	0	2	0	2	PPP
<i>Lactobacillus ruminis</i> (10)	10	0	0	10	
<i>Lactococcus lactis</i> (40)	40	0	0	40	
<i>Megamonas hypermegale</i> (5)	5	0	5	5	
<i>Odoribacter splanchnicus</i> (13)	0	13	0	13	PPP
<i>Parabacteroides johnsonii</i> (5)	5	0	0	5	SBPP
<i>Prevotella copri</i> (3)	3	0	0	3	SBPP
<i>Prevotella stercorea</i> (2)	2	0	0	2	SBPP
<i>Pseudoflavonifractor spp.</i> (16)	16	0	0	16	SBPP
<i>Roseburia intestinalis</i> (9)	0	9	0	8	PPP
<i>Roseburia inulinivorans</i> (12)	12	0	0	12	SBPP
<i>Ruminococcus bromii</i> (5)	5	0	0	5	SBPP
<i>Streptococcus salivarius</i> (16)	16	0	0	16	
<i>Veillonella parvula</i> (12)	0	12	0	11	PPP
<i>Victivallis vadensis</i> (2)	2	0	0	2	SBPP

Trat bei der BLAST-Analyse eine hohe Homologie zwischen der potenziellen Transaldolase zu Transaldolasen der Unterfamilie 4 auf, wurde für die korrekte Zuordnung (Transaldolase Typ 4 vs. F6P-Aldolase) ein multiples Sequenz-Alignment mit Fokus auf die enzyspezifischen Aminosäuren durchgeführt. Diese Zuordnung war für die Arten *Catenibacterium mitsuokai*, *Clostridium leptum*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Megamonas hypermegale* nötig (Abb. 26). Über die Alignments wurde bewiesen, dass es sich bei allen putativen Transaldolasen um F6P-Aldolasen handelte.

Ecol	AWAKQQSNDRAQQIVDATDKLAVNIGLEILKLV--GRISTEVDARLSYDTEASIAKAKR	114
Bsub	-----DRLREITDVVK--GSVSAEV---ISLKAEMIEEGKE	73
Bvul	-----KHYIEICNIVD--GDVSAEV---IATNYEGMIKEGEE	76
Cmit	-----GHMREIRKIIIGDERSLHTQV---IATEADEIVKEAHK	75
Mhyp	-----NHFAEIRKIIIGREKSLHVQV---TTTTAEEIIREAHG	75
Efl	-----AQMKEIKKTIQ--ASLHVQV---VQQTTEEMLEDAQT	74
Efc	-----SHMKEIKKIIIGQ--IPIHIQT---IGRTEEMIEDARV	74
Clep	-----DVLANIAKEFP--EIPVFCQV---VAKDTEGMVAEARK	73
FsaA	-----VVLPLQHEAMGGQGRLEFAQV---MATTAEGMVNDALK	74
FsaB	-----EVLPRQLKAIIGDEGILFAQT---MSRDAQGMVEEAKR	74
Ecol	LIIKLYNDAGISNDRILIKLASTWQGIRAAEQLEKEGINCNLTLFSAQARACAEAGVFL	174
Bsub	LAK-----IAPNITVKIPMTSDGLKAVRALDGLIKTNVTLIFNANQALLAARAGATY	126
Bvul	LAA-----LNPPIVVKVPCIEDGIIKAIKYSNKGIRTNCTLVFSAGQALLAAGATY	129
Cmit	IFE-----EVDDKVYVKVPTTYEGVKAMKILKAEKGNVTATAVYDLMQAYMALAAGADY	129
Mhyp	ICE-----KIDKDVYIKIPVTVEGLAAMQALKKEGFNITATAIYTKMQGFLAMEAGADF	129
Efl	IVQ-----QLGQETFIKIPVNEAGLAAIKQLKQANYRITATAIYTEFQGYLAIAGADY	128
Efc	IEE-----ELGKDTFIKVPVQAGLQAIKILKKEGYLITGTAIYTELQGYLAINNGADY	128
Clep	IVT-----AGKNIVVKLPATREAVKAIKILHAEGIKTCATAVLTASQGFLCATAGADY	126
FsaA	LRS-----IADIVVKVPVTAEGLAAIKMLKAEGIPTLGTAVYGAQGLLSALAGAEY	127
FsaB	LRD-----AIPGIVVKIPVTSEGLAAIKILKKEGITTLGTAVYSAAQGLLAALAGAKY	127
Ecol	ISEFVGRILDWYKANTDKKEYAPAEDPGVSVSEIYQYYKEHGYETVVMGASFRNIGELL	234
Bsub	VSEFVGLRLDDI-----GHNGLDLISEVKQIFDIHGLDTQIIAASIRHPQHVT	173
Bvul	VSEFVGLRLDDI-----CNDGVLVAQIVELYQTYDYKTQVLAASIRNTHLIL	176
Cmit	IAFYTNRIGNL-----GNDPFELMAHLSNRIVEDGDCKILAAAFKGVQQVR	176
Mhyp	IAFYVNRMQNL-----DINSDEIAAFAKAIEERYNYGTKLAAAFKMMGQVN	176
Efl	IAFYVNRMQNL-----TIDSQVIEHLAAEIKRTNAKSKILAAAFKVNVAQIN	175
Efc	IAFYVNRMQNQ-----GIDAMKVIDSLRTEIERTQRPTKILAAAFKNCQVQT	175
Clep	VAFYVGNQDVI-----GYDGLVTLQQLCDVIEHEGLPTEVLAASIEKPQEV	173
FsaA	VAFYVNRIDAQ-----GGSGIQVTVDLHQLLKMHPQAKVLAASFKTPRQAL	174
FsaB	VAFYVNRVDAQ-----GGDGIRTVQELQTLLEMHAPESMVLAAAFKTPRQAL	174

**Abbildung 26:** Multiples Sequenz-Alignment von Aldolasen aus verschiedenen Darmbakterien zur Ermittlung von Transaldolasen und F6P-Aldolasen anhand von Referenzsequenzen. Die Identifizierung erfolgte nach Sautner et al. (2015) über die Analyse der Aminosäuren: Transaldolase-spezifisch Glu (E) oder F6P-Aldolase-spezifisch Gln (Q) und F6P-Aldolasen-spezifisch Tyr (Y) oder Transaldolase-spezifisch Phe (F). Dargestellt sind die Alignments der folgenden Organismen: *Catenibacterium mitsuokai* (Cmit; IMG-Gen-ID 644182411), *Megamonas hypermegale* (Mhyp; IMG-Gen-ID 2523935090), *Enterococcus faecalis* (Efl; IMG-Gen-ID 650493676), *Enterococcus faecium* (Efc; IMG-Gen-ID 2860427242) und *Clostridium leptum* (Clep; IMG-Gen-ID 2835068333). Als Referenzproteine wurden die Transaldolasen von *Escherichia coli* (Ecol, UniProt ID P0A870), *Bacillus subtilis* (Bsub, UniProt ID P19669), *Phocaicola (Bacteroides) vulgatus* (Bvul, BVU\_3333) und die F6P-Aldolasen A und B aus *E. coli* (FsaA, UniProt ID P78055; FsaB, UniProt ID P32669) verwendet. Die entscheidenden Aminosäuren sind mit einem schwarzen Kasten markiert. Die Abbildung wurde mit dem Programm CLUSTAL OMEGA ([www.clustal.org/omega/](http://www.clustal.org/omega/)) erstellt. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Interessanterweise ist die physiologische Funktion der F6P-Aldolasen bislang nicht bekannt (Schürmann und Sprenger, 2001). Es ist aber grundsätzlich anzunehmen, dass die untersuchten Organismen mit F6P-Aldolase, Pentosen nicht über den regulären PPP metabolisieren, da die Funktion der Transaldolase dennoch fehlt. Da aber F6P-Aldolasen das Substrat der Transaldolase-Reaktion, S7P, generell in E4P und GAP spalten können (Schürmann et al., 2002), konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden, dass diese Bakterien den SBPP zur Umwandlung von S7P nutzen. Die Intermediate E4P und GAP könnten in den zentralen Kohlenstoffwechsel eingeschleust werden und mithilfe der F6P-Aldolase das Fehlen der Transaldolase umgangen werden. Auch war für die untersuchten Milchsäurebakterien eine Vorhersage des SBPPs aufgrund fehlender Transaldolase (Tabelle 14; *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus ruminis*, *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*) schwierig, da neben dem SBPP eine andere Reaktion für den Ersatz der

Transaldolase-Reaktion zuständig sein könnte. Heterofermentative und fakultativ homofermentative Milchsäurebakterien nutzen den Phosphoketolase-Weg, wobei die Phosphoketolase Xu5P zu GAP und Acetylphosphat spaltet und so der PPP umgangen werden kann (Rohr et al., 2002). Im Gegensatz dazu verwenden streng homofermentative Milchsäurebakterien den regulären PPP-Weg (Gänzle, 2015). Es gibt auch Hinweise darauf, dass die Phosphoketolase Acetylphosphat und E4P aus F6P bildet, damit den Vorläufer E4P für die Synthese aromatischer Aminosäuren bereitstellt und somit essentielle Reaktionen des PPPs für den Anabolismus der Zelle ersetzt (Henard et al., 2015). Da nicht eindeutig geklärt werden konnte, ob die Stämme mit F6P-Aldolase und die untersuchten Milchsäurebakterien ohne Transaldolase für den Abbau von Pentosen den SBPP anwenden, wurden für diese Organismen in Tabelle 14 keine Vorhersage des Pentose-Stoffwechselwegs getroffen.

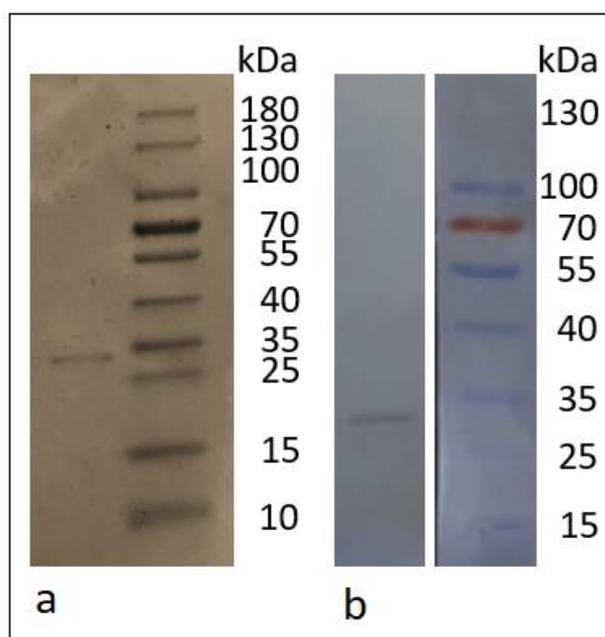
Über die Vermutungen bezüglich der Verbindung von fehlender Transaldolase und Nutzung des SBPPs für Milchsäurebakterien und Organismen mit F6P-Aldolase, wurde deutlich das neben dem Fehlen der Transaldolase auch das Vorhandensein einer PPI-PFK für eine genauere Aussage für das Auftreten des SBPPs untersucht werden musste.

Daher wurden alle Proteome, die verwendet wurden, auch auf das Vorhandensein einer PPI-PFK analysiert (Tabelle 14). Hier wurden Enzyme aus verschiedenen Klassen der PPI-PFK mit bekannter Aktivität als Referenz verwendet (vgl. Abschnitt 2.6). PPI-PFKs lassen sich nach Siebers et al. (1998) in zwei Gruppen von PFKs wiederfinden. Dabei erfolgt die Einteilung über die Sequenzlänge (Gruppe 1 > 400 Aminosäuren, Gruppe 2 < 400 Aminosäuren). Die Analysen zeigten, dass in allen Genomen der untersuchten Arten, Gene gefunden wurden, die für Enzyme mit hoher Ähnlichkeit zu biochemisch charakterisierten PPI-PFKs kodieren (Tabelle 14).

Über die Kombination des Fehlens einer Transaldolase und das Vorhandensein einer PPI-PFK konnte für die untersuchten Organismen eine genaue Aussage getroffen werden, dass anstelle des regulären PPP der SBPP für den Pentose-Stoffwechsel verwendet wird. Zu diesen Organismen zählten unter anderem: *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides coprocola*, *Bacteroides finegoldii*, *Coprococcus eutactus*, *Holdemania filiformis*, *Prevotella stercorea*, *Ruminococcus bromii* und *Victivallis vadensis*. Mithilfe der durchgeführten genomischen Analysen konnte festgestellt werden, dass der SBPP kein Ausnahmefall für *P. copri* darstellt, sondern in verschiedenen intestinalen Bakteriengruppen weit verbreitet ist. Darunter fallen die Phyla Bacteroidetes, Firmicutes bis hin zu Proteobakterien (z.B. *Bilophila wadsworthia*), Verrucomicrobia (z.B. *Akkermansia muciniphila*) und Lentisphaerae (z.B. *Victivallis vadensis*). Es kann ferner vermutet werden, dass der SBPP auch in weiteren Organismen über das Habitat des Darms hinaus anstelle des PPP existiert, weshalb die Reichweite der Verteilung des SBPPs Grundlage weiterer Untersuchungen bietet.

### 3.1.5.2 Biochemische Untersuchung zum Pentose-Metabolismus in *P. vulgatus*

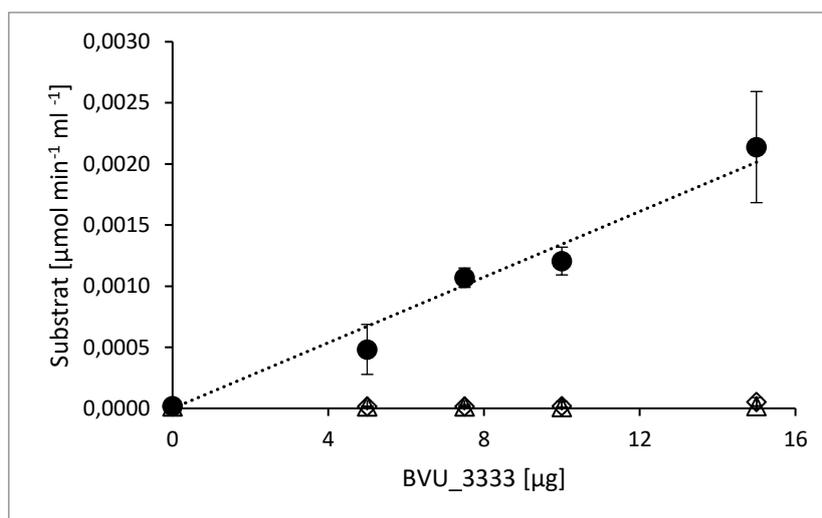
Die biochemischen Experimente mit *P. copri* zeigten, dass das Bakterium Pentosen über den SBPP verstoffwechselt. Die im Anschluss durchgeführten BLAST-Analysen wiesen eine unterschiedliche Verteilung des Stoffwechselwegs innerhalb verschiedener Phyla der intestinalen Darmmikrobiota (Kapitel 3.1.5.1) auf. Einige Arten nutzen zur Umwandlung von Pentosen den SBPP, wiederum andere Organismen verwenden den regulären PPP wie z.B. das zu *P. copri* nahverwandte Darmbakterium *P. vulgatus*. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen (Kapitel 3.1.5.1), wurde festgestellt, dass *P. vulgatus* eine reguläre Transaldolase aufweist und somit den klassischen PPP verwendet (Tab. 14). In den zur Verfügung stehenden Datenbanken, werden allerdings widersprüchliche Annotationen bezogen auf das Schlüsselenzym des Pentosen-Stoffwechsels, die Transaldolase, angegeben. Die UniProt-Datenbank (<https://www.uniprot.org/>) annotiert die entsprechende Transaldolase-Sequenz als „wahrscheinliche Transaldolase“ (A6L5J5) und die NCBI-Datenbank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) als F6P-Aldolase (WP\_005842067). Die durchgeführte bioinformatische Zuordnung der Pentosen-Stoffwechselwege der humanen Darmbakterien sollte deshalb anhand von *P. vulgatus* exemplarisch für einen Organismus ohne SBPP, durch eine biochemische Charakterisierung der Transaldolase (BVU\_3333) untermauert werden. Dazu wurde das Protein in *E. coli* heterolog produziert und entsprechend aufgereinigt (siehe dazu Abschnitt 3.1.4). Die Transaldolase aus *P. vulgatus* wurde mittels SDS/PAGE und Western-Blotting analysiert (Abb. 27). Es konnte festgehalten werden, dass die über die Aminosäuresequenz berechneten Masse von 23,5 kDa und die aus der Bande im SDS-Gel abgeleitete Molekülmasse ungefähr übereinstimmte. Da weder auf dem silberfärbten SDS-Gel noch auf der Western-Blot-Membran Proteinverunreinigungen festgestellt werden konnten, wurde bestätigt, dass das Protein ohne sichtbare Kontaminationen aufgereinigt wurde. Daher konnte bei der anschließenden funktionalen Charakterisierung der Transaldolase die enzymatische Aktivität eindeutig zugewiesen werden.



**Abbildung 27:** Darstellung der Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Transaldolase BVU\_3333 aus *P. vulgatus*.  
**a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: Transaldolase (BVU\_3333; ~23,5 kDa). Spur 2: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific).  
**b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von Abb. 27 a. (Abbildung modifiziert nach Garschagen et al., 2021).

Über einen gekoppelte enzymatische Test wurde die Aktivität von BVU\_3333 auf Transaldolase- und F6P-Aldolase-Aktivität photometrisch untersucht (Abb. 28).

Die Analyse der F6P-Aldolase-Aktivität erfolgte über zwei verschiedene Nachweismethoden. Bei der ersten Messung wurde die Spaltung von F6P in DHA und GAP putativ katalysiert durch BVU\_3333 mithilfe der GAP-Dehydrogenase analysiert. Das Hilfsenzym würde GAP zu Phosphoglycerat umwandeln, wobei  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert würde und diese Reaktion könnte photometrisch bei 340 nm beobachtet werden. Die zweite Untersuchung der möglichen F6P-Aldolase-Reaktion erfolgte über die Messung der Bildung von F6P aus DHA und GAP mithilfe einer G6P-Isomerase und einer G6P-Dehydrogenase. Das Reaktionsprodukt F6P würde durch das erste Hilfsenzym zu G6P isomerisiert und daraufhin würde G6P durch die G6P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert. Bei der letzteren Reaktion würde  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert, welches durch eine Absorptionzunahme bei 340 nm nachweisbar wäre. Interessanterweise wurde weder eine Spaltung noch eine Bildung von F6P katalysiert durch BVU\_3333 beobachtet (Abb. 28). Da BVU\_3333 keine F6P-Aldolase-Aktivität aufwies, wurde das Enzym auf die Funktion einer Transaldolase untersucht.



**Abbildung 28:** Photometrische Untersuchungen zur Funktion von BVU\_3333 als Transaldolase oder F6P-Aldolase. Die Transaldolase Aktivität (●) wurde über die  $\text{NADP}^+$ -Reduktion bei 340 nm mithilfe der Hilfsenzyme G6P-Isomerase und G6P-Dehydrogenase bestimmt. Die potentielle F6P-Aldolase-Aktivität wurde über die Bildung von F6P ( $\Delta$ ) mithilfe der G6P-Isomerase und G6P-Dehydrogenase und über die Spaltung von F6P ( $\diamond$ ) mithilfe der GAP-Dehydrogenase bei 340 nm untersucht. Die Aktivität definiert sich über das umgesetzte Substrat der jeweiligen Reaktion [ $\mu\text{mol}$ ] pro min im Verhältnis zur Proteinmenge [ $\mu\text{g}$ ]. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt, wobei jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung angegeben ist.

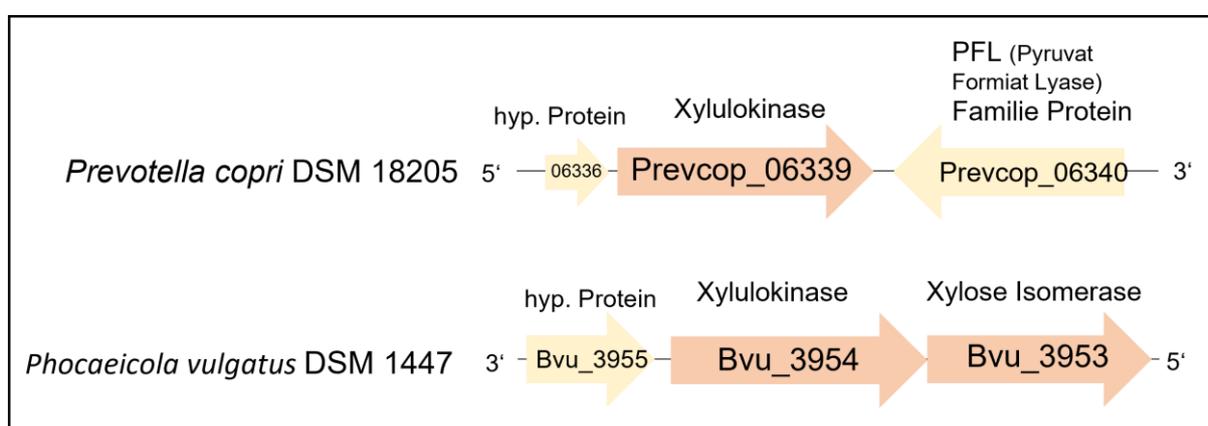
Die Transaldolase-Aktivität von BVU\_3333 wurde über die Hilfsenzyme G6P-Isomerase und G6P-Dehydrogenase bestimmt. Dabei konnte die Umformung von GAP und S7P zu E4P und F6P katalysiert durch BVU\_3333 photometrisch verfolgt werden. Die Isomerisierung von F6P zu G6P durch die G6P-Isomerase und die darauffolgende  $\text{NADP}^+$ -abhängige Oxidation von G6P durch die G6P-Dehydrogenase zu 6-Phosphogluconolacton, ermöglichte die Beobachtung der Transaldolase-Aktivität bei 340 nm. Für die Transaldolase (BVU\_3333) wurde eine spezifische Aktivität von  $0,07 \pm 0,04$  U/mg bestimmt (Abb. 28). Diese photometrischen Ergebnisse bestätigten die bioinformatische Zuordnung von BVU\_3333 als Transaldolase der Gruppe 4. Weiterhin ließ sich über die biochemische Aktivitätsbestimmung der Transaldolase bestimmen, dass *P. vulgatus* den regulären PPP zum Pentose-Stoffwechsel verwendet. Die Bestätigung der bioinformatischen Zuordnung des PPPs für *P. vulgatus* durch die biochemische Charakterisierung der Transaldolase BVU\_3333, verifizierte somit die Zuverlässigkeit der bioinformatischen Analysen dieser Arbeit zur Verteilung des SBPPs.

### 3.1.6 Xylose-Isomerisierung in *P. copri*

In Abschnitt 3.1.2 wurde dargelegt, dass im Genom des Organismus *P. copri* das Gen einer typischen Xylose-Isomerase fehlt. Innerhalb der Xylose-Verwertung wird D-Xylose zunächst durch den Xylose-Protonen-Symporter (PREVCOP\_05160) in die Zelle aufgenommen. Darauf folgt für Bakterien klassischerweise die Isomerisierung von D-Xylose zu D-Xylulose katalysiert durch eine Xylose-

Isomerase. Anschließend wird D-Xylulose in der Regel durch eine Xylulokinase (PREVCOP\_06339) phosphoryliert (Kim und Woo, 2018) und im Falle von *P. copri* in den SBPP eingeschleust.

Interessanterweise weisen die meisten intestinalen Bacteroidales-Spezies ein konserviertes Gencluster auf, wobei das Gen der Xylulokinase gefolgt von dem Gen der Xylose-Isomerase auftritt (Dodd et al., 2011). In Abbildung 29 sind dazu beispielhaft die Gen-Abschnitte von *P. copri* und der nah verwandten Spezies *P. vulgatus* aufgeführt. Es wurde ersichtlich, dass *P. copri* kein Isomerase-Gen besitzt, aber *P. vulgatus* wiederum weist ein Gen für eine Xylose-Isomerase (*bvu\_3953*) auf. Auch in anderen *Prevotella*-Spezies kann die Gen-Sequenz einer typischen Xylose-Isomerase nicht identifiziert werden, dazu zählen neben *P. copri*, *P. bryantii*, *P. ruminicola* und *P. oris* (Dodd et al., 2011).



**Abbildung 29:** Genomische Organisation des Xylulokinase- und des Xylose-Isomerase-Gens in *P. copri* und *P. vulgatus*. Der genomische Kontext ist für die Region um das Xylulokinase-Gen in diesen Organismen dargestellt.

Die analysierte Region stromabwärts des Xylulokinase-Gens ergab für *P. copri* keine Übereinstimmung mit bekannten Gensequenzen von Xylose-Isomerasen. Dies deutete auf das Fehlen eines Xylose-Isomerase-Gens in *P. copri* hin. Grundsätzlich war deshalb anzunehmen, dass es zwischen den Vertretern der Bacteroidales grundlegende Unterschiede der Xylose-Isomerisierung bzw. Verwertung geben muss.

Neben der Umformung über die Xylose-Isomerase und Xylulokinase, kann Xylose wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, im Weimberg-Weg durch mehrere Oxidationsreaktionen verstoffwechselt werden (Abb. 3). Dabei wird letztendlich D-Xylose zu  $\alpha$ -Ketoglutarat umgeformt, welches dann in den zentralen Kohlenstoffwechsel eingespeist werden kann (Weimberg, 1961). Alternativ kann eine Aldolase das Intermediat 2-Keto-3-deoxy-D-Xylonat des Weimberg-Wegs zu Pyruvat und Glykolaldehyd spalten, wobei letzteres über Glykolat zu Oxalacetat umgeformt wird (Abb. 3; Dahms, 1974). Wie zuvor bereits ausgeführt, können die entsprechenden Gene für den Weimberg/Dahms-Weg nicht im Genom von *P. copri* gefunden werden.

Eine andere Möglichkeit zur Xylose-Umwandlung, stellt der „Xylose-Oxidoreduktase“-Weg dar. Dieser Stoffwechselweg kommt beispielsweise bei Xylose-verwertenden *Saccharomyces cerevisiae*-Stämmen vor. D-Xylose wird durch eine Xylose-Reduktase zu Xylitol reduziert und dieses wird anschließend durch eine Xylit-Dehydrogenase zu D-Xylulose oxidiert (Abb. 3; Kötter und Ciriacy, 1993). Auch hier ließen sich die entsprechenden Gene im Genom von *P. copri* nicht auffinden, was darauf hindeutete, dass Xylose nicht über den „Xylose Oxidoreduktase“-Weg in D-Xylulose umgewandelt wird.

Folgerichtig stellte sich die Frage, ob *P. copri* einen einzigartigen Weg für die Umwandlung von Xylose zu Xylulose verwendet. Möglicherweise existiert ein anderes Isomerase-Enzym, was sich in *P. copri* zu einem Xylose-Isomerase-Enzym entwickelt hat. Es ist durchaus nicht ungewöhnlich, dass Isomerasen teilweise die Isomerisierung unterschiedlicher Substrate katalysieren können. Beispielsweise isomerisieren Glukose-Isomerase neben Glukose auch Xylose und einige L-Arabinose-Isomerasen zeigen neben der Isomerisierungsaktivität für L-Arabinose hohe Aktivitäten für andere Substrate wie D-Xylose (Lee et al., 2005; Men et al., 2014; Patrick und Lee, 1968; Hung et al., 2014; Kim und Oh, 2005). Es könnte vermutet werden, dass auch in *P. copri* beispielsweise eine L-Arabinose-Isomerase die Funktion der Xylose-Isomerisierung übernehmen kann. Über BLAST-Analysen konnte in *P. copri* eine L-Arabinose-Isomerase (PREVCOP\_04059) identifiziert werden. Die potenzielle Aktivität der L-Arabinose-Isomerase für das Substrat D-Xylose müsste über biochemische Charakterisierungen erfolgen, um tatsächlich eine Aussage zu treffen, ob PREVCOP\_04059 die Funktion einer Xylose-Isomerase in *P. copri* ersetzen kann.

Der erste Schritt der Xylose-Verwertung in *P. copri* konnte zwar in dieser Arbeit nicht bestimmt werden, dennoch wurde aber aufgezeigt, dass basierend auf den genomischen Daten, *P. copri* ein grundlegend unterschiedliches Xylose-Verwertungssystem im Vergleich zu eng verwandten *Bacteroides*-Stämmen aufweisen musste. Da das Gen der Xylulokinase in *P. copri* unter den angewandten Bedingungen stark transkribiert wurde (Kapitel 3.1.3), ist aber dennoch anzunehmen, dass auch in *P. copri* die für Bakterien klassische Isomerisierung von D-Xylose abläuft.

### 3.2 Auf dem Weg zur Homosuccinat-Fermentation – biochemische Analyse des Citratzyklus in *P. vulgatus*

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gehört Succinat zu einer der weltweit meist produzierten Bulk-Chemikalien. Die Umstellung der petrochemischen Succinat-Herstellung auf eine mikrobiologische Produktion mit der Nutzung von nachwachsenden Rohstoffen gewinnt aufgrund der aktuellen Klimadebatte stetig an Bedeutung (Li et al., 2020). Daher ist die Entwicklung von effizienten Produktionsmethoden des sogenannten Bio-Succinats für die Industrie immer noch relevant.

Succinat wird durch die meisten Organismen als Intermediat des Citratzyklus gebildet. Einige anaerobe Mikroorganismen produzieren Succinat als Hauptendprodukt ihres Energiestoffwechsels (Fumarat-Atmung) und sind deshalb für den Einsatz innerhalb der Succinat-Produktion vielversprechend. Allerdings werden neben Succinat auch eine Reihe anderer Endprodukte gebildet, was folglich den Ertrag der Succinat-Produktion minimiert (Agarwal et al., 2005).

Auch für das Darmbakterium *P. vulgatus* konnte nachgewiesen werden, dass der Organismus eine erhebliche Menge Succinat bildet. Der grundsätzliche Stoffwechsel beruht dabei auf dem EMP-Weg, der Fumarat-Atmung mit Bildung von Succinat und der Erzeugung von Lactat, Acetat und Formiat aus Pyruvat. Bei CO<sub>2</sub>-Mangel wird Succinat teilweise weiter zu Propionat umgesetzt (Franke, 2020). Succinat und Acetat werden von *P. vulgatus* zu gleichen Teilen gebildet, wohingegen die Mengen an Lactat, Formiat und Propionat deutlich geringer ausfallen. Für die Industrie wäre natürlich ein Succinat-Produktionsstamm ideal, der aus dem eingesetzten Substrat nur Succinat ohne jegliche Nebenprodukte bilden würde. Ein Stamm mit solch einer Homosuccinat-Fermentation ist derzeit aber nicht bekannt. Das grundlegende Ziel dieser Arbeit war deshalb, eine mögliche Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* zu untersuchen. Damit *P. vulgatus* als einziges Stoffwechselendprodukt Succinat bildet, müssten folgerichtig einige genomische Modifikationen durchgeführt werden, um die Nebenproduktbildung (Acetat, Lactat, Formiat und Propionat) zu unterbinden. Für die Durchführung solcher Modifikationen des Stoffwechsels, mussten zunächst aber grundlegende biochemische Analysen durchgeführt werden. Da Succinat mikrobiologisch in der Regel immer über den Citratzyklus produziert wird, stellt dieser Stoffwechselweg die zentrale Schlüsselrolle der Homosuccinat-Fermentation dar. Anaerobe Organismen mit Fumarat-Atmung wie *P. vulgatus* produzieren Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus, wobei die dafür notwendigen Reduktionsäquivalente [H] aus anderen Teilen des Stoffwechsels stammen und diese Wege folglich weitere Endprodukte erzeugen. Fumarat-Atmer wie *P. vulgatus* haben keinen geschlossenen Citratzyklus, weshalb der zelluläre Bedarf an [H] über glykolytische Prozesse wie dem EMP-Weg, dem oxidativen PPP oder der Oxidation von Pyruvat zu letztendlich Acetat gedeckt wird. Über diese strikte Regulierung des Redoxhaushaltes, ließ sich vermuten, dass die Bildung der Nebenprodukte nicht

unterbunden werden kann. Da aber bei einem nicht-geschlossenen Citratzyklus der oxidative Abschnitt ebenfalls mit der Bildung von Succinat endet und über diesen Abschnitt [H] gebildet werden, entstand die Idee einer Kopplung des oxidativen und reduktiven Citratzyklus. Die gebildeten [H] des oxidativen Citratzyklus werden natürlicherweise für anabole Synthesen und somit für den Aufbau von Biomasse eingesetzt. Bei der Kopplung der beiden Abschnitte des Citratzyklus würden die erzeugten [H] des oxidativen Teil für die reduktive Bildung von Succinat verwendet und der [H]-Bedarf somit nicht über anderen Stoffwechselwege abgedeckt. Dadurch könnte die Nebenprodukt-Bildung unterbunden werden und die Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* ablaufen. In den folgenden Abschnitten wurde der nicht-geschlossene Citratzyklus sowohl bioinformatisch als auch biochemisch untersucht, um das Anwendungspotential der Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* zu analysieren.

### 3.2.1 Bioinformatische Analyse des Citratzyklus von *P. vulgatus*

Zunächst sollte geklärt werden, ob die entsprechenden Gene des Citratzyklus für die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* vorhanden sind. Grundsätzlich existieren drei mögliche Wege zur mikrobiellen Succinat Bildung. Dabei zentrieren sich alle Wege um den Citratzyklus. Succinat wird sowohl im Zuge des oxidativen und reduktiven Citratzyklus als auch durch den Glyoxylat-Zyklus gebildet. Für den Organismus *P. vulgatus* (DSM 1447) wurde das Genom auf die Gene relevanter Enzyme des Citratzyklus untersucht, wobei Sequenzen von gut charakterisierten Enzymen als Referenzen verwendet wurden. Mithilfe von BLAST-Analysen wurden die Genomdaten verglichen und ein Stoffwechselschema zum Citratzyklus in *P. vulgatus* konnte aufgestellt werden (Abb. 30).

Das Stoffwechselschema wird folgend beschrieben: ausgehend von den im Stoffwechsel gebildeten Molekülen Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) und Oxalacetat, wird im oxidativen Teil des Citratzyklus, durch das Enzym Citrat-Synthase (BVU\_1961) die Kondensation von Acetyl-CoA und Oxalacetat zu Citrat unter Abspaltung von CoA katalysiert. Daraufhin wird durch die Aconitase (BVU\_1959) Citrat in zwei Schritten zu Isocitrat isomerisiert. Durch eine Dehydratisierung wird zunächst *cis*-Aconitat und durch eine anschließende Hydratisierung Isocitrat gebildet. Isocitrat wird durch die Isocitrat-Dehydrogenase (BVU\_1960) zu  $\alpha$ -Ketoglutarat in Abhängigkeit von  $\text{NAD}^+$  oxidiert, wobei zudem eine Decarboxylierung stattfindet. Anschließend katalysiert die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978 und BVU\_0979) in Abhängigkeit von CoA die Oxidation von  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA. Dabei läuft außerdem eine Decarboxylierung ab. Die Oxidoreduktase ist aus einer fusionierten CoA-koordinierenden  $\alpha/\gamma$ -Untereinheit (BVU\_0979) und einer Thiaminpyrophosphat- und Eisen-Schwefel-Cluster-haltigen  $\beta$ -Untereinheit (BVU\_0978) aufgebaut (Yun et al., 2001; Baughn et al., 2009). Als Elektronenakzeptor der Reaktion dient oxidiertes Ferredoxin, welches an der Membran re-oxidiert werden kann, dazu im nachfolgenden Abschnitt mehr. Das Gen der klassischen Succinyl-CoA-

Synthetase lässt sich im Genom von *P. vulgatus* nicht identifizieren. Succinyl-CoA wird stattdessen durch eine Succinyl-CoA:Acetat-CoA-Transferase (SCACT; BVU\_1163) zu Succinat umgeformt. CoA wird durch die SCACT auf ein Acetat-Molekül übertragen, wobei das freigesetzte Acetyl-CoA wiederum durch die Citrat-Synthase in den Citratzyklus eingespeist werden kann. Da *P. vulgatus* die Gene eines Succinat-Dehydrogenase-Systems fehlen, konnte, wie für Fumarat-Atmer üblich, bestätigt werden, dass ein nicht-geschlossener Citratzyklus vorliegt. Demnach mündet der oxidative Citratzyklus in der Bildung von Succinat. Der reduktive Abschnitt des Citratzyklus in *P. vulgatus* beginnt mit der Reduktion von Oxalacetat zu L-Malat katalysiert durch die Malat-Dehydrogenase (BVU\_0462). Die notwendigen Elektronen für die Reduktion von Oxalacetat stammen von NADH. L-Malat wird anschließend durch die Fumarase (BVU\_1859) unter Wasserabspaltung in Fumarat umgewandelt. Die membrangebundene Fumarat-Reduktase (BVU\_1239-1241) überträgt schließlich die Elektronen von reduziertem Menachinon auf Fumarat, sodass Succinat gebildet wird. Damit endet neben dem oxidativen Abschnitt des Citratzyklus auch der reduktive Teil mit der Bildung von Succinat.

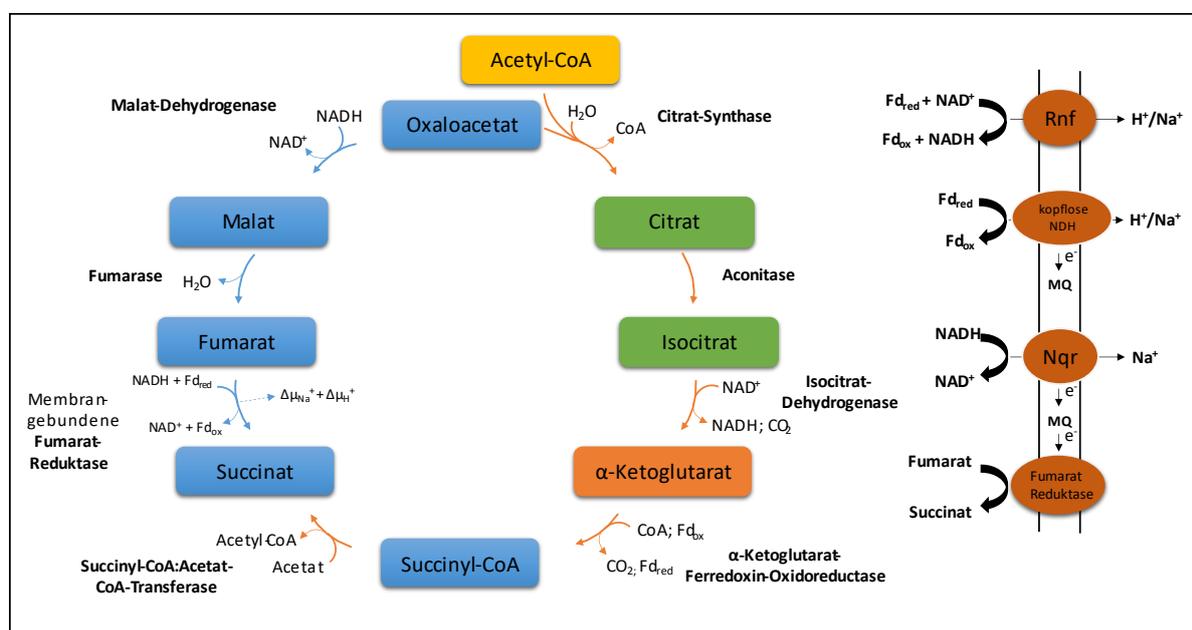
Über die durchgeführten bioinformatischen Analysen konnte bestimmt werden, dass *P. vulgatus* die notwendigen Gene für einen nicht-geschlossenen Citratzyklus aufweist. Die für die Homosuccinat-Fermentation erforderliche Kopplung des oxidativen und reduktiven Citratzyklus wäre auf genomischer Ebene somit möglich. Der [H]-Bedarf der Succinat-Produktion über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus, könnte somit über den oxidativen Teil abgedeckt werden.

Weiter wurde bestimmt, dass die entsprechenden Gene für den Glyoxylat-Weg im Genom von *P. vulgatus* fehlen, weshalb die Bildung von Succinat in *P. vulgatus* nur über den oxidativen und reduktiven Citratzyklus erfolgt. Da aber *P. vulgatus* die Gene für den Methylmalonyl-CoA-Weg (BVU\_0309-0310; BVU\_2492; BVU\_1465/2491/3102; BVU\_1163) aufweist, kann Succinat weiter zu Propionat umgesetzt werden.

Durch die membrangebundene Fumarat-Reduktase, die für die zelluläre Succinat-Produktion verantwortlich ist, wird die Bedeutsamkeit der Atmungskette für die Homosuccinat-Fermentation deutlich. Die Atmungskette kann als Verbindung zwischen dem reduktiven und oxidativen Abschnitt des Citratzyklus in der Homosuccinat-Fermentation gesehen werden. Die reduzierten Reduktionsäquivalente aus dem oxidativen Abschnitt des Citratzyklus würden teilweise über die Malat-Dehydrogenase in Form von NADH aber auch über die Komplexe der Atmungskette re-oxidiert. Im oxidierten Zustand ständen die [H] für den oxidativen Abschnitt des Citratzyklus wieder zur Verfügung. Im Wesentlichen ist die Atmungskette von *P. vulgatus* aus vier für den Citratzyklus relevanten Membrankomplexen aufgebaut (Abb. 30). Die bioinformatische Analyse der Atmungskette aus *P. vulgatus* wurde bereits in der Dissertation von Franke (2020) behandelt, die als Grundlage in dieser Arbeit verwendet wurde. Der erste Komplex ist eine Na<sup>+</sup>- oder Protonen-translozierende

Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Rnf; BVU\_3885-90). Dieser Komplex reduziert NAD<sup>+</sup> mithilfe von reduziertem Ferredoxin und erzeugt dabei einen Na<sup>+</sup>- oder Proteinen-Gradienten ( $\Delta\mu\text{Na}^+$  oder  $\Delta\mu\text{H}^+$ ). Der zweite Komplex ist eine NADH:Chinon-Oxidoreduktase (NDH; BVU\_1750-59), wobei dem Enzym das typische Modul zur NADH-Oxidation fehlt und daher als „kopflös“ benannt wird. Es wird vermutet, dass der Enzymkomplex anstelle von NADH reduziertes Ferredoxin als Elektronendonator verwendet. Darüber können dann Elektronen in die Atmungskette geschleust und ein elektrochemischer H<sup>+</sup>-Gradient aufgebaut werden. Menachinon dient dabei als Elektronenakzeptor. Der dritte Komplex ist die Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon-Reduktase (Nqr; BVU\_3234-3239), die NADH oxidiert und die entsprechenden Elektronen auf Menachinon überträgt. Hier wird ein Na<sup>+</sup>-Gradient erzeugt. Zuletzt wird das reduzierte Menachinon durch den vierten Membrankomplex der Fumarat-Reduktase (BVU\_1239-41) re-oxidiert und die Elektronen auf Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor der Atmungskette übertragen.

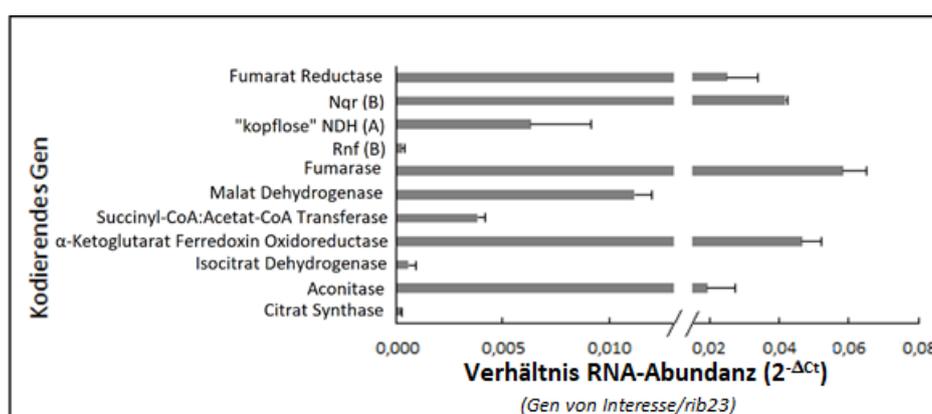
Zusammenfassend konnten alle für die Homosuccinat-Fermentation notwendigen Gene des nicht-geschlossenen Citratzyklus im Genom von *P. vulgatus* identifiziert werden. Der auf bioinformatischen Daten beruhende hypothetische Stoffwechselweg der Homosuccinat-Fermentation sollte nachfolgend experimentell bestätigt werden.



**Abbildung 30:** Schematische Darstellung des nicht-geschlossenen Citratzyklus und der Atmungskette von *P. vulgatus*. Der oxidative Teil des Citratzyklus ist durch orange Pfeile und der reduktive Teil durch blaue Pfeile gekennzeichnet. CoA = Coenzym A; Fd<sub>ox</sub> = oxidiertes Ferredoxin; Fd<sub>red</sub> = reduziertes Ferredoxin; Kopflöse NDH, NADH:Chinon-Oxidoreduktase ohne die Untereinheiten NuoEFG; MQ = Menachinon; Nqr = Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon Reduktase; Rnf = Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase.

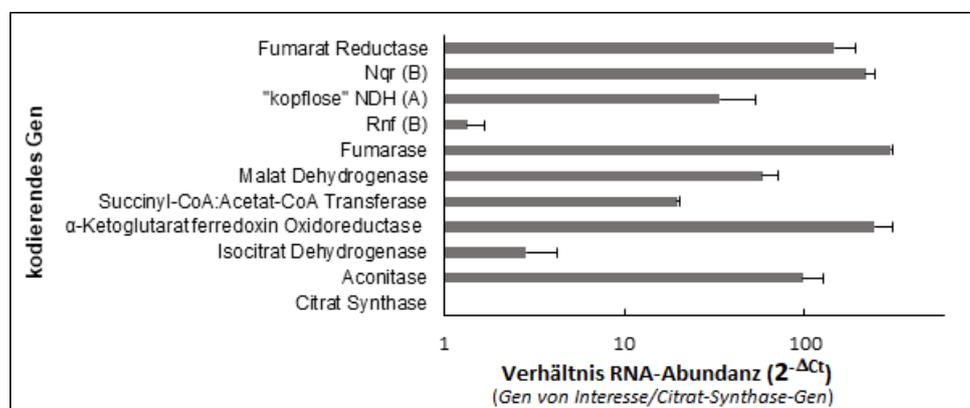
### 3.2.2 Transkriptionsanalysen zum nicht-geschlossenen Citratzyklus in *P. vulgatus*

Nachdem das Modell des Citratzyklus in *P. vulgatus* mit bioinformatischen Methoden aufgestellt wurde, erfolgte eine Transkriptionsanalyse entsprechender Gene. Darüber sollten das bioinformatisch hervorgesagte Stoffwechselschema experimentell bestätigt werden. Hierfür wurde die Gesamt-RNA von in Komplexmedium („Pepton Yeast“), supplementiert mit Glukose, wachsenden *P. vulgatus*-Zellen extrahiert. Die mRNA-Konzentration der Gene der Schlüsselenzyme des Citratzyklus wurde über RT-qPCR unter Verwendung spezifischer Primer bestimmt. Als Referenz wurde die Transkriptmenge des Gens für das ribosomale Protein L23 (BVU\_0803) verwendet. Da das entsprechende Gen (*rib23*) für ein Bestandteil der Ribosomen kodiert, wird *rib21* während der exponentiellen Wachstumsphase konstant exprimiert. Die Methodik der RT-qPCR und der entsprechenden Auswertung ist im Abschnitt 2.4.10 beschrieben. Grundsätzlich wurden die RNA-Abundanz der Gene von Interesse zunächst mit der Transkriptmenge des Referenzgens verglichen ( $\Delta Ct$ ; Abb. 31). Bei diesem Vergleich wurde deutlich, dass die RNA-Konzentration der Gene von Interesse deutlich niedriger war als die Transkriptmenge des Referenzgens. Die Transkriptmengen lagen dabei nur zwischen 0,002 – 5 % der RNA-Konzentration des Referenzgens *bvu\_0803*. Da aber grundsätzlich RNA von den Genen des Citratzyklus und der Atmungskette vorhanden war, konnte dennoch festgehalten werden, dass die Transkription der Gene erfolgte und der postulierte Stoffwechselweg in *P. vulgatus* aktiv war. Für eine bessere Darstellung und Aussage bezüglich der möglichen Relevanz im Stoffwechsel wurden die Transkriptmengen der untersuchten Gene mit der RNA-Konzentration eines anderen Referenzgens zur Normalisierung verglichen (Abb. 32). Die Transkriptmenge der Citrat-Synthase BVU\_1961 wurde als Referenz eingesetzt ( $\Delta Ct$ ).



**Abbildung 31:** Verhältnis der mRNA-Abundanz von Genen, die für Enzyme des Citratzyklus und der Atmungskette in *P. vulgatus* kodieren. Für die Bestimmung der mRNA-Abundanz wurde zunächst die Differenz des jeweiligen Ct-Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Referenzgens (*rib23* = ribosomales Protein L23 *bvu\_0803*) gebildet ( $\Delta Ct$ ). Die mRNA-Abundanz-Unterschiede wurden mit Hilfe der Funktion  $2^{-\Delta Ct}$  berechnet. Kopflöse NDH (A) = NADH:Chinon-Oxidoreduktase Untereinheit NuoA (ohne die Untereinheiten NuoEFG); Nqr (B) =  $\text{Na}^+$ -translozierende NADH:Chinon Reduktase Untereinheit B; Rnf (B) = Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase Untereinheit B.

Im Durchschnitt erreichten alle Gene mindestens die 2-300-fache Transkriptmenge der RNA-Konzentration des Gens der Citrat-Synthase (Abb. 32). Das Gen der Citrat-Synthase wurde unter den untersuchten Bedingungen im Vergleich gering exprimiert. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die Citrat-Synthase das zentrale Ausgangsenzym des oxidativen Citratzyklus darstellt. Das Enzym bestimmt somit die Rate des Kohlenstoffflusses im oxidativen Citratzyklus (Weitzman und Jones, 1968) und wird daher auf zellulärer Ebene stark reguliert, um an die Bedürfnisse der Zelle gekoppelt zu sein. Der oxidative Citratzyklus kann aufgrund der Erzeugung von [H] für die Biomasse-Produktion und Bildung von Vorstufen für anabole Synthesen, dem Anabolismus der Zelle zugeordnet werden. Deshalb könnte die geringe RNA-Konzentration des Citrat-Synthase-Gens im Zusammenhang mit der im Vergleich zum Katabolismus geringeren Stoffwechselrate stehen und die Regulation der Citrat-Synthase auf Gen-Ebene widerspiegeln. Die RNA-Menge des Gens des Rnf-Komplexes war ebenfalls nur sehr gering (Abb. 32). Hier könnte vermutet werden, dass der Membrankomplex keine physiologische Funktion unter den getesteten Umständen besaß und die Aufgaben der allgemeinen Respiration den stark exprimierten Genen der Membrankomplexe NDH und Nqr zugewiesen werden können. Da die RNA und somit auch die Expression der untersuchten Gene des nicht-geschlossenen Citratzyklus nachgewiesen wurden, konnte zusammenfassend festgehalten werden, dass der im Abschnitt 3.2.1 aufgestellte Stoffwechsel des Citratzyklus in Zusammenhang mit der Atmungskette, in *P. vulgatus* vorhanden ist und darüber vermutlich Succinat gebildet wird.



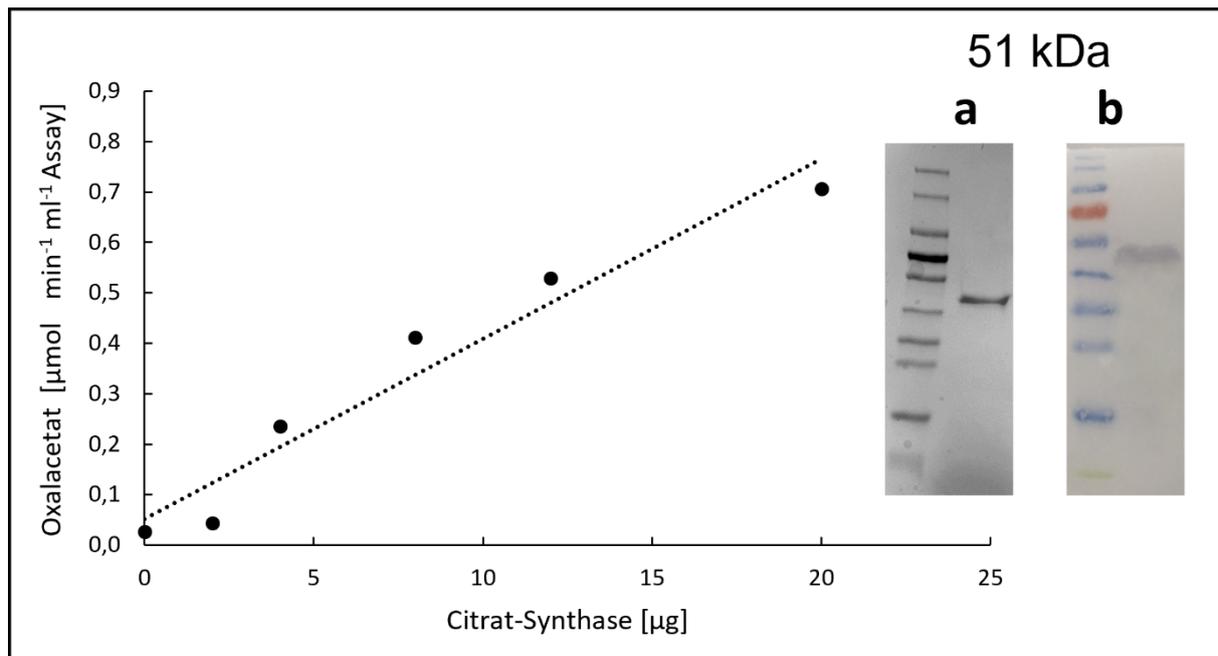
**Abbildung 32:** Vergleich der mRNA-Abundanz der Gene, die für Enzyme des Citratzyklus und der Atmungskette in *P. vulgatus* kodieren, zum Gen der Citrat-Synthase *bvu\_1961*. Für die Bestimmung der mRNA-Abundanz wurde die Differenz des jeweiligen Ct-Werts des Gens von Interesse mit dem Ct-Wert des Citrat-Synthase-Gens (*bvu\_1961*) gebildet ( $\Delta C_t$ ). Die mRNA-Abundanzunterschiede wurde mit Hilfe der Funktion  $2^{-\Delta C_t}$  berechnet. Kopflöse NDH (A) = NADH:Chinon-Oxidoreduktase Untereinheit NuoA (ohne die Untereinheiten NuoEFG); Nqr (B) = Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon Reduktase Untereinheit B; Rnf (B) = Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase Untereinheit B.

### 3.2.3 Biochemischer Nachweis des nicht-geschlossenen Citratzyklus in *P. vulgaris*

Um die funktionale Aktivität des nicht-geschlossenen Citratzyklus auf Proteinebene in *P. vulgaris* zu bestätigen, wurden Aktivitätstests mit aufgereinigten Enzymen durchgeführt. Dafür waren die folgenden Enzyme nötig: Citrat-Synthase, Aconitase, Isocitrat-Dehydrogenase,  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, SCACT, Malat-Dehydrogenase und Fumarase. Für die heterologe Produktion der Proteine wurde dem Protokoll aus Abschnitt 3.1.4 gefolgt. Ebenfalls erfolgte eine Analyse der heterolog produzierten Proteine mittels SDS/PAGE und Western-Blotting (Abb. 33-39). Es konnte festgehalten werden, dass sich die über die Aminosäuresequenzen berechneten Massen mit den über die Protein-Banden im SDS-Gel bestimmten Massen entsprachen. Folgend werden die Molekulargewichte aufgelistet: Citrat-Synthase 51 kDa (Abb. 33), Aconitase 81,4 kDa (Abb. 34), Isocitrat-Dehydrogenase 41,4 kDa (Abb. 35),  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase 66,2 kDa (Untereinheit  $\alpha/\gamma$ ) und 36,5 kDa (Untereinheit  $\beta$ ) (Abb. 36), SCACT 54 kDa (Abb. 37), Malat-Dehydrogenase 36 kDa (Abb. 38) und Fumarase 60,5 kDa (Abb. 39). Für die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde bei der Western Blot-Analyse, aufgrund der angewandten Klonierungsstrategie mit der angefügten DNA-Sequenz eines N-terminalen Strep-Tags, ausschließlich die Untereinheit  $\alpha/\gamma$  (BVU\_0979) nachgewiesen. Insgesamt konnten weder auf dem silbergefärbten SDS-Gel noch auf der Western-Blot-Membran Proteinverunreinigungen festgestellt werden, weshalb die Proteine in reiner Form ohne sichtbaren Kontaminationen aufgereinigt wurden.

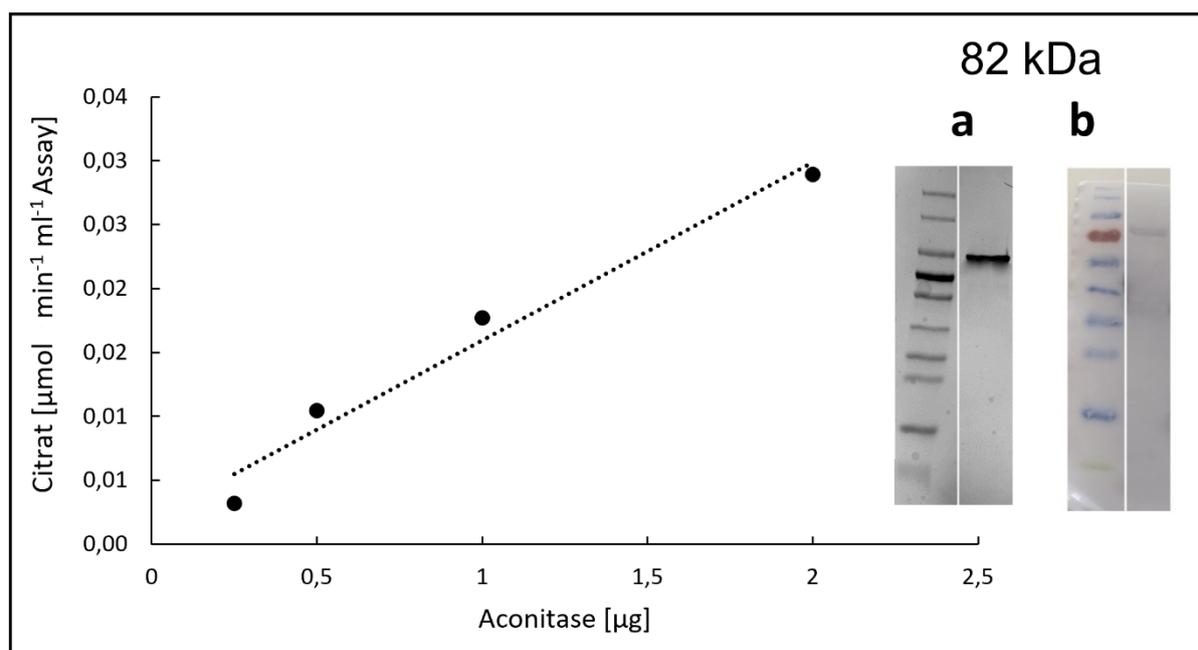
Die Aktivitäten der heterolog produzierten Enzyme des Citratzyklus wurden über unterschiedliche enzymatische Tests nachgewiesen. Zum Teil wurden die Aktivitäten durch gekoppelte Enzymtest analysiert, wobei das Weglassen eines der Enzyme zu keiner nachweisbaren Reaktion führte.

Zunächst wurde die Aktivität des Startenzym des oxidativen Teil des Citratzyklus der Citrat-Synthase, bestimmt (Abb. 33). Die Bestimmung erfolgte basierend auf dem Absorptionsverhalten der Substrate Oxalacetat und Acetyl-CoA und dem Produkt Citrat bei einer Wellenlänge von 295 nm. Acetyl-CoA und Citrat wiesen bei 295 nm kaum eine Absorption auf, wohingegen Oxalacetat bei dieser Wellenlänge im Vergleich stark absorbierte. Der molare Extinktionskoeffizient von Oxalacetat bei 295 nm betrug  $\epsilon = 0.34 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Die durch die Citrat-Synthase katalysierte Kondensation konnte über die umgesetzten Oxalacetat-Moleküle pro Minute und pro ml Assay bestimmt werden. Je mehr Citrat-Synthase ( $\mu\text{g}$ ) eingesetzt wurde, desto mehr Oxalacetat wurde umgesetzt. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen konnte eine spezifische Aktivität von  $42,4 \pm 14,3 \text{ U/mg}$  bestimmt werden.



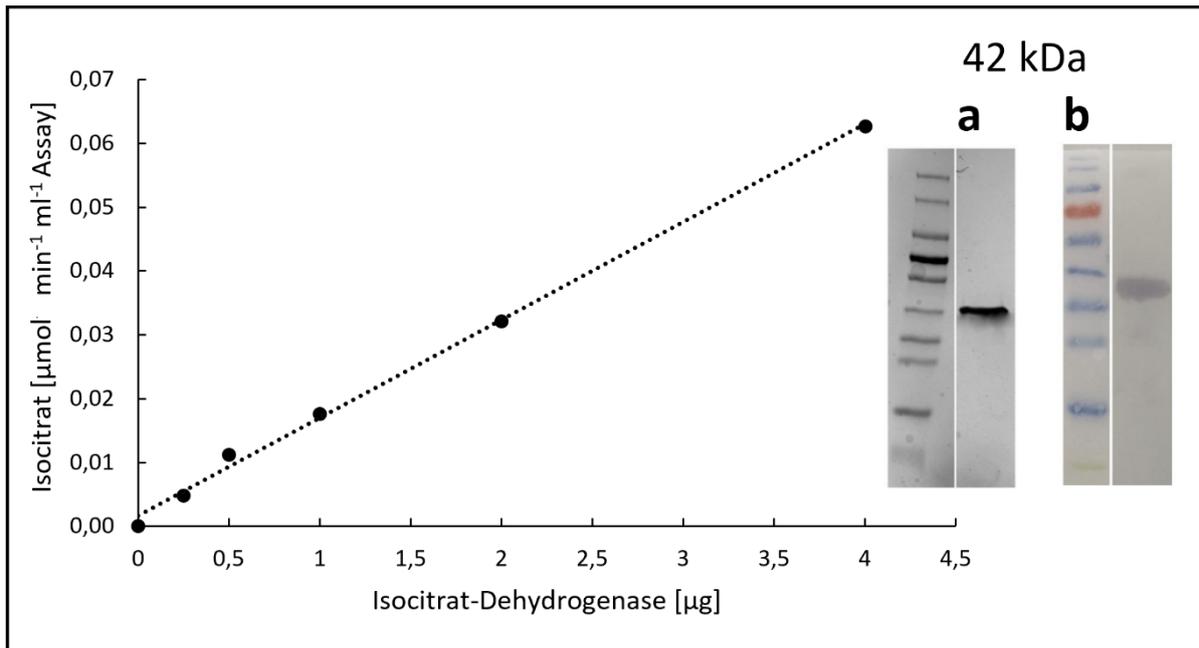
**Abbildung 33:** Photometrische Aktivitätsanalyse der heterolog produzierten Citrat-Synthase BVU\_1961 aus *P. vulgatus*. Untersucht wurde die Umwandlung von Oxalacetat und Acetyl-CoA zu Citrat. Die Aktivität konnte durch die Abnahme der Absorption bei 295 nm basierend auf dem Absorptionsverhalten der Substrate/Produkte nachgewiesen werden und wird durch die Umsetzung von Oxalacetat pro  $\mu\text{g}$  Citrat-Synthase dargestellt. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Citrat-Synthase. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: Citrat-Synthase (BVU\_1961; 51 kDa; 1  $\mu\text{g}$  Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Anschließend erfolgte der Aktivitätsnachweis der Aconitase BVU\_1959 mithilfe des Enzyms Isocitrat-Dehydrogenase BVU\_1960 in einem gekoppelten Enzymtest (Abb. 34). Citrat wurde durch die Aconitase über zwei Teilschritte zu Isocitrat isomerisiert. Mithilfe der Isocitrat-Dehydrogenase wurde Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat oxidiert. Bei der letzteren Reaktion wird  $\text{NAD}^+$  zu NADH reduziert, weshalb die Aktivität der Aconitase bei 340 nm bestimmt werden konnte. Umso mehr Aconitase ( $\mu\text{g}$ ) in den Assay eingesetzt wurde, desto mehr Citrat ( $\mu\text{mol}$ ) wurde pro Minute in Isocitrat umgewandelt. Für die Aconitase wurde eine spezifische Aktivität von  $1,7 \pm 0,4 \text{ U/mg}$  ermittelt.



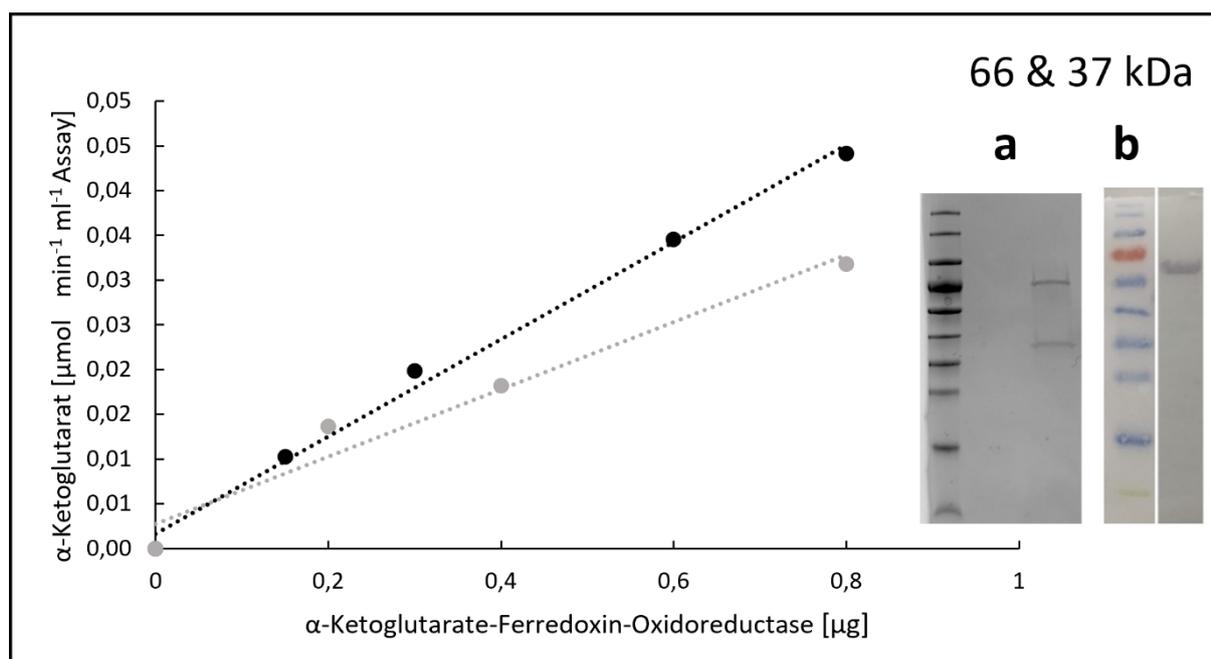
**Abbildung 34:** Aktivitätsanalyse der heterolog produzierten Aconitase BVU\_1959 aus *P. vulgaris*. Untersucht wurde die Umwandlung von Citrat zu Isocitrat in einem gekoppelten Enzymtest mit dem Hilfsenzym Isocitrat-Dehydrogenase BVU\_1960. Ausgehend von Citrat konnte die Aktivität durch die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bei 340 nm photometrisch nachgewiesen werden und wird durch die Umsetzung von Citrat pro  $\mu\text{g}$  Aconitase dargestellt. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Aconitase. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: Aconitase (BVU\_1959; 82 kDa; 2  $\mu\text{g}$  Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Daraufhin konnte die Oxidationsaktivität der Isocitrat-Dehydrogenase BVU\_1960 für Isocitrat bestimmt werden (Abb. 35). Wie zuvor beschrieben, wurden die aus der Oxidation von Isocitrat stammenden Elektronen auf  $\text{NAD}^+$  übertragen, wobei die  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bei 340 nm beobachtet werden konnte. Auch hier lag ein linearer Zusammenhang zwischen der eingesetzten Proteinmenge der Isocitrat-Dehydrogenase und dem umgesetzten Substrat Isocitrat ( $\mu\text{mol ml}^{-1} \text{Assay}^{-1}$ ) pro Minute vor. Bei diesen Messungen konnte eine spezifische Aktivität der Isocitrat-Dehydrogenase von  $14,4 \pm 2,8 \text{ U/mg}$  bestimmt werden.



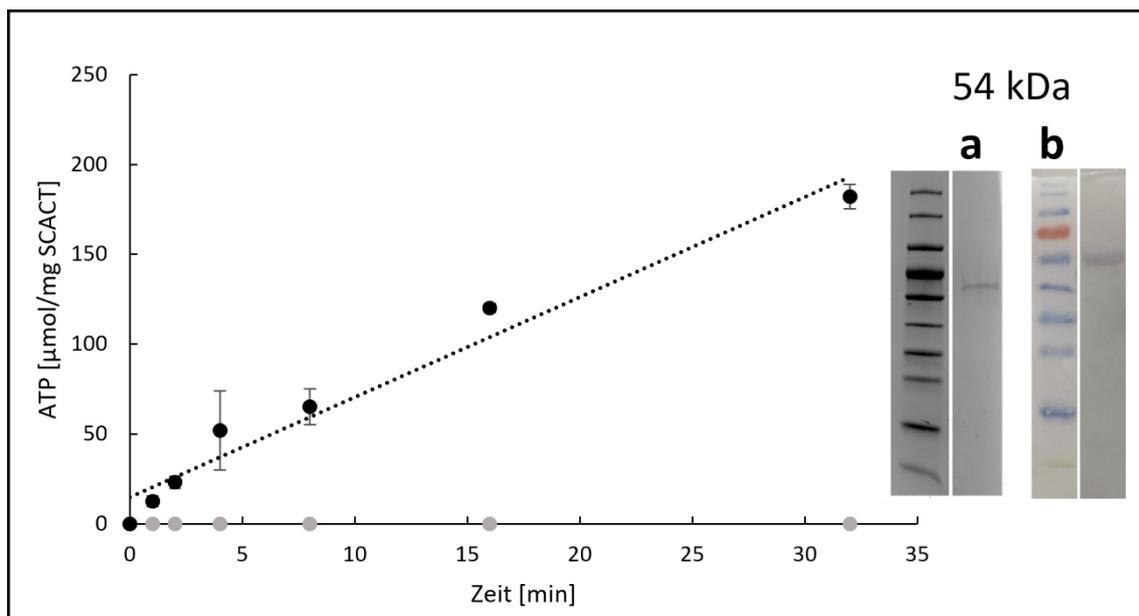
**Abbildung 35:** Photometrische Bestimmung der Aktivität der heterolog produzierten Isocitrat-Dehydrogenase BVU\_1960 aus *P. vulgatus*. Untersucht wurde die Umwandlung von Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat basierend auf der  $\text{NAD}^+$ -Reduktion bei 340 nm. Die Umsetzung von Isocitrat wird pro  $\mu\text{g}$  Isocitrat-Dehydrogenase dargestellt. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Isocitrat-Dehydrogenase. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: Isocitrat-Dehydrogenase (BVU\_1960; 42 kDa; 2  $\mu\text{g}$  Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Aktivität des nächsten Enzyms im oxidativen Citratzyklus der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase BVU\_0978-0979 (Abb. 36). Die Aktivität konnte sowohl mit dem natürlichen (Ferredoxin) als auch mit einem alternativen (Methylviologen) Elektronencarrier nachgewiesen werden. Die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase oxidierte  $\alpha$ -Ketoglutarat zu Succinyl-CoA, wobei die Elektronen entweder auf oxidiertes Ferredoxin (Abb. 36, grau) oder oxidiertes Methylviologen (Abb. 36, schwarz) übertragen wurden. Photometrisch konnte die Oxidation von  $\alpha$ -Ketoglutarat aufgrund des Absorptionsverhalten der Elektronencarrier bei 390 nm für Ferredoxin und bei 604 nm für Methylviologen verfolgt werden. Zwischen eingesetzter Proteinmenge und Produktbildung konnte eine lineare Abhängigkeit bestimmt werden. Auch hier galt je mehr von der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase eingesetzt wurde, desto mehr Substratmoleküle wurden umgesetzt. Beim Einsatz von oxidiertem Ferredoxin als Elektronenakzeptor konnte eine spezifische Aktivität von  $48 \pm 12,2$  U/mg bestimmt werden und bei Verwendung von oxidiertem Methylviologen wurde eine spezifische Aktivität von  $63,8 \pm 7$  U/mg ermittelt.



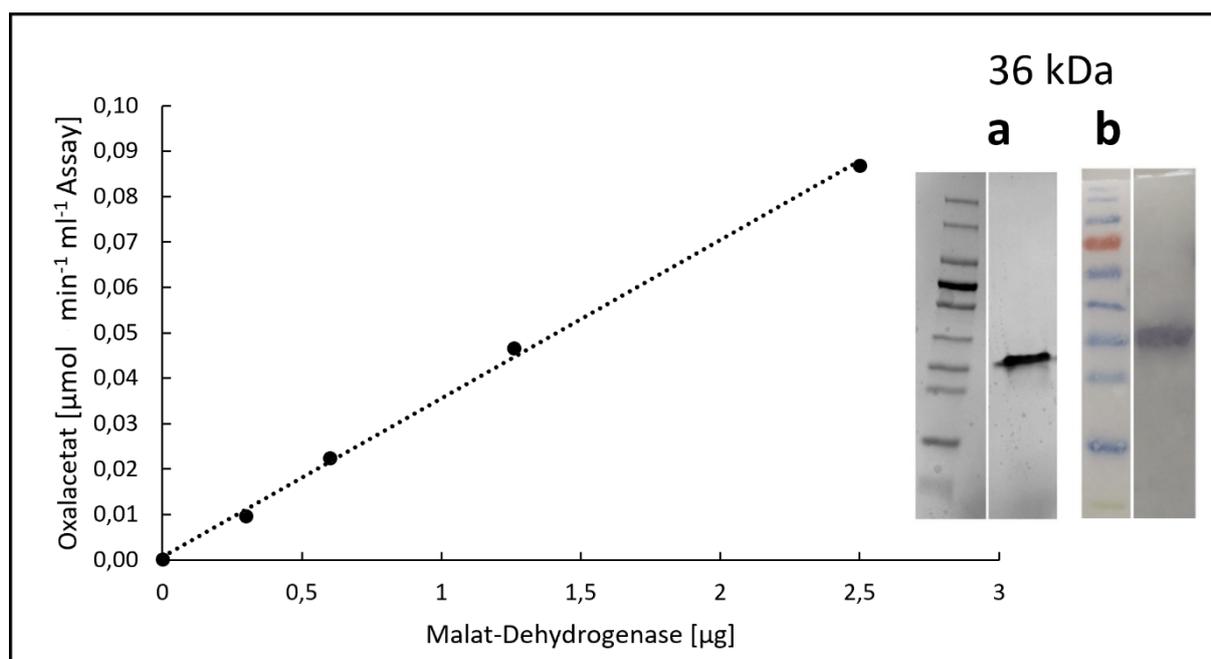
**Abbildung 36:** Aktivitätsanalyse der heterolog produzierten  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase BVU\_0978-0979 aus *P. vulgatus* für die Umwandlung von  $\alpha$ -Ketoglutarat und CoA zu Succinyl-CoA in Abhängigkeit vom natürlichen Elektronencarrier Ferredoxin (grau markiert) und dem alternativen Elektronencarrier Methylviologen (schwarz markiert). Die Aktivität konnte durch die Reduktion von Methylviologen bei 604 nm oder durch die Reduktion von Ferredoxin bei 390 nm bestimmt werden und wird durch den Verbrauch des Substrats  $\alpha$ -Ketoglutarat im Verhältnis zur Proteinmenge ( $\mu\text{g}$ ) angegeben. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2:  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0979 Untereinheit  $\alpha/\gamma$ , 66,2 kDa; BVU\_0978 Untereinheit  $\beta$ , 36,5 kDa; 1  $\mu\text{g}$  Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Anschließend erfolgte der Aktivitätsnachweis des letzten Enzyms des oxidativen Citratzyklus der SCACT BVU\_1163 (Abb. 37). Dies wurde mithilfe der Enzyme  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase BVU\_0978-0979 und der Acetyl-CoA-Synthetase aus *Methanosaeta thermophila* über einen diskontinuierlichen Enzymassay durchgeführt.  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde durch das Hilfsenzym  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in Abhängigkeit von Methylviologen zu Succinyl-CoA oxidiert. Succinyl-CoA wurde daraufhin durch die SCACT in Succinat umgeformt. Bei dieser Reaktion wurde CoA von Succinyl-CoA auf ein Acetat-Molekül übertragen, wobei Acetyl-CoA gebildet wurde. Für den Nachweis erfolgte dann die Umformung von Acetyl-CoA, PPi und AMP zu Acetat, CoA und ATP mithilfe des Enzyms Acetyl-CoA-Synthetase. Das gebildete ATP konnte in den entnommenen Proben über einen Luciferin-Luciferase-Assay quantifiziert werden. Erst durch Zugabe der SCACT konnte in dem gekoppelten Enzymtest ATP nachgewiesen werden (Abb. 37), wodurch die Enzymaktivität bestätigt wurde. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen konnte eine spezifische Aktivität für die SCACT von  $5,5 \pm 0,01$  U/mg bestimmt werden.



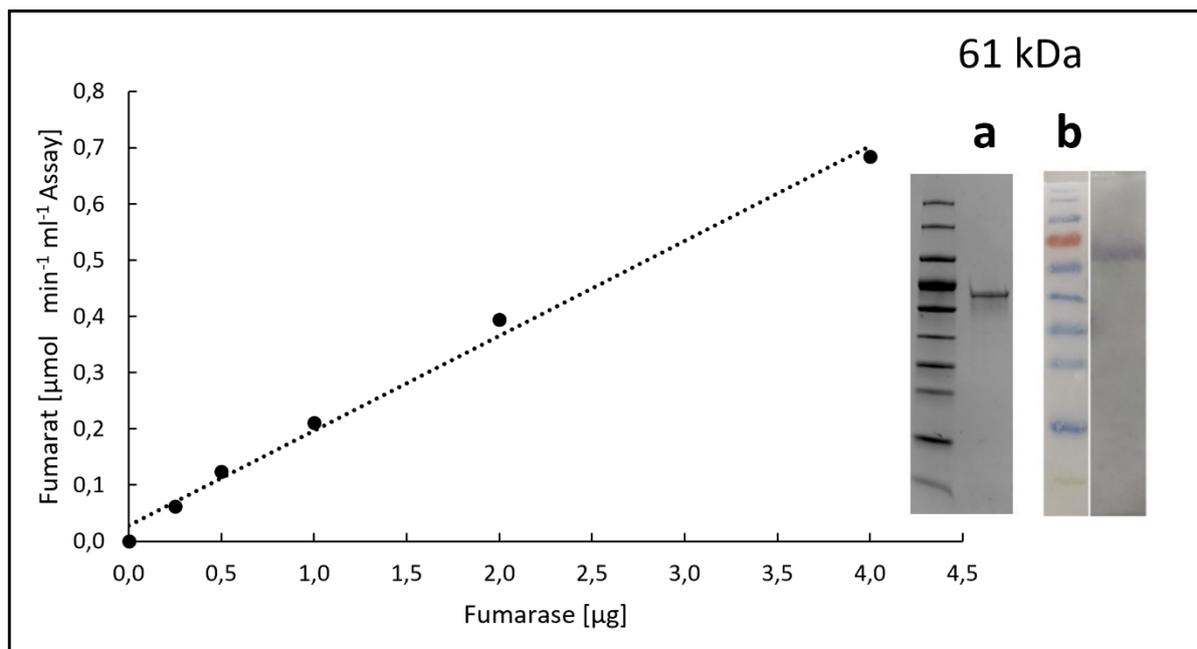
**Abbildung 37:** Analyse der Aktivität der heterolog produzierten SCACT BVU\_1163 aus *P. vulgatus* für die Übertragung von CoA auf Acetat. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte ausgehend von  $\alpha$ -Ketoglutarat in einem diskontinuierlichen Assay durch Messung des freigesetzten ATP unter Verwendung der Hilfsenzyme  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase BVU\_0978-0979 und Acetyl-CoA-Synthetase aus *Methanosaeta thermophila* über einen Luciferin-Luciferase-Assay. Die Aktivität wurde durch die Menge des freigesetzten ATP/mg SCACT im Verhältnis zur Zeit [min] dargestellt. Zusätzlich wird ein Vergleich mit Protein-Zugabe (0,5  $\mu\text{g}$  SCACT; schwarz markiert) und ohne Protein-Zugabe (0  $\mu\text{g}$  SCACT; grau markiert) gezeigt. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der SCACT. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: SCACT (BVU\_1163, 54 kDa; 1  $\mu\text{g}$  Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Die Aktivität der Malat-Dehydrogenase BVU\_0462 aus *P. vulgatus* wurde über die Reduktion von Oxalacetat zu Malat bestimmt (Abb. 38). Die Elektronen wurden von NADH auf Oxalacetat übertragen, wobei die NADH-Oxidation bei 340 nm verfolgt werden konnte. Jedes umgesetzte NADH-Molekül entsprach dabei der Menge an Oxalacetat-Molekülen, die pro Minute pro ml Assay durch die jeweilige Proteinmenge ( $\mu\text{g}$ ) der Malat-Dehydrogenase umgesetzt wurden. Für die Reduktion von Oxalacetat konnte der Malat-Dehydrogenase eine spezifische Aktivität von  $34,8 \pm 3,4$  U/mg zugewiesen werden.



**Abbildung 38:** Photometrische Aktivitätsanalyse der heterolog produzierten Malat-Dehydrogenase BVU\_0462 aus *P. vulgaris* für die Reduktion von Oxalacetat. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte auf Grundlage der NADH-Oxidation bei 340 nm. Die Umwandlung von Oxalacetat wird im Verhältnis zur Menge des verwendeten Proteins dargestellt. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Malat-Dehydrogenase. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: Malat-Dehydrogenase (BVU\_0462, 36 kDa; 2 µg Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Als letztes wurde die Aktivität der heterolog produzierten Fumarase BVU\_1859 aus *P. vulgaris* bestimmt (Abb. 39). Die Messungen erfolgten basierend auf dem Absorptionsverhalten des Substrats Malat und dem Produkt Fumarat bei 290 nm. Malat absorbierte bei 290 nm kaum, wohingegen Fumarat bei dieser Wellenlänge im Vergleich stark absorbierte. Der molare Extinktionskoeffizient von Fumarat bei 290 nm betrug  $\epsilon = 0.38 \text{ cm}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ . Die durch die Fumarase katalysierte Dehydratation von Malat, konnte über die umgesetzten Fumarat-Moleküle [ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$  Assay] bestimmt werden. Dabei lag ein linearer Zusammenhang zwischen eingesetzter Proteinmenge und Produktbildung vor. Es wurde eine spezifische Aktivität für die Fumarase von  $241,5 \pm 32,7 \text{ U}/\text{mg}$  ermittelt.



**Abbildung 39:** Aktivitätsanalyse der heterolog produzierten Fumarase BVU\_1859 aus *P. vulgaris* für die Umwandlung von Malat zu Fumarat. Die Bestimmung der Aktivität konnte über den Anstieg der Absorption bei 290 nm basierend auf dem Absorptionsverhalten des Substrats/Produkts nachgewiesen werden und wird durch die Bildung von Fumarat pro µg Fumarase dargestellt. **Einschub:** Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Fumarase. **a.** SDS/PAGE-Analyse durch Visualisierung über Silberfärbung. Spur 1: PageRuler™ Prestained Protein Ladder (ThermoFisher Scientific); Spur 2: Fumarase (BVU\_1859, 61 kDa; 1 µg Protein). **b.** Western-Blot-Analyse; die Beschriftung entspricht der von a.

Zusammenfassend wurden alle Aktivitäten der heterolog produzierten Enzyme des oxidativen und reduktiven Citratzyklus aus *P. vulgaris* nachgewiesen und bestimmt. Damit konnte der postulierte Stoffwechselweg (Abb. 30) in seinen Einzelreaktionen auf enzymatischer Ebene bestätigt werden. Für das Modell einer Homosuccinat-Fermentation war das Zusammenspiel der Enzymreaktionen des nicht-geschlossenen Citratzyklus von Bedeutung, weshalb die Kombination der Enzyme im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

### 3.2.4 Rekonstruktion des nicht-geschlossenen Citratzyklus für die Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation

Für das künftige Zusammenspiel der Enzyme des oxidativen und reduktiven Citratzyklus bezüglich der Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgaris*, wurden die heterolog produzierten Enzyme des nicht-geschlossenen Citratzyklus (3.2.3) auf ihre kombinierte Aktivitäten untersucht. Die Kombination der Aktivitäten wurde über die Bildung von Succinat aus Citrat und Oxalacetat analysiert. Für die Succinat-Produktion über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus war zusätzlich die Fumarat-Reduktase BVU\_1239-1241 notwendig. Die Fumarat-Reduktase überträgt die Elektronen von reduziertem Menachinon auf Fumarat, sodass über die Reduktion von Fumarat Succinat gebildet wird.

Der Enzymkomplex der Fumarat-Reduktase ist membrangebunden, weshalb für die Rekonstruktion der Kopplung von oxidativem und reduktivem Citratzyklus, die Zugabe von Membranfraktionen unabdingbar war.

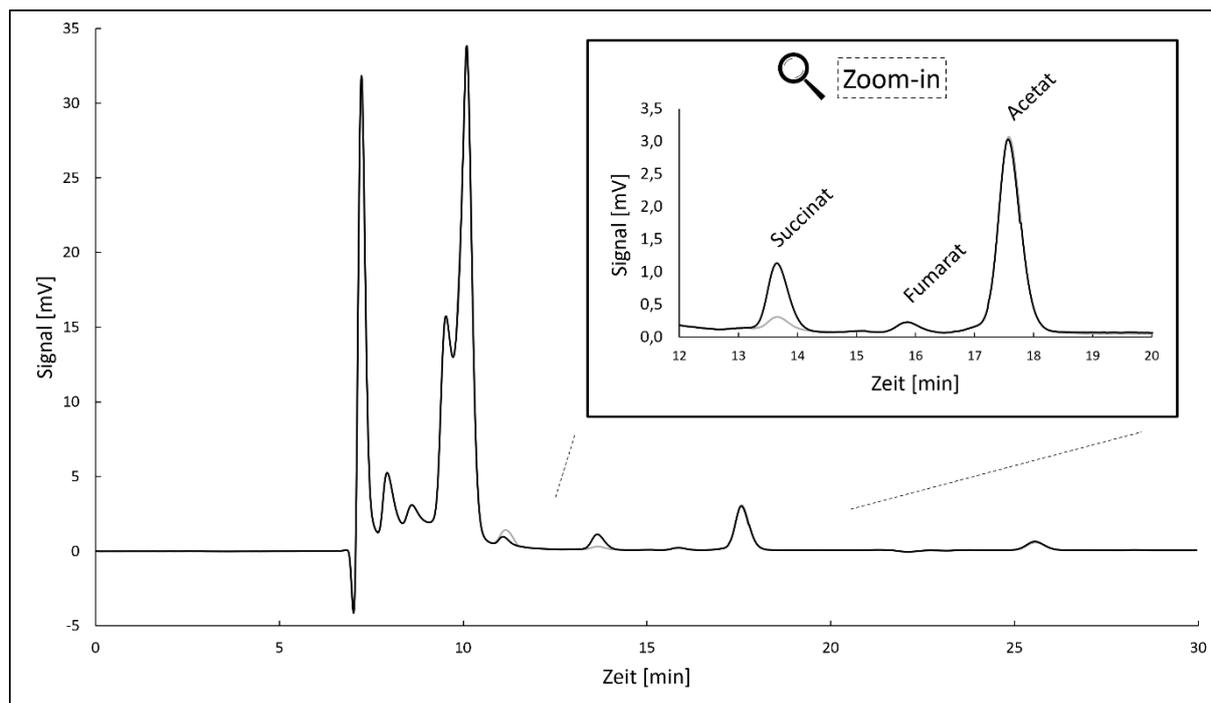
Vereinfacht ausgedrückt wurde der zelluläre Stoffwechselweg des nicht-geschlossenen Citratzyklus zur Homosuccinat-Fermentation, welcher in Abbildung 30 dargestellt wird, nachgebildet und die Funktionalität der gekoppelten Abschnitte über die Bildung von Succinat überprüft. Grundsätzlich beinhaltete der Versuchsansatz die folgenden Enzyme bzw. Membrankomplexe: Citrat-Synthase (BVU\_1961), Aconitase (BVU\_1959), Isocitrat-Dehydrogenase (BVU\_1960),  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978-0979), SCACT (BVU\_1163), Malat-Dehydrogenase (BVU\_0462), Fumarase (BVU\_1859) und Membranfraktion („kopflöse“ NDH-Komplex (BVU\_1750-59), Nqr-Komplex (BVU\_3234-3239) und die Fumarat-Reduktase (BVU\_1239-41)). Die Bildung von Succinat als finales Produkt des gekoppelten, nicht-geschlossenen Citratzyklus, wurde ausgehend von Citrat und Oxalacetat über einen diskontinuierlichen Enzymtest untersucht. Dabei wurden nach verschiedenen Zeitpunkten Proben des Enzymtests entnommen, aufbereitet und über HPLC analysiert. Das gebildete Succinat konnte über einen Standard quantifiziert werden. Als Kontrolle wurde ein Assay ohne Membranfraktionen untersucht.

Die Kopplung des oxidativen und reduktiven Abschnitts des Citratzyklus lief in dem durchgeführten Ansatz wie folgt ab: Zunächst wurde im oxidativen Teil des Citratzyklus Citrat durch die Aconitase zu Isocitrat isomerisiert und Isocitrat wurde dann durch die Isocitrat-Dehydrogenase zu  $\alpha$ -Ketoglutarat oxidiert. Die Elektronen der letzteren Reaktion wurden auf  $\text{NAD}^+$  übertragen. Das gebildete NADH lieferte dann als [H] im reduktiven Abschnitt die notwendigen Elektronen. Durch die Malat-Dehydrogenase oder durch den membrangebundenen Nqr-Komplex wurde NADH wieder re-oxidiert.  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in Abhängigkeit von oxidiertem Ferredoxin und CoA zu Succinyl-CoA oxidiert. Das entstehende reduzierte Ferredoxin konnte dann den [H]-Bedarf des reduktiven Abschnitts des Citratzyklus decken. Durch den „kopflösen“ NDH-Komplex wurde  $\text{Fd}_{\text{red}}$  wieder re-oxidiert und die Elektronen über Menachinon in die Atmungskette eingespeist. Succinyl-CoA wurde anschließend durch die SCACT über die Übertragung von CoA auf Acetat zu Succinat und Acetyl-CoA umgeformt. Acetyl-CoA konnte daraufhin durch die Citrat-Synthase zusammen mit Oxalacetat über die Bildung von Citrat wieder in den oxidativen Citratzyklus eingespeist werden. Oxalacetat wurde im reduktiven Abschnitt durch die Malat-Dehydrogenase zu Malat reduziert. Die nötigen Elektronen stammten dabei von NADH, welches zuvor im oxidativen Teil des Citratzyklus gebildet wurde. Das entstehende  $\text{NAD}^+$  konnte dann wieder in den „Kreislauf“ geleitet und durch die Isocitrat-Dehydrogenase reduziert werden. Malat wurde anschließend unter Wasserabspaltung durch die Fumarase zu Fumarat umgewandelt. Fumarat wurde

als finaler Elektronenakzeptor an der Membran durch die Fumarat-Reduktase zu Succinat reduziert. Dabei flossen die Elektronen von reduziertem Menachinon auf Fumarat.

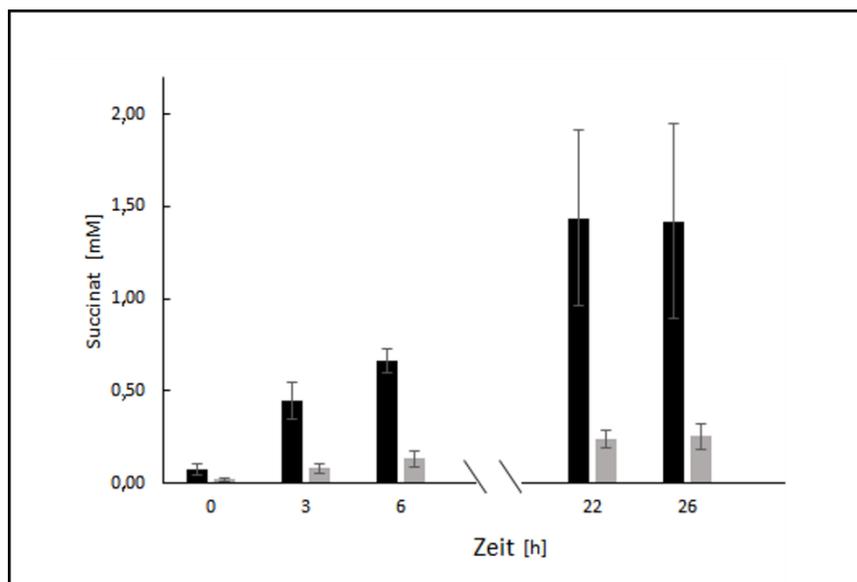
Succinat konnte als finales Produkt der gekoppelten Abschnitte des nicht-geschlossenen Citratzyklus über die Methodik der HPLC nachgewiesen werden. Dadurch wurde bestätigt, dass das aufgestellte Konzept der Homosuccinat-Fermentation mit Kopplung von oxidativem und reduktivem Abschnitt des Citratzyklus, in *P. vulgatus* umgesetzt werden kann. In Abbildung 40 sind beispielhaft zwei Chromatogramme der Probe des durchgeführten Assays nach 22 h mit (schwarze Linie) und ohne Membranfraktion (graue Linie) dargestellt. Dabei wurde zunächst deutlich, dass die Chromatogramme sich nur in wenigen Peaks unterschieden. Im Peak-Bereich zwischen 7 und 12 Minuten handelte es sich um Substanzen des Assays wie zugefügte Substrate, die sich in ihrer Fläche durch Zugabe von Membranen gar nicht oder kaum veränderten. Der Peak mit einer Retentionszeit von 9,5 min entsprachen Citrat, Isocitrat und  $\alpha$ -Ketoglutarat. Das Substrat Oxalacetat eluierte nach 11,1 min, wobei bei Zugabe von Membran die Oxalacetat-Menge leicht abnahm.

Succinat als finales Produkt des nicht-geschlossenen Citratzyklus, eluierte unter den verwendeten Bedingungen nach 13,6 min. Sowohl ohne (grau) als auch mit Membran (schwarz) konnte Succinat nachgewiesen werden. Dies war darauf begründet, dass auch im Ansatz ohne Membran eine geringe Konzentration an  $\text{NAD}^+$  und  $\text{Fd}_{\text{ox}}$  zugefügt war. Somit wurde auch ohne Kopplung der Abschnitte eine geringe Menge an Succinat über den oxidativen Citratzyklus gebildet. Nach 22 h wurde aber deutlich mehr Succinat in dem Assay mit Membranfraktion nachgewiesen. Es konnte außerdem das Intermediat Fumarat nach 16 min und das dem Assay zugefügte Substrat Acetat nach 17,6 min detektiert werden.



**Abbildung 40:** HPLC-Chromatogramme des Enzymassays des nicht-geschlossenen Citratzyklus in *P. vulgatus* im Vergleich mit (schwarze Linie) und ohne (graue Linie) Membranfraktion nach 22 h Inkubation. Die Versuche wurden mit drei verschiedenen Protein- und Membranpräparationen durchgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis ist dargestellt. Der Standardassay mit 1 ml Endvolumen enthielt 40 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7, 100 µg *P. vulgatus*-Membran, 0,25 mM NAD<sup>+</sup>, 0,25 mM NADH, 10 mM Citrat, 10 µM Ferredoxin, 10 mM Oxaloacetat, 10 mM Acetat, 0,5 mM CoA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, je 10 µg Citrat-Synthase, Aconitase, Isocitrat-Dehydrogenase, α-Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, SCACT, Malat-Dehydrogenase und Fumarase. Die Reaktionsmischung wurde bei 37 °C inkubiert. In regelmäßigen Abständen wurden 150 µl Proben entnommen und mittels HPLC analysiert. Zunächst ist das gesamte Chromatogramm von 0-30 min dargestellt. Citrat, Isocitrat und α-Ketoglutarat eluierten nach 9,5 min und Oxaloacetat nach 11,1 min. Die Bildung von Succinat (Peak bei 13,6 min) als Endprodukt der nicht-geschlossenen Citratzyklus wurde bei beiden Assays festgestellt. Die Fläche für Succinat bei dem Assay mit Membran ist aber deutlich größer. Der Unterschied innerhalb der Succinat-Bildung zwischen den Proben mit und ohne Membran wird durch die Vergrößerung (zoom-in) dargestellt.

Wie zuvor beschrieben wurden in regelmäßigen Zeitabständen Proben aus den Assays mittels HPLC analysiert. Dabei war vor allem das Endprodukt (Succinat) bedeutend, um die funktionale Aktivität der Kopplung von oxidativem und reduktivem Citratzyklus in *P. vulgatus* zu beweisen. In Abbildung 41 ist deshalb die quantifizierte Succinat-Konzentration pro Stunde abgebildet. Aus der Abbildung ließ sich erkennen, dass die Succinat-Konzentration im Bereich von 0-6 h stetig zunahm. Nach 22 h wurde ein Endpunkt bestimmt, wobei sowohl mit als auch ohne Membran die Succinat-Bildung zum Erliegen kam. Wenn alle Komponenten dem Ansatz zugefügt waren (Ansatz mit Membran), wurde bedeutend mehr Succinat gebildet (5,5-fache Menge). Dadurch wurde bewiesen, dass es in *P. vulgatus* möglich war den oxidativen und reduktiven Abschnitt Citratzyklus für die Homosuccinat-Fermentation erfolgreich miteinander zu koppeln. In den Proben ohne Membran konnte insgesamt  $0,3 \pm 0,1$  mM Succinat nach 26 h produziert werden. Durch die Zugabe der Membranfraktion wurde  $1,4 \pm 0,5$  mM Succinat nach 26 h gebildet.



**Abbildung 41:** Succinat Konzentrationen des Enzymtests zur Kopplung des oxidativen und reduktiven Citratzyklus in *P. vulgatus* mit heterolog produzierten Enzymen. Dargestellt wird der Vergleich mit und ohne Membranfraktion. Die Experimente wurden mit drei verschiedenen Protein- und Membranpräparationen durchgeführt. Angegeben sind jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung. Schwarze Balken= mit Membran; graue Balken= ohne Membran.

Über die Succinat-Bildung in den durchgeführten Versuchen, wurde erstmals biochemisch bewiesen, dass der oxidative und reduktive Abschnitt des nicht-geschlossenen Citratzyklus koppelbar ist. Da durch die Zugabe von Membran deutlich mehr Succinat gebildet werden konnte, wurde bestätigt, dass die Atmungskette als Verbindungsstelle der [H] zwischen oxidativem und reduktivem Citratzyklus wirkt. Letztlich wurde gezeigt, dass der Elektronentransfer zwischen den gebildeten Reduktionsäquivalenten (in Form von  $Fd_{red}$  und NADH) des oxidativen Abschnitts über die Komplexe der Atmungskette, inbegriffen der Fumarat-Reduktase des reduktiven Abschnitts des Citratzyklus, und dem finalen Elektronenakzeptor (Fumarat) ablaufen konnte. Der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Produktion kann also durch die im oxidativen Teil des Citratzyklus gebildeten [H] gedeckt und die Redoxbilanz ausgeglichen werden. Insgesamt wurde die Umsetzbarkeit des Konzepts der Homosuccinat-Fermentation, durch die nachgewiesene Interaktion der zwei natürlicherweise eingeständigen Abschnitte des Citratzyklus, mit der Bildung von Succinat überprüft und erfolgreich bekräftigt.

### 3.2.5 Zelluläre Aktivitäten des nicht-geschlossenen Citratzyklus in *P. vulgatus*

Zuvor konnte mit aufgereinigten Enzymen nachgewiesen werden, dass durch die Kopplung des oxidativen und reduktiven Teil des Citratzyklus die Redoxbilanz der reduktiven Succinat-Produktion ausgeglichen und Succinat produziert werden konnte. Da also über die kombinierten Aktivitäten der

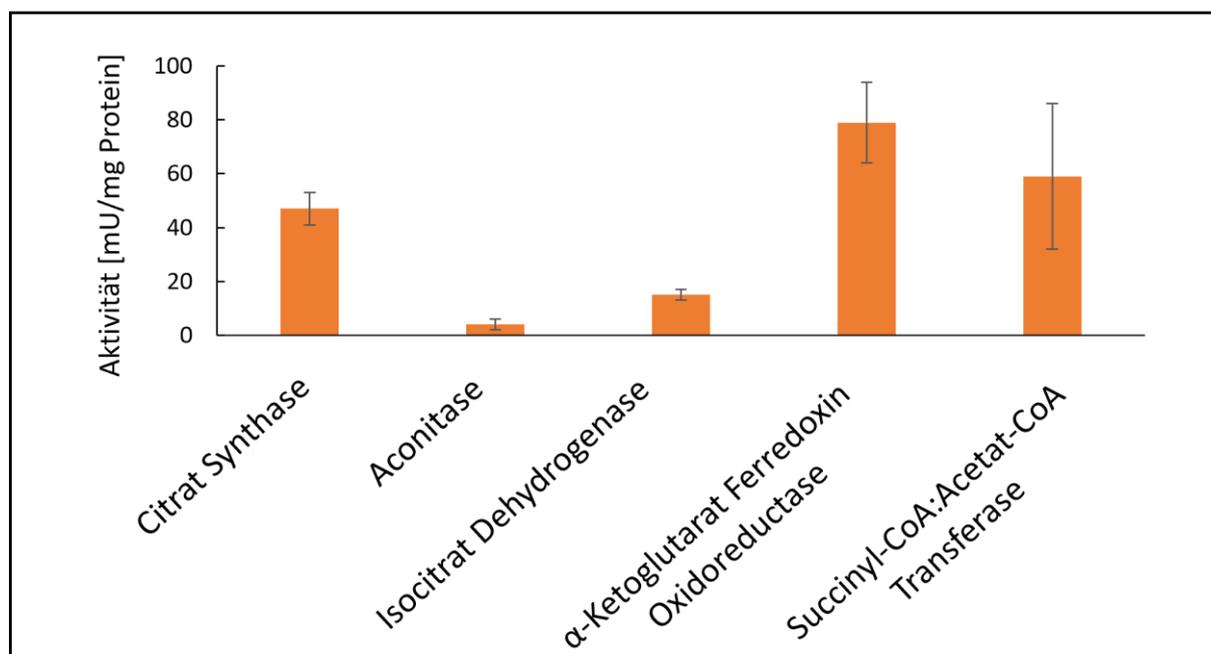
Enzyme des nicht-geschlossenen Citratzyklus, Succinat gebildet wurde, wäre die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* möglich. Für den Einsatz von *P. vulgatus* als Homosuccinat-Produktionsstamm waren aber auch zelluläre Enzym-Messungen notwendig. Über cytoplasmatische Messungen der Enzyme des nicht-geschlossenen Citratzyklus, sollte analysiert werden, ob die Proteine auch in den Zellen aktiv sind und die Verbindung zwischen oxidativem und reduktivem Citratzyklus auch *in vivo* möglich wäre. Darüber könnte ebenfalls herausgefunden werden, ob auf enzymatischer Ebene aufgrund niedriger Enzymaktivität ein potenziell limitierender Einfluss auf die Ausbeute der Succinat-Produktion vorlag.

Die Untersuchungen erfolgten über Enzymaktivitätsmessungen in Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. vulgatus*. Dabei wurden nahezu dieselben Messmethoden wie für die Aktivitätsmessungen der heterolog produzierten Enzyme des Citratzyklus aus Abschnitt 3.2.3 angewendet. Im Folgenden werden Unterschiede oder neue Messmethoden zur Aktivitätsbestimmung erläutert.

Die Aktivität der Aconitase in der cytoplasmatischen Fraktion wurde über einen gekoppelten Enzymtest mit den gereinigten Enzymen Isocitrat-Dehydrogenase (BVU\_1960) und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978-0979) bestimmt (2.5.10.5). Citrat wurde durch die Aconitase zu Isocitrat isomerisiert. Mithilfe der Isocitrat-Dehydrogenase wurde Isocitrat zu  $\alpha$ -Ketoglutarat oxidiert und  $\alpha$ -Ketoglutarat wurde anschließend durch die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase in Abhängigkeit von oxidiertem Methylviologen zu Succinyl-CoA oxidiert. Die Aktivität der Aconitase konnte daher über die bei 604 nm messbare Reduktion von Methylviologen bestimmt werden. Die Messung der cytoplasmatischen Aktivität der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978-0979) erfolgte mit dem alternativen Elektronencarrier Methylviologen und wurde bei 604 nm ermittelt (2.5.10.5). Der Nachweis der SCACT im Cytoplasma von *P. vulgatus* erfolgte über die Quantifizierung des gebildeten Succinat ausgehend von  $\alpha$ -Ketoglutarat mithilfe der gereinigten  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU\_0978-0979) mittels HPLC (2.5.9). Die Aktivität der Fumarat-Reduktase wurde über die Übertragung der Elektronen von reduziertem Methylviologen auf Fumarat in der Membranfraktion bestimmt (2.5.10.5). Diese Reduktion von Fumarat konnte bei 604 nm beobachtet werden. Zusätzlich wurden die Aktivitäten der Komplexe Nqr und Fumarat-Reduktase in Kombination bestimmt (NADH:Fumarat-Oxidoreduktase-System). Dabei wurden die Elektronen von NADH auf Menachinon durch die Nqr übertragen. Die Fumarat-Reduktase re-oxidierte Menachinon erneut, wobei die Elektronen auf Fumarat übertragen wurden. Die NADH-Oxidation wurde bei 340 nm verfolgt und darüber konnte die Aktivität der Komplexe bestimmt werden.

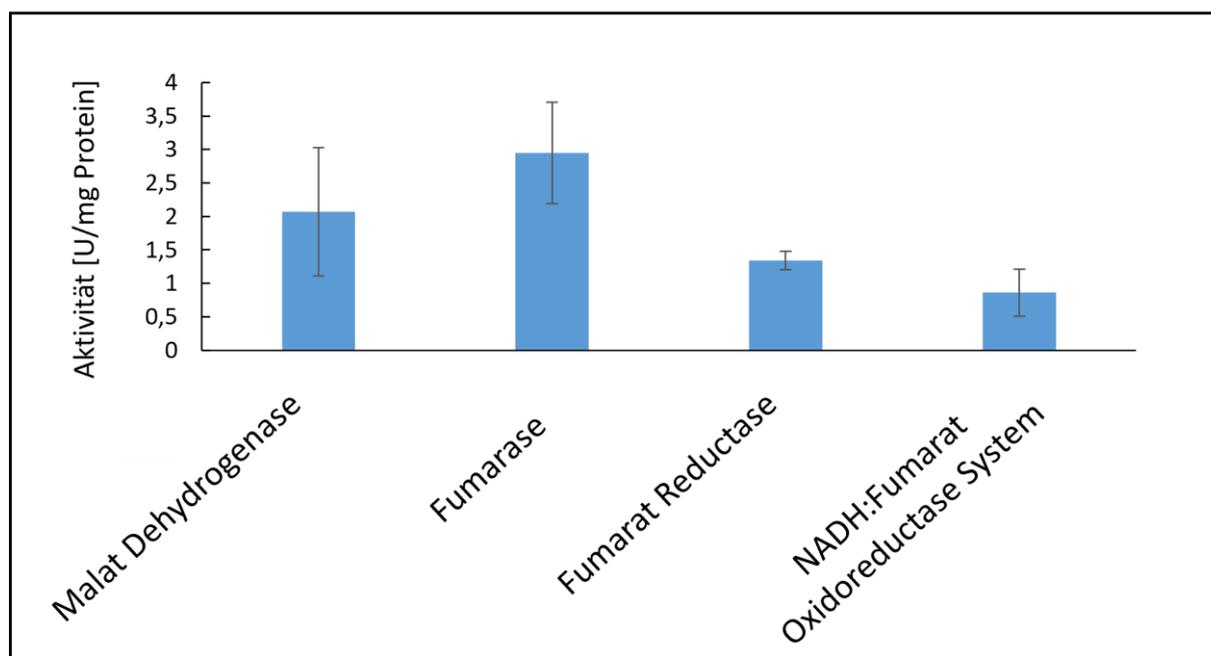
Es konnten für alle Enzyme des oxidativen Abschnitts des Citratzyklus im Cytoplasma Aktivitäten nachgewiesen werden. Dabei bewegten sich die enzymatischen Aktivitäten in Aktivitätsbereichen von

4-59 mU/mg Protein im Cytoplasma (Abb. 42). Die Aconitase mit  $4 \pm 2$  mU/mg und die Isocitrat-Dehydrogenase mit  $15 \pm 2$  mU/mg wiesen die geringsten Aktivitäten auf. Darauf folgten die Citrat-Synthase mit  $47 \pm 6$  mU/mg und die SCACT mit  $59 \pm 27$  mU/mg. Die höchste Aktivität des oxidativen Zweigs wurde für die  $\alpha$ -Ketoglutarat-Ferredoxin-Oxidoreduktase mit  $79 \pm 15$  mU/mg bestimmt.



**Abbildung 42:** Aktivitätsvergleich (mU/mg) der Enzyme des oxidativen Citratzyklus in cytoplasmatischen Fraktionen aus *P. vulgatus*. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt, wobei die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben sind. Die detaillierten Enzymtests sind im Abschnitt Material und Methoden zu finden (2.5.10.4-5).

Im Vergleich dazu waren die Aktivitäten der Enzyme und der Membrankomplexe des reduktiven Teils des Citratzyklus bis zu 700-fach höher und bewegten sich in einem Bereich von 0,9-3 U/mg (Abb. 43). Die geringste Aktivität wies das NADH:Fumarat-Oxidoreduktase-System mit  $0,9 \pm 0,4$  U/mg auf. In einem ähnlichen Bereich bewegte sich die Aktivität der Fumarat-Reduktase mit  $1,4 \pm 0,1$  U/mg. Für die Malat-Dehydrogenase konnte eine Aktivität von  $2,1 \pm 0,9$  U/mg und für die Fumarase von  $3 \pm 0,8$  U/mg im Cytoplasma von *P. vulgatus* bestimmt werden.



**Abbildung 43:** Aktivitätsvergleich (U/mg) der Enzyme des reduktiven Citratzyklus in Cytoplasma-Fractionen aus *P. vulgatus*. Zusätzlich werden die Messungen der Fumarat-Reduktase und des NADH:Fumarat-Oxidoreduktase-System in Membran-Fractionen dargestellt. Die Versuche wurden jeweils dreimal durchgeführt, wobei die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben sind. Die detaillierten Enzymtests sind im Abschnitt Material und Methoden zu finden (2.5.10.4-5).

Aus den Enzym-Messungen im Cytoplasma und an den Membranfraktionen wurde zunächst deutlich, dass sowohl die Proteine des reduktiven als auch des oxidativen Citratzyklus von *P. vulgatus* zellulär vorhanden und aktiv waren. Grundsätzlich könnte somit das Modell der Homosuccinat-Fermentation rein auf Proteinebene in *P. vulgatus* umgesetzt werden. Dennoch fiel auf, dass die Enzymaktivitäten des oxidativen Zweigs des Citratzyklus deutlich niedriger waren als die des reduktiven Abschnitts. Innerhalb der angestrebten Homosuccinat-Fermentation könnte es sein, dass diese niedrigeren Enzymaktivitäten einen limitierenden Einfluss auf die Succinat-Ausbeute haben. Da der oxidative Abschnitt den [H]-Bedarf des reduktiven Teil des Citratzyklus versorgen soll, wäre eine Steigerung der Enzymaktivitäten für die Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation dementsprechend notwendig. Vor allem waren die Aktivitäten der Aconitase und der Isocitrat-Dehydrogenase vergleichend sehr niedrig. Eine Möglichkeit wäre mittels einer Überexpression der Gene des oxidativen Citratzyklus, die zellulären Aktivitäten der entsprechenden Enzyme zu steigern bzw. an das Aktivitätslevel des reduktiven Teil anzupassen, sodass der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Produktion effizient versorgt werden könnte.

Zusammenfassend konnte biochemisch aufgezeigt werden, dass die Durchführung einer Homosuccinat-Fermentation mit dem Citratzyklus als Zentrum der Succinat-Produktion in *P. vulgatus* möglich wäre. Es wurde nachgewiesen, dass der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Bildung

(reduktiver Citratzyklus) über die Kopplung mit dem oxidativen Teil des Citratzyklus gedeckt werden kann. Daher könnten zukünftig andere glykolytischen Prozesse zur Bildung von [H], wie der Oxidation von Pyruvat, deutlich reduziert bzw. unterbunden werden. Die Umlenkung des Kohlenstoffflusses bzw. der [H]-Nutzung würde ebenfalls zur gewünschten Minimierung bzw. Einstellung der Nebenproduktbildung führen. Die Analyse der zellulären Auswirkungen der Durchführung einer Homosuccinat-Fermentation für *P. vulgatus* sind Aufgabe weiterer Untersuchungen, werden aber in der Theorie in der Diskussion (Kapitel 4.5) behandelt.

#### 4. Diskussion

Die menschliche Darmmikrobiota stellt eine hoch komplexe, dynamische und heterogene Gemeinschaft von Mikroorganismen wie Bakterien, Archaeen, Pilzen und Viren dar (Quigley, 2013). Die Mehrheit dieser Lebewesen sind kommensale und mutualistische Mikroorganismen (Lynch & Pedersen, 2016). Im Vergleich zu anderen Körperoberflächen liegt im Darm nicht nur die größte Menge, sondern auch die breiteste Diversität an Mikroorganismen vor (Quigley, 2013). Durch die Art der Geburt, die Ernährung, den Lebensstil, die Einnahme von Medikamenten und die Genetik des Menschen wird die Zusammensetzung der Flora stark beeinflusst (Fan & Pedersen, 2021). Ebenso spielt die Darmmikrobiota bei der Ausbildung der Immunität des Menschen, der Beseitigung von Toxinen, der Verdauung von Nahrung, der Bildung zahlreicher Verbindungen (z.B. Vitamine), der Regulierung der endokrinen Funktion des Darms und der neurologischen Signalgebung eine entscheidende Rolle (Lynch & Pedersen, 2016).

Im besonderen Fokus der humanen Darmforschung steht der Einfluss der Darmflora auf die menschliche Gesundheit. Als größtes Mikro-Ökosystem des menschlichen Körpers steht die Darmmikrobiota in Symbiose mit dem Wirt und hält physiologische Prozesse in einem dynamischen Gleichgewicht. Somit hat eine Dysbiose, also das Ungleichgewicht bis hin zur krankhaften Störung der Darmmikrobiota, nachweislich negative Auswirkungen auf die Gesundheit des Menschen (Chen et al., 2021). Denn trotz deutlicher Unterschiede in der Pathologie häufiger chronischer Krankheiten, sind diese mit einer gemeinsamen und krankheitsspezifischen Veränderung in der Zusammensetzung und Funktion der intestinalen Mikrobiota verbunden (Fan & Pedersen, 2021).

Mit der rasanten Entwicklung der Molekularbiologie, der Genomik, der bioinformatischen Analysen und der Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologie konnte die Erforschung der humanen Darmmikrobiota in den letzten Jahren enorme Erfolge verbuchen (Chen et al., 2021). Dabei wurde vornehmlich herausgefunden, welche Organismen den menschlichen Darm besiedeln. Die Darmflora setzt sich aus über 1000 Spezies zusammen, wobei hauptsächlich Vertreter der Phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria und Proteobacteria vorkommen (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Die Komplexität dieser intestinalen Gemeinschaft lässt sich in eine übersichtliche Kern-Mikrobiota mittels distinkter Enterotypen kategorisieren. Für jeden Enterotyp treten vornehmlich verschiedene Leitorganismen auf, die phylogenetisch zu den Gattungen *Bacteroides*, *Ruminococcus* oder *Prevotella* gehören (Arumugam et al., 2011). Allerdings gibt es auch einige humane Darmfloren die nicht nach dem Schema zugeordnet werden können, weshalb Zweifel an der Stabilität bzw. Starrheit der Enterotypen aufkommt (Cheng und Ning, 2019). Generell gilt zwar die Darmflora als gesund, wenn eine hohe Taxa-Diversität, ein hoher mikrobieller Genreichtum und eine stabile Kern-

Mikrobiota vorliegt, dennoch gibt es keinen Goldstandard für eine humane Darmmikrobiota, die verlässlich zur Gesundheit des Menschen führt (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Eine metabolisch gesunde Mikrobiota kann allerdings durch eine ballaststoffreiche und fett- und eiweißarme Ernährungsweise gefördert werden (Fan & Pederson, 2021). Dieser scheinbar einfache Ansatz ist die Grundlage für die Entwicklung der Präbiotika, also dem Zuführen von Lebensmitteln wie Ballaststoffen, die selektiv von Darmmikroorganismen genutzt werden können und einen gesundheitlichen Nutzen für den Wirt erzielen (Gibson & Roberfroid, 1995; Roberfroid, 2007). Erstaunlicherweise standen die physiologischen Eigenschaften der Darmbewohner bisher allerdings weniger im Fokus der Forschung. Häufig wird lediglich versucht über die Identifizierung vorherrschender Gencluster in den Darmmikroorganismen, eine Korrelation zu potenziellen bioaktiven Metaboliten zu erstellen, die in den humanen Blutkreislauf gelangen können und Einfluss auf die Physiologie des Menschen haben (Fan & Pedersen, 2021). Daraus wird deutlich, dass bei der stetig wachsenden Masse an mikrobiellen Sequenzierungsdaten, wesentlich mehr biochemische Daten erhoben werden müssen, um die durch die Metagenomik generierte Datenflut korrekt auszuwerten.

Wichtige Vertreter der humanen Intestinalflora des Phylums Bacteroidetes sind *P. copri* und *P. vulgatus*, die in dieser Arbeit im Mittelpunkt standen. Beide Spezies sind in der Gemeinschaft des menschlichen Darms weit verbreitet und häufig vertreten (Sears, 2005; Tett et al., 2019). Grundsätzlich wird *P. copri* mit einer pflanzlichen (reich an Ballaststoffen und arm an Fetten und Proteinen) und *P. vulgatus* mit einer „westlichen“ Ernährungsweise (reich an Fetten und Proteinen und arm an Ballaststoffen) verbunden (Wu et al., 2011). Für beide Organismen konnten bereits erste essentielle biochemische Erkenntnisse erzielt werden (Franke, 2020). So wurde der zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus, Wachstumsparameter und physiologische Eigenschaften der beiden Organismen bestimmt. Grundlegende Ergebnisse waren, dass der zentrale Stoffwechsel von *P. copri* und *P. vulgatus* auf dem EMP-Weg, der Fumarat-Atmung mit Bildung von Succinat und der Produktion von Acetat und Formiat aus Pyruvat basiert. In *P. vulgatus* wird zusätzlich Lactat aus Pyruvat und Propionat aus Succinat erzeugt. Die Atmungsketten beider Organismen waren sich ebenfalls mit fünf Membrankomplexen, dem Rnf-Komplex, der Nqr, einer „kopfloren“ NDH-Variante, einer Cytochrom-bd-Chinoloxidase und der Fumarat-Reduktase ähnlich. Wobei allerdings in ersten Untersuchungen dem Rnf-Komplex und der Cytochrom-bd-Chinoloxidase eine untergeordnete Rolle im Energiestoffwechsel zugesprochen werden konnte (diese Arbeit; Franke, 2020).

Wie zuvor angedeutet, zeigt eine ballaststoffreiche Ernährung mit Getreide, Nüssen, Obst und Gemüse einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Menschen, da der Verzehr mit einer geringeren Prävalenz verschiedener Krankheiten wie Fettleibigkeit, Typ-2-Diabetes oder Herz-Kreislauf-

Erkrankungen in Verbindung steht (Dhingra et al., 2012; Kendall et al., 2010). Die in diesen Nahrungsmitteln vorhandenen Ballaststoffe wie beispielweise Hemicellulosen, werden hauptsächlich im Dickdarm durch die Darmmikrobiota zu kurzkettigen Fettsäuren (z.B. Acetat, Propionat und Butyrat) verwertet (Flint et al., 2012). In diesem Zusammenhang sind zwar einige Verwertungsmodelle der Darmmikrobiota hauptsächlich auf Genomebene geklärt, wobei aber eine biochemische Ausarbeitung zum Beispiel der C5-Zuckerwertung wichtiger Vertreter fehlt. C5-Zucker, besonders Xylose, stellen die monomeren Untereinheiten der Hemicellulosen dar (Bastawde, 1992). In dieser Arbeit wurde deshalb anhand von *P. copri* die Verwertung von C5-Zuckern, im speziellen Xylose, biochemisch aufgeklärt, um letztendlich die Wichtigkeit der Bestimmung physiologischer Eigenschaften der Darmmikrobiota zu verdeutlichen.

Nicht nur für das genaue Verständnis des Zusammenspiels zwischen intestinaler Flora und dem Menschen, ist die Aufklärung von physiologischen Eigenschaften der Darmbewohner über biochemische Analysen essentiell, sondern auch für potentiellen Anwendung dieser Organismen innerhalb biotechnologischer Produktionsprozesse. Besonders gut können anaerobe Mikroorganismen für die Produktion von biotechnologisch hergestelltem Succinat eingesetzt werden. Weshalb Bakterien die Fumarat-Atmung betreiben, dafür sehr gut in Frage kommen. Darunter fällt auch *P. vulgatus*, weshalb der zentrale Stoffwechselweg zur Succinat Bildung (Citratzyklus und Fumarat-Atmung) in dieser Arbeit biochemisch untersucht wurde. Für die Optimierung der Succinat-Ausbeute reicht genombasiertes Wissen über die Stoffwechselwege nicht aus, sondern es müssen biochemische Analysen erfolgen, um den potentiellen „Flaschenhals“ innerhalb der Produktionskette identifizieren zu können.

#### **4.1 Die Verwertung von Ballaststoffen durch Darmbakterien**

Ballaststoffe sind pflanzliche Polysaccharide, die hinsichtlich ihrer Nährwerte, aufgrund der Zusammensetzung und den physikalischen Eigenschaften, sehr variabel sind (Van Soest, 1978). Diese Polymere umfassen einen bedeutsamen Anteil der menschlichen Nahrung, können aber nicht durch die humanen Verdauungsenzyme abgebaut werden (Hipsley, 1953; Trowell et al., 1976). Grundsätzlich werden Ballaststoffe in wasserlöslich und wasserunlöslich unterteilt und kommen in Nahrungsmitteln wie Hülsenfrüchten, Getreideprodukten, Gemüse, Obst, Samen und Nüssen vor. Dazu gehören zum Beispiel Cellulose, Pektin oder Hemicellulose. Ballaststoffe fördern vorteilhafte physiologische Wirkungen wie die Abführfähigkeit (Laxation), die Senkung des Cholesterinspiegels im Blut und die Regulierung des Blutzuckerspiegels (Anon, 2000). Der Abbau der Ballaststoffe erfolgt im Dickdarm durch die humane Mikrobiota (Van Soest, 1978). Umso vernetzter und diverser der Ballaststoff ist, desto komplexer muss auch die Enzym-Ausstattung zum Abbau sein. Auch bei einem

linearen Ein-Komponenten Polymer wie Cellulose ist aber dennoch mehr als ein Enzym für die Verwertung nötig. Zu solch einem Enzym-Set zählen unter anderem Xylanasen, Cellulasen und Esterasen (Salysers und Leedle, 1983).

Hemicellulosen sind nach Cellulosen, die zweithäufigsten pflanzlichen Polysaccharide, die etwa 20-40% der lignocellulosehaltigen Biomasse ausmachen (McKendry, 2002). Im Grundgerüst weisen Hemicellulosen hauptsächlich die monomeren Pentosen Xylose und Arabinose auf, die  $\beta$ -(1,4)-verknüpft sind (Bastawde, 1992; Scheller & Ulvskov, 2010). Abhängig vom vorherrschenden Monosaccharid in der Hauptpolymerkette werden die Hemicellulosen in vier Arten unterteilt: Xylane (D-Xylose), Mannane (Mannose),  $\beta$ -(1,3;1,4)-Glucane (Glucose) und Xyloglucane (Glucose und Xylose), wobei Xylane die häufigsten und somit wichtigsten Hemicellulosen darstellen. Die meisten hemicellulolytischen Enzyme gehören zu den Glycosidasen, im Fall für Xylan die sogenannten Xylanasen, die die glykosidische Bindung spalten (Broecker et al., 2018). Xylane bestehen aus  $\beta$ -(1,4)-verknüpfte D-Xylose Einheiten mit Seitenverzweigungen aus  $\alpha$ -Arabinofuranose-,  $\alpha$ -Glucuronsäure-, Acetyl-, Feruloyl- und/oder Cumarsäure-Resten (Bastawde, 1992; Kulkarni et al., 1999; Li et al., 2000). Für die Hydrolyse von Xylan werden, aufgrund der strukturellen Komplexität, eine große Vielfalt an zusammenwirkenden Enzymen benötigt. Endo-1,4- $\beta$ -Xylanasen spalten ungerichtet das Xylan-Rückgrat und  $\beta$ -Xylosidasen trennen die Xylose-Monomere von Xylo-Oligosacchariden ab und spalten außerdem Xylobiose. Die oben genannten Seitengruppen werden durch  $\alpha$ -Arabinofuranosidasen,  $\alpha$ -Glucuronidasen, Acetylxylan-, Ferulasäure- und Cumarsäure-Esterasen entfernt (Collins et al., 2005). Vollständige xylanolytische Enzymsysteme, die alle diese Aktivitäten umfassen, treten weitverbreitet bei Pilzen, Actinomyceten und Bakterien auf. Die ökologischen Nischen dieser Mikroorganismen sind vielfältig, aber umfassen typischerweise Umgebungen an denen Pflanzenmaterial angesammelt wird, so wie der Verdauungstrakt von Menschen und Wiederkäuern (Dodd et al., 2011). Die Gattungen *Bacteroides*, *Prevotella* und *Phocaeicola* gehören zu den am häufigsten isolierten xylanolytischen Organismen aus menschlichen Fäkalproben und Rinderpansen (Chassard et al., 2007; Bryant et al., 1958; Dehority, 1966; Hiseni et al., 2021).

Über den Abbau von Ballaststoffen, im speziellen Xylan, durch Vertreter der Bacteroidetes gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen (Dodd et al., 2011; Chassard et al., 2007; Hespell & Whitehead, 1990; Centanni et al., 2017). Da die Genome der humanen Bacteroidetes-Populationen für eine Vielzahl von xylanolytischen Abbauenzymen kodieren, wird angenommen, dass diese Bakterien besonders empfänglich für den Ernährungsansatz der Präbiotika sind, also durch die Zufuhr von Präbiotika in ihrem Wachstum positiv beeinflusst werden (Kaoutari et al., 2013; Centanni et al., 2017). Auch das wichtige Darmbakterium *P. copri* weist die für den Abbau von Hemicellulosen nötigen

Enzyme auf (Linares-Pasten et al., 2021). Die Spezialisierung auf Xylane und anderen Hemicellulosen ließ sich auch über die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsexperimenten nachweisen (Abb. 2). Das Wachstum von *P. copri* auf Xylan aus Hafer, Arabinoxylan und Xyloglucan war dem Wachstumsverhalten des Organismus auf Xylose und Glucose ähnlich (Abb. 1). Arabinoxylan und Xyloglucan sind Heteroxylane, wobei Arabinoxylan hauptsächlich aus Xylose- und  $\alpha$ -L-Arabinofuranose-Einheiten und Xyloglucan aus  $\beta$ -(1,4)-verknüpfte Glucopyranose-Resten, von denen 60-75% mit Xylose-Seitenketten verbunden sind, aufgebaut sind (Hettrich et al., 2006; Kiszonas et al., 2013; Fry, 1989). Durch das nachgewiesene Wachstum wurde experimentell bestätigt, dass *P. copri* die zum Abbau von Hemicellulosen nötigen Enzyme aufweist. Es wurden außerdem ähnliche Zelldichten mit relativ kurzen Verdopplungszeiten von *P. copri* auf Hemicellulosen (Kapitel 3.1.1;  $td = 2,4 - 3,5$  h und  $OD_{600} = \sim 0,9$ ) wie auf Glucose und Xylose (Kapitel 3.1.1;  $td = 1,8 - 2,6$  und  $OD_{600} = 1,6$ ) erreicht. Demnach kann vermutet werden, dass *P. copri* erfolgreich in Konkurrenz um Ballaststoffe im menschlichen Dickdarm, aufgrund der kurzen Verdopplungszeit, wachsen kann. Diese putative Dominanz wird durch den hohen Spezies-Anteil von *P. copri* von bis zu 80 % in der Flora von einigen Menschen des *Prevotella*-Enterotyp bestärkt (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Durch die Veränderung der Nahrungsquelle wie die Erhöhung an Ballaststoffen, werden bestimmte Bakterien wie *P. copri* angereichert, da diese Mikroorganismen aufgrund ihrer Spezialisierung die stark umkämpften Substrate im Darm effizienter verstoffwechseln als andere Arten (Chung et al., 2016; Chung et al., 2017; Flint et al., 2017; Pereira & Berry, 2017). Hingegen führte die erhöhte Zufuhr an Stärke zu einer vermehrten Häufigkeit von *Ruminococcus bromii*, *Agathobacter rectalis*, *Bifidobacterium adolescentis* und *Parabacteroides distasonis* (Martinez et al., 2010; Walker et al., 2011). Durch die Zufuhr an Inulin wurde im Vergleich das Auftreten von *Bifidobacterium adolescentis* und *Faecalibacterium prausnitzii* verstärkt (Ramirez-Farias et al., 2009).

Zuvor wurde bereits beschrieben, dass die wichtigste Hemicellulose Xylan anteilig gesehen im Wesentlichen aus D-Xylose aufgebaut ist. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Wachstumsversuche von *P. copri* mit Xylose-basierten Hemicellulosen und D-Xylose, wurde nicht nur gezeigt, dass *P. copri* ein Enzym-Set zum Abbau der Polymere besitzt, sondern vor allem auch, dass der Organismus im Allgemeinen Pentosen wie Xylose als Wachstumssubstrat nutzen kann und somit einen Stoffwechselweg zum Pentose-Metabolismus aufweist.

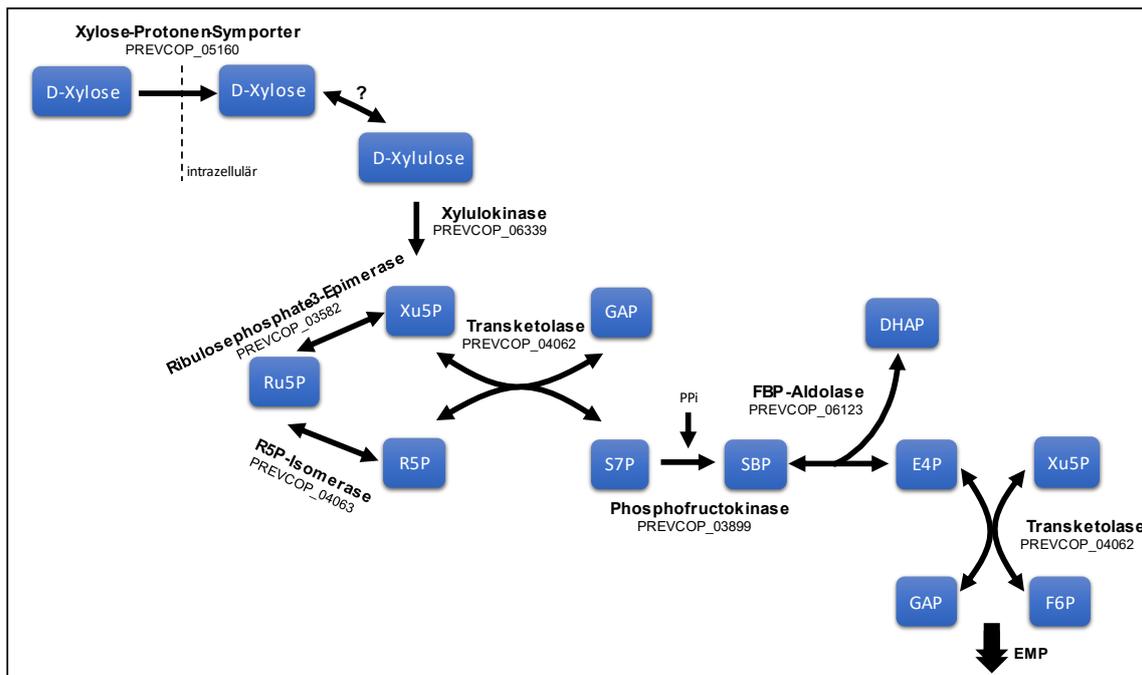
#### **4.2 Der Pentose-Metabolismus in *P. copri***

Bei einer ballaststoffreichen vor allem Xylan-reichen Ernährung ist *P. copri* einer der Hauptvertreter der menschlichen Darmmikrobiota (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Der Organismus ist auf den Abbau von Polysacchariden spezialisiert und setzt sich erfolgreich gegen eine Vielzahl

anderer Bakterien durch. Da Xylan hauptsächlich aus Xylose-Einheiten aufgebaut ist, stellt die Verstoffwechslung von Pentosen durch *P. copri* einen entscheidenden Faktor für die Verwertung von pflanzlichen Ballaststoffen dar. Erstaunlicherweise sind die zugrunde liegenden Stoffwechselwege nicht vollständig geklärt.

Für die Verstoffwechslung von Pentosen durch Bakterien wird in der Regel der PPP verwendet. Der PPP ist ein grundlegender Bestandteil des zellulären Stoffwechsels, der wichtig ist für die Aufrechterhaltung der Kohlenstoffhomöostase, die Versorgung mit Vorstufen der Nukleotid- und Aminosäurebiosynthesen, die Bereitstellung von NAD(P)H für den Anabolismus und die Bekämpfung von oxidativem Stress (Stincone et al., 2015). Aufgeteilt wird der PPP in einen oxidativen und einen nicht-oxidativen Zweig, wobei letzterer praktisch ubiquitär auftritt und eine zentrale Rolle bei der Bereitstellung der RNA-Grundgerüstvorstufe (R5P) und der Vorstufe für aromatische Aminosäuren (E4P) bei Wachstum auf anderen Substraten als Pentosen darstellt (Abb. 4.1). Der oxidative Zweig wandelt irreversibel G6P in  $\text{CO}_2$ , Ru5P und NADPH um, wohingegen der nicht-oxidative Zweig reversibel die glykolytischen Zwischenprodukte F6P und GAP erzeugt. Im Detail wird durch das geschwindigkeitsbestimmende Enzym (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) im oxidativen Zweig, G6P in 6-Phosphogluconolacton, begleitet von einer  $\text{NADP}^+$  Reduktion, umgewandelt. Somit bestimmt die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase den G6P-Fluss, der in den Stoffwechsel geleitet wird (Ge et al., 2020). Anschließend wird 6-Phosphogluconolacton durch die 6-Phosphogluconolactonase in 6-Phosphogluconat hydrolysiert. Durch die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase wird 6-Phosphogluconat zu Ru5P und  $\text{CO}_2$  umgewandelt. Die Elektronen werden dabei auf  $\text{NADP}^+$  übertragen (Abb. 4.1). Interessanterweise tritt der oxidative Zweig des PPP nicht universell auf und fehlt beispielsweise in verschiedenen thermophilen cellolytischen Clostridien (*Hungateiclostridiaceae*), einigen Archaeen wie *Haloarcula marismortui* oder *Methanothermobacter thermautotrophicus* oder in der parasitären Amöbe *Entamoeba histolytica* (Koendjibiharie et al., 2020; Bräsen et al., 2014; Fuchs & Stupperich, 1980; Bragg & Reeves, 1962). Der nicht-oxidative Zweig besteht aus einer Reihe reversibler Transferreaktionen der funktionellen Gruppen (Abb. 4.1). Die R5P-Isomerase und die RuP-3-Epimerase katalysieren reversible Reaktionen zur Umwandlung von Ru5P in R5P und Xu5P. Die Transketolase katalysiert zwei reversible Reaktionen. Die erste stellt die Umwandlung von Xu5P und R5P in GAP und S7P dar und die zweite Reaktion ist die Umlagerung von Xu5P und E4P in GAP und F6P. Daher leitet die Transketolase den Kohlenstofffluss zwischen dem nicht-oxidativen PPP und der Glykolyse bzw. Gluconeogenese in beide Richtungen (Stincone et al., 2015; Ge et al., 2020). Das letzte Enzym des nicht-oxidativen PPP ist die Transaldolase, die die reversible Umwandlung von GAP und S7P zu E4P und F6P katalysiert. GAP und F6P werden über die GAP-Dehydrogenase, die Triosephosphat-Isomerase und die Phosphofruktokinase in den EMP-Stoffwechselweg eingespeist.

In dieser Arbeit wurde aufgezeigt, dass dem Organismus *P. copri* ein vollständiger PPP fehlt. Zum einem sind die Schlüsselenzyme des oxidativen PPP, die G6P-Dehydrogenase und die 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, als auch die Transaldolase des nicht-oxidativen PPP nicht vorhanden (3.1.2). Da dem Organismus der oxidative Zweig des PPP fehlt, geht die wichtige Rolle der Bildung des Reduktionsmittel NADPH für verschiedene Biosynthesen über den PPP verloren. Diesen Verlust kompensiert *P. copri* vermutlich über die katabolen Reaktionen des EMP-Wegs oder des Citratzyklus, bei denen genügend Reduktionsäquivalente gebildet werden könnten. Der Einstieg in den Pentose-Metabolismus bei Wachstum auf anderen Substraten als Pentosen, kann dann über die Moleküle F6P und GAP erfolgen. Wie zuvor beschrieben spielt die Transaldolase eine Schlüsselrolle im nicht-oxidativen PPP. Eine entscheidende Eigenschaft des PPP ist die Reversibilität der Reaktionen, die unentbehrlich für den Abbau von Pentosen und für die Bildung von C5-Metaboliten bei Wachstum auf anderen Substraten für den Anabolismus ist. Die Transaldolase überträgt das C3-Molekül (DHA) von S7P auf das Aldehyd-Akzeptor Molekül GAP, wodurch E4P und F6P gebildet werden (Samland & Sprenger, 2009). Da dem Organismus *P. copri* die Transaldolase fehlt, wurden in dieser Arbeit mögliche Stoffwechselalternativen analysiert. Die Alternativen wie der Phosphoketolase-, der „Oxidoreduktase“- oder der Weimberg/Dahms-Weg werden von *P. copri* nicht durchgeführt (3.1.2). Die Experimente (3.1.4) zeigten, dass der Organismus Pentosen nicht über den regulären PPP, sondern über den neuartigen SBPP verstoffwechselt. Zusammenfassend ließ sich für die ersten Schritte der Pentose-Verwertung in *P. copri* am Beispiel von Xylose beschreiben, dass D-Xylose zunächst über den Protonen-Sympporter (PREVCOP\_05160) in die Zelle aufgenommen und über den für Bakterien klassischen Xylose-Isomerase-Weg umgewandelt wird (Abb. 44). *P. copri* fehlt im Genom zwar das Gen einer klassischen Xylose-Isomerase (3.1.2), da aber keine alternativen Xylose-Umwandlungswege („Xylose-Oxidoreduktase-Weg“, Weimberg/Dahms-Weg) für das Bakterium möglich sind und das darauffolgende Gen innerhalb des Xylose-Isomerase-Wegs der Xylulokinase (PREVCOP\_06339) vorhanden ist und auch exprimiert wurde (3.1.3), konnte vermutet werden, dass der reguläre Xylose-Isomerase-Weg in *P. copri* abläuft. In Abschnitt 3.1.6 wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass in *P. copri* ein anderes Isomerase-Enzym wie beispielsweise die Arabinose-Isomerase (PREVCOP\_04059) für die Isomerisierung von D-Xylose zuständig ist. D-Xylulose wird durch die Xylulokinase (PREVCOP\_06339) zu Xu5P phosphoryliert und Xu5P kann dann in den SBPP geführt werden (Abb. 44).



**Abbildung 44:** Schematische Darstellung des Stoffwechselwegs zur Aufnahme und Umwandlung von D-Xylose bis zur Überführung der Endprodukte des SBPPs GAP und F6P in den EMP-Weg von *P. copri*. Die Umwandlung von D-Xylose zu D-Xylulose konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden und wird durch das Fragezeichen markiert. Ru5P = Ribulose-5-Phosphat, R5P = Ribose-5-Phosphat, Xu5P = Xylulose-5-Phosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-Phosphat, S7P = Sedoheptulose-7-Phosphat; SBP = Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, E4P = Erythrose-4-Phosphat, F6P = Fruktose-6-Phosphat, FBPAldolase = Fruktose-1,6-Bisphosphat, PPI = Pyrophosphat, EMP = Embden-Meyerhof-Parnas.

Im SBPP wird grundsätzlich die reguläre Funktion des nicht-oxidativen Zweigs des PPPs ohne Transaldolase durch die funktionale Kombination aus einer PPI-PFK und einer FBPAldolase aufrecht erhalten. Der SBPP konnte erstmals 1982 durch Susskind et al. für den einzelligen Parasiten *Entamoeba histolytica* nachgewiesen werden. Den ersten Hinweis auf die Existenz des SBPPs in Bakterien, lieferten Koendjibarie et al. (2020). Die Autoren wiesen die Phosphorylierung von S7P durch eine PPI-PFK nach und vermuteten die anschließende Spaltung von SBP durch eine FBPAldolase in E4P und DHAP in zwei cellulolytischen Clostridien (*Pseudoclostridium thermosuccinogenes* und *Hungateiclostridium thermocellum*). Außerdem wurde über BLAST-Untersuchungen gezeigt, dass der SBPP vermutlich unter den cellulolytischen Clostridien weit verbreitet ist, da in 45 untersuchten Arten kein Transaldolase-Gen gefunden wurde (Koendjibarie et al., 2020). In der vorliegenden Arbeit wurde die für den SBPP einzigartige, kombinierte Funktion der PPI-PFK und der FBPAldolase das erste Mal experimentell über biochemische Analysen bewiesen (s. 3.1.4.1-3.1.4.3).

In *P. copri* kann trotz fehlender Transaldolase die Umwandlung der C3-, C5- und C6-Metabolite über einen veränderten PPP mithilfe der Kombination aus der PPI-PFK und der FBPAldolase stattfinden (Abb. 44). Die Einzelaktivität des jeweiligen Enzyms konnte in anderen Organismen aufgezeigt werden und schien daher nicht unbedingt außergewöhnlich. Die Phosphorylierung von S7P durch eine PPI-PFK

wurde beispielsweise in *Methylococcus capsulatus*, *Enterococcus faecalis* und *Methylomicrobium alcaliphilum* nachgewiesen (Reshetnikov et al., 2008; Sokatch, 1962; Rozova et al., 2010b). Die Spaltung von SBP durch eine FBP-Aldolase konnte exemplarisch in Pflanzen im Calvin Zyklus und in den Bakterien *Methylococcus capsulatus* und *Mycobacterium smegmatis* bestätigt werden (Flechner et al., 1999; Moorhead & Plaxton, 1990; Rozova et al., 2010a; Bai et al., 1982). Hingegen erschien die kombinierte Funktion der PPI-PFK und der FBP-Aldolase für das Substrat S7P unkonventionell. Für *P. copri* konnte durch den quantitativen Nachweis der RNA der Gene des SBPPs, nicht nur der SBP-Stoffwechsel zur Pentosen-Umwandlung auf RNA-Ebene funktional nachgewiesen werden (3.1.3), sondern über die enzymatischen Aktivitäten der Proteine des SBPPs wurde der neuartige Stoffwechselweg ebenfalls biochemisch bestätigt. Erstmals konnte über den kombinierten Aktivitätsnachweis der heterolog produzierten Enzyme des SBPPs ausgehend vom Substrat R5P bis hin zum Produkt F6P, der gesamte SBPP *in vitro* nachgewiesen werden (s. 3.1.4.1 und 3.1.4.3). Für die Bestätigung der physiologischen Funktion des SBPPs, war der Nachweis der einzigartigen funktionalen Kombination der PPI-PFK und FBP-Aldolase in Zellen von *P. copri* entscheidend (3.1.4.4). Über die fehlende Transaldolase-Aktivität und vorhandene Aktivität des SBPPs im Cytoplasma des Organismus, wurde in dieser Arbeit auf zellulärer Ebene bewiesen, dass *P. copri* anstelle des PPP auf den SBPP zur Pentose-Umwandlung angewiesen ist.

#### 4.3 Die Rolle von PPI in *P. copri*

Der Organismus *P. copri* besitzt neben der PPI-PFK eine ATP-PFK, wobei aber das entsprechende Gen weder signifikant exprimiert wurde, noch spielte das Protein in den durchgeführten Aktivitätsnachweisen eine erkennbare Rolle, da das Enzym in Bezug zum Substrat S7P keine relevante Aktivität aufwies (3.1.4). Es ist nicht selten, dass sowohl eine PPI-PFK als auch eine ATP-PFK in einem Organismus nebeneinander existieren. Dabei wurde vermutet, dass diese Organismen durch das Vorhandensein beider Enzyme in der Lage sind, die Glykolyse entweder mit ATP oder mit PPI, je nach der relativen zellulären Konzentration der entsprechenden Metabolite, zu betreiben (Baptiste et al., 2003). Beispielsweise wird angenommen, dass solch eine Adaption in Organismen vorkommen könnte, die lediglich über limitierte Nährstoffe verfügen und so den ATP-Verbrauch verringern (Moore et al., 2002).

Im Gegensatz zum Gen der ATP-PFK war das Gen der PPI-PFK in *P. copri* stark exprimiert und das entsprechende Enzym wies hohe Aktivitäten für die Phosphorylierung von S7P auf ( $147,9 \pm 5,5$  U/mg). Die scheinbare Limitierung aufgrund der geringen Affinität der PPI-PFK bezüglich des Substrats S7P ( $4,1 \pm 0,3$  mM), wurde vermutlich durch die relativ hohen  $V_{\max}$ -Werte des Enzyms überwunden. Demnach ist im Gegensatz zur ATP-PFK die PPI-PFK das Schlüsselenzym im SBPP von *P. copri*. Diese Beobachtung

stimmte auch mit den Daten zum SBPP in anderen Organismen überein, wobei auch hier anstelle der ATP-PFK die PPI-PFK den Phosphorylierungsschritt von S7P katalysiert (Susskind et al., 1982; Koendjibiharie et al., 2020). Dennoch blieb die Frage zu klären, welchen Vorteil *P. copri* oder andere Organismen haben, wenn sie den SBPP anstelle des regulären PPP verwenden. Eine essentielle Eigenschaft des nicht-oxidativen PPP stellt die physiologische Reversibilität dar, die folgerichtig beim SBPP ebenfalls vorhanden sein muss. Für FBP-Aldolasen ist in Bezug auf die Moleküle SBP, E4P und DHAP aus dem Calvin Zyklus bekannt, dass ein Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten vorliegt und die katalysierte Reaktion reversibel abläuft (Flechner et al., 1999). Die Änderung der Gibbs-Energie ( $\Delta G$ ) unter Standardbedingungen liegt für die Reaktion der PPI-PFK bei  $-8.7$  kJ/mol (Mertens, 1991). Biochemisch wurde die Reversibilität der durch die PPI-PFK katalysierten Reaktion in einigen Organismen wie *Entamoeba histolytica*, *Thermoproteus tenax* und *Methylococcus capsulatus* nachgewiesen (Reeves et al., 1976; Saavedra et al., 2007; Siebers et al., 1998; Reshetnikov et al., 2008), weshalb unter Berücksichtigung der physiologischen *in vivo* Bedingungen angenommen werden kann, dass die katalysierte Reaktion nahe dem Gleichgewicht verläuft bzw. sich der  $\Delta G$ -Wert 0 annähert (Mertens, 1991; Saavedra et al., 2019). Im Gegensatz dazu beträgt der  $\Delta G$ -Wert unter Standardbedingungen der ATP-PFK  $-18.5$  kJ/mol, was dafür spricht, dass die reverse Reaktion thermodynamisch nicht begünstigt wird und somit die ATP-PFK-Reaktion irreversibel verläuft (Mertens, 1991). Hinzu kommt, dass eine Reversibilität der durch die ATP-PFK katalysierten Reaktion biochemisch bislang nicht nachgewiesen wurde. Um den SBPP als Ersatz zum regulären PPP nutzen zu können, setzt *P. copri* somit auf die PPI-PFK, da je nach Substratverfügbarkeit, beide Richtungen des Stoffwechselweges ermöglicht werden müssen. Ebenfalls war die PPI-PFK im Vergleich zur ATP-PFK zu dem Substrat F6P deutlich affiner und wies auch bedeutend höhere Aktivitäten zur Phosphorylierung von F6P auf (Tab. 13). Demnach nimmt die PPI-PFK auch die entscheidende Rolle innerhalb des EMP-Wegs ein. Aufgrund des Wegfalls der Irreversibilität der durch die ATP-PFK katalysierten Phosphorylierungsreaktion, verliert der Organismus einen Kontrollpunkt innerhalb der Glykolyse. Im Gegensatz steht dazu, dass durch die Verwendung der PPI-PFK im EMP-Weg PPI anstelle von ATP als Phosphoryl-Donor verwendet wird, wodurch ein Molekül ATP für die zweite Phosphorylierung des Zuckers eingespart werden kann (Mertens, 1993). Für Organismen wie das anaerobe Bakterium *P. copri*, die für die ATP-Erzeugung zu einem großen Anteil auf die Phosphorylierung auf Substratebene angewiesen sind (Franke, 2020), könnte die Energieerhaltung Vorrang vor der Kontrolle des Stoffwechselwegs haben (Mertens, 1991). Somit könnte der Kompromiss zwischen Kontrolle und Energiekonservierung der Hauptgrund für die Verwendung einer PPI-PFK im EMP-Stoffwechselweg sein (Saavedra et al., 2019). Für die ATP-PFK könnte, ähnlich zu den oben erwähnten cellulolytischen Clostridien, eine putative Funktion als „Ausfall-Enzym“ zugesprochen werden, welches verhindert, dass die intrazelluläre Konzentration von F6P über einen bestimmten Schwellenwert ansteigt

(Koendjibharie et al., 2020). Es ist durchaus anzunehmen, dass die Akkumulierung von F6P für *P. copri*, der auf den SBPP angewiesen ist, nachteilig sein kann, da die Substrate F6P/FBP und S7P/SBP der PPI-PFK in Konkurrenz zueinander stehen. Es kann deshalb angenommen werden, dass bei zu hoher F6P-Konzentration die ATP-PFK die Phosphorylierung von F6P katalysiert, damit die PPI-PFK die Funktion im SBPP weiter ausüben kann und die für den Stoffwechsel essentielle Pentosen-Umwandlung nicht zum Erliegen kommt. Diese Hypothese stimmt auch mit der geringen Affinität der ATP-PFK für F6P ( $2,2 \pm 0,4$  mM F6P) überein, da das Enzym erst bei höheren Substratkonzentrationen mit maximaler, aber dennoch geringer Aktivität phosphoryliert. Folgerichtig kann auch umgekehrt bei einer Akkumulierung von S7P die ATP-PFK unabhängig vom SBPP weiterhin F6P phosphorylieren. Auch wenn es sich dabei um eine Hypothese handelt, ist dennoch klar, dass wenn ein Enzym in zwei „unabhängigen“ Stoffwechselwegen für die Katalyse verantwortlich ist, die Regulation des Substrat/Produkt-Pools essentiell ist, damit beide Reaktionen parallel ablaufen können.

Wie zuvor beschrieben wird durch den Einsatz der PPI-PFK in der Glykolyse von *P. copri* vermutlich ein ATP für die zweite Phosphorylierung des Zuckers im Vergleich zur regulären ATP-abhängigen Phosphorylierung von F6P eingespart (Mertens, 1993). PPI wird in einer Vielzahl von Reaktionen für die Synthese von Zellpolymeren wie DNA, RNA und Fettsäuren sowie für die Beladung von tRNAs mit Aminosäuren im Zuge der Proteinbiosynthese gebildet (Klemme, 1976). Bei diesen anabolen Synthesen handelt es sich in der Regel um Gleichgewichtsreaktionen. Damit die Reaktionen nicht zum Erliegen kommen, wird PPI daher durch Pyrophosphatasen hydrolysiert, um das Gleichgewicht in Richtung Produktbildung zu verschieben (Kornberg, 1962). Dadurch wird natürlich ein beträchtlicher Anteil der Energie als Wärme freigesetzt. Durch PPI-abhängige Enzyme wie die PPI-PFK wird das normalerweise durch Pyrophosphatasen „verschwenderisch“ hydrolysierte PPI durch die Phosphorylierung eines Zwischenproduktes an zelluläre Prozesse gekoppelt und somit energieeffizienter genutzt (Mertens, 1993). Grundsätzlich muss aber für solch eine PPI-abhängige Reaktion im zentralen Stoffwechsel, eine durch die anabolen Reaktionen gedeckte PPI-Bildungsrate vorliegen, die für den SBPP als auch für den glykolytischen Fluss im EMP-Weg ausreicht. Generell werden die anabolen Raten der PPI-Produktion in Organismen als deutlich zu niedrig eingestuft, um für PPI-abhängige Stoffwechselwege auszureichen (Saavedra et al., 2019). Denn wie Zhou et al. (2013) repräsentativ basierend auf der bakteriellen Biomasse-Zusammensetzung von *E. coli* berechnet haben, deckte die Bildung von PPI als Beiprodukt des Anabolismus maximal nur 20 % der nötigen PPI-Menge für die Aufrechterhaltung der PPI-abhängigen Glykolyse ab. Grundsätzlich wird in *E. coli* ein Biomassertrag von 0,1 g Zellen pro g Glukose erzielt, wobei ungefähr 11 mmol PPI bei der Bildung von 1 g Biomasse generiert werden. Unter der Annahme, dass alle Glukoseflüsse über die PFK-Reaktion erfolgten, werden demnach 55,55 mmol PPI pro g Biomasse benötigt (Zhou et al., 2013). Wenn auch

für *P. copri* angenommen wird, dass alle Glukoseflüsse über die PPI-PFK ablaufen, würden 27,8 mmol PPI pro g Zellmasse benötigt, da pro g Glukose 0,2 g Biomasse erzielt wurden (Franke, 2020). Dazu kommt natürlich noch der PPI-Bedarf des SBPP, der pro drei verstoffwechselten Pentosen im SBPP einem Molekül PPI entspräche ( $3 \text{ Ru5P} \rightarrow 2 \text{ F6P} + \text{GAP}$ ). *P. copri* erzeugt pro g Xylose 0,17 g Zellbiomasse (persönliche Mitteilung Prof. U. Deppenmeier, IfMB, Universität Bonn, 2020), weshalb  $\sim 13$  mmol PPI pro g Biomasse nötig wären. Die prozentuale Elementarzusammensetzung von *P. copri* ist der in der Referenz verwendeten Zusammensetzung von *E. coli* ähnlich (vgl. *P. copri* C<sub>48,48</sub> H<sub>7,22</sub> N<sub>13,25</sub> O<sub>28,10</sub> Rest<sub>2,95</sub> und *E. coli* C<sub>44,33</sub> H<sub>7,44</sub> N<sub>12,14</sub> O<sub>28,4</sub> S<sub>0,48</sub>; Franke & Deppenmeier, 2018; Taymaz-Nikerel et al., 2010), weshalb die Grundlagen der Berechnung des PPI-Umsatzes in *E. coli* auch für *P. copri* angewendet werden können. Basierend darauf werden in *P. copri* ebenfalls ungefähr 11 mmol PPI pro g Biomasse durch die Synthese von Zellbestandteilen gebildet, welches bei Weitem weder für den PPI-Bedarf im SBPP (13 mmol/g TG) noch für die PPI-PFK im EMP-Stoffwechselweg (27,8 mmol/g TG) ausreichen würde. Somit könnten die anabolen Reaktionen in *P. copri* nur etwa 27 % des Bedarfs an PPI liefern, der für die Aufrechterhaltung des SBPPs und der Glykolyse erforderlich ist. Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass Organismen die eine PPI-PFK im EMP-Weg verwenden und die Pentose-Umwandlung über den SBPP nutzen, über alternative Mechanismen zur Erzeugung von PPI verfügen müssen. Dies wird für *P. copri* dadurch untermauert, dass eine Xylose-Verwertung von nicht-wachsenden *P. copri* Zellen möglich war und somit der PPI-abhängige SBPP ablaufen musste, was darauf hindeutete, dass die PPI-Bildung nicht nur von der anabolen Biosynthese von Polymeren abhing (3.1.4.5).

Es existieren neben den zuvor genannten anabolen Reaktionen, eine Reihe von PPI-bildenden zellulären Reaktionen. Beispielweise wird in einigen Bakterien und Eukaryoten wie *Propionibacterium freudenreichii* und *Entamoeba histolytica* über eine PPI-bildende PEP-Carboxykinase PEP zu Oxalacetat umgewandelt. Dabei wird anstelle von ATP PPI erzeugt (Chiba et al., 2015). Diese Reaktion könnte auch in *P. copri* ablaufen und ausreichende Mengen an PPI liefern, da das Enzym PEP-Carboxykinase (PREVCOP\_05409) für die Fumarat-Atmung unerlässlich ist und im Cytoplasma von *P. copri* eine hohe Aktivität aufwies ( $28,1 \pm 6,5$  U/mg Protein; Franke, 2020).

Es ist auch möglich, dass für die PPI-Bildung in *P. copri* zwei Enzyme zusammenarbeiten, indem sie in entgegengesetzte Richtungen verlaufen, also in einem *futile cycle* funktionieren. Dabei würde in diesem speziellen Fall ein gebildetes ATP-Molekül durch ein Enzym verbraucht, wodurch ein Molekül PPI gewonnen würde (Saavedra et al., 2019). Ein putatives Beispiel in *P. copri* wäre die Kombination der Pyruvat-Phosphat-Dikinase (PREVCOP\_04292) und der Pyruvat-Kinase (PREVCOP\_04707). Dabei wird unter ATP-Verbrauch Pyruvat durch die Pyruvat-Phosphat-Dikinase zu PEP, AMP und PPI

umgewandelt. Gegensätzlich wird PEP durch die Pyruvat-Kinase unter ATP-Gewinn in Pyruvat umgeformt (Mertens, 1993). Ein weiteres Beispiel für zwei entgegengesetzte Enzyme zur PPI-Synthese wäre die Kombination einer Acetyl-CoA-Synthetase (PREVCOP\_04832) und der Phosphotransacetylase/Acetatkinase (PREVCOP\_04866 und PREVCOP\_04865). Dabei wird Acetat und CoA unter Verbrauch von ATP durch die Acetyl-CoA Synthetase zu Acetyl-CoA, PPI und AMP umgeformt, wohingegen entgegengesetzt ATP durch die Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat durch die Enzyme Phosphotransacetylase und Acetatkinase gewonnen wird (Saavedra et al., 2019).

Als weitere Möglichkeit könnte die eben beschriebene Acetatkinase (PREVCOP\_04865) ebenfalls PPI-abhängig sein. Eine PPI-bildende Acetatkinase wurde in *Entamoeba histolytica* nachgewiesen (Reeves & Gurthrie, 1975). Die Reaktion ist dabei der durch die ATP-abhängigen Acetatkinase katalysierten Reaktion ähnlich, wobei anstelle von ATP PPI durch die Umformung von Acetylphosphat zu Acetat gebildet wird.

Der Organismus *P. copri* ist grundsätzlich dazu in der Lage Glykogen als Speicherstoff zu bilden und diesen wieder zu hydrolysieren (Franke, 2020). Innerhalb des Glykogenzyklus kann ebenfalls PPI über sogenannte *futile cycle* gebildet werden (Reeves, 1985; Matheron et al., 1998; Desvaux, 2006; Saavedra et al., 2019). Das Ausgangsmolekül für die Glykogen-Synthese ist G6P, wobei für die Polymerisierung der Phosphatrest in Glukosephosphat von Position 6 (G6P) auf Position 1 (G1P) verschoben wird. Diese Isomerisierung wird durch eine Phosphoglucomutase (PREVCOP\_04210) katalysiert. Anschließend wird G1P durch das Anfügen eines Nucleosiddiphosphat (NDP; i.d.R. ADP) aktiviert, wodurch NDP-Glukose (ADP-Glukose) und PPI gebildet wird (Cifuentes, et al., 2019). Diese Reaktion katalysiert eine G1P-Uridylyltransferase (PREVCOP\_03695). In der umgekehrten Reaktion hydrolysiert eine Glykogenphosphorylase (PREVCOP\_06836) Glykogen wieder zu G1P. Somit verläuft der Glykogenzyklus von G1P zu Glykogen und zurück zu G1P, ohne dass dabei eine energiereiche Phosphatbindung verbraucht wird (Reeves, 1985). Da *P. copri* Glykogen synthetisieren und hydrolysieren kann (Franke, 2020), könnte der oben beschriebene Glykogenzyklus durchaus zum PPI-Bedarf beitragen.

Als letzte Möglichkeit zur PPI-Bildung existiert beispielsweise in *Rhodospirillum rubrum* eine reversibel arbeitende membrangebundene H<sup>+</sup>-translozierende-Pyrophosphatase. Die Bildung von PPI wird durch die Nutzung des elektrochemischen Ionengradienten zwischen Innen und Außenseite der Membran katalysiert (Nore et al., 1986). Dementsprechend ist die PPI-Synthese über die membrangebundene Pyrophosphatase an die energiekonservierenden Komplexe der Membran, die durch die Translokation von Na<sup>+</sup>- oder H<sup>+</sup>- Ionen zur Außenseite der Membran einen elektrochemischen Ionengradienten

erzeugen, gekoppelt. Auch für cellulolytische Bakterien wurde diese Art einer membrangebundenen  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{H}^+$ -translozierende-Pyrophosphatase als potentielle PPI-Quelle vermutet (Zhou et al., 2013). Da auch im Genom von *P. copri* solch eine Pyrophosphatase gefunden wurde (FYJ72\_04795, *P. copri* Stamm LKV-178\_WT-2C), könnte vermutet werden, dass PPI durch die  $\text{Na}^+$ - oder  $\text{H}^+$ - translozierende-Pyrophosphatase gebildet wird.

Da die PPI-PFK die Phosphorylierung im SBPP und vermutlich auch im EMP-Weg von *P. copri* katalysiert, muss ausreichend PPI für die Aufrechthaltung der Reaktionen vorhanden sein. Die PPI-Bildung durch anabole Reaktionen genügt allerdings nicht für die Bewahrung des Stoffwechselflusses im SBPP und EMP-Stoffwechselweg, weshalb der Organismus über alternative PPI-erzeugende Reaktionen verfügen muss. Dies könnte beispielsweise durch die folgenden putativ PPI-bildenden Reaktionen gewährleistet werden: die PEP-Carboxykinase, die Acetyl-CoA-Synthetase, die Pyruvat-Phosphat-Dikinase, dem Glykogenzyklus und der membrangebundenen- $\text{Na}^+$ -oder- $\text{H}^+$ -pumpenden-Pyrophosphatase, wobei für alle Enzyme die PPI-Abhängigkeit biochemisch überprüft werden müsste. Da die zentralen Stoffwechselwege von *P. copri*, der SBPP und der EMP-Weg, vermutlich PPI-abhängig sind, wurde die Relevanz von PPI für *P. copri* deutlich und es könnte von einem PPI-abhängigen Stoffwechsel in *P. copri* gesprochen werden. Es muss aber generell bedacht werden, dass bei einem PPI-abhängigen Stoffwechsel, der PPI-Metabolismus fein abgestimmt sein muss (Mertens, 1993). Die Anreicherung von PPI kann zur Verlangsamung oder gar Erliegen von Biosynthesereaktionen führen, wohingegen die PPI-Erschöpfung ebenso für die Unterbrechung der energetischen Zufuhr sorgen kann.

#### 4.4 Der putative Nutzen des SBPPs für Organismen

In dieser Arbeit wurde bioinformatisch nachgewiesen, dass nicht nur *P. copri* für die Verstoffwechslung von Pentosen auf den SBPP angewiesen ist, sondern es wurde auch eine große Verbreitung des SBPPs innerhalb verschiedener Phyla der Darmmikrobiota aufgezeigt (3.1.5.1). Darunter fallen Arten der Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobakterien, Verrucomicrobia und auch Lentisphaerae. Es lässt sich außerdem vermuten, da PPI-PFKs sogar über Darmbakterien hinaus weit verbreitet sind (Koendjibharie et al., 2020), dass der SBPP häufiger vorkommt als bisher angenommen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, wird das Vorhandensein des SBPPs in einem Organismus bestätigt, wenn eine PPI-PFK zusammen mit dem Fehlen einer Transaldolase auftritt (3.1.5.1). Zugleich stellt dieses Zusammenspiel auch einen starken Indikator für die Abhängigkeit der PFK-Reaktion von PPI innerhalb der Glykolyse dar (4.3). Das Fehlen der Transaldolase, wird durchaus überschätzt, da viele Transaldolasen aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit zu F6P-Aldolasen fälschlich annotiert werden (3.1.5.1). Diese häufigen Fehlannotationen von Transaldolasen, konnten in dieser Arbeit anhand des Beispiels für die Transaldolase aus *P. vulgatus* aufgezeigt werden. Denn auch hier wurde das Protein BVU\_3333 häufig

fälschlich als F6P-Aldolase annotiert, wobei es sich tatsächlich aber um eine Transaldolase handelte (3.1.5.2). Interessanterweise war das Vorkommen des SBPPs innerhalb der untersuchten Gattungen wie z. B. der Gattung *Bacteroides* nicht konstant. Einige nahverwandte Darmbakterien nutzen den PPP und andere wiederum den SBPP zur Pentosen-Umwandlung. Wie zuvor angedeutet, muss natürlich geklärt werden, welchen physiologischen Unterschied die Nutzung des jeweiligen Stoffwechselwegs zur Pentosen-Umwandlung für die Organismen ausmacht.

Grundsätzlich wird das Auftreten einer PPI-PFK mit einer anaeroben Lebensweise und der Fähigkeit des Glykogenstoffwechsel assoziiert (Mertens, 1991; Stincone et al., 2015). In dieser Arbeit konnte darauf aufbauend gezeigt werden, dass zusätzlich das Fehlen einer Transaldolase und das Auftreten einer PPI-PFK mit einem anaeroben Stoffwechsel in Verbindung steht, da diese Kombination in anaeroben Bakterien des menschlichen Darms auftrat (3.1.5). Auch konnte diese Kombination (vorhandene PPI-PFK, fehlende Transaldolase) für anaerobe cellulolytische Clostridien beobachtet werden (Koendjibharie et al., 2020). Da der SBPP in humanen Darmbakterien (diese Arbeit) und *Entamoeba histolytica* (Stauffer & Ravdin, 2003; Susskind et al., 1982) genutzt wird, scheint ein weiteres Anzeichen für das Auftreten des SBPP, ein Lebenshabitat mit ständigem Wettbewerb um Nährstoffe wie z.B. der menschliche Darm zu sein. Der menschliche Darm ist zwar ein nährstoffreiches System mit zyklischem Austausch, dennoch konkurrieren die Bewohner aufgrund hoher Zelldichten und schnellen Wachstumsraten durchgehend um Nährstoffe (Walker et al., 2014). Die Fähigkeit des konkurrenzfähigen Überlebens eines Organismus innerhalb der komplexen Darm-Mikrobiota, hängt deshalb maßgeblich von dem Rest der mikrobiellen Gemeinschaft ab (Fischbach & Sonnenburg, 2011). Es ist bekannt, dass Mikroben auf vielfältige Weise miteinander interagieren. Dabei lässt sich grundlegend zwischen negativer Beeinflussung durch beispielsweise den Wettbewerb um einen Nährstoff oder der Sekretion von Hemmstoffen und positiver Interaktion durch in der Regel wechselseitige Ernährung, also der Verwertung von Nebenprodukten durch Darmmitbewohner, unterscheiden (Coyte & Rakoff-Nahoum, 2019). Die grundlegendste Art der Kommunikation zwischen Bakterien, die in einer Gemeinschaft wie der Darmmikrobiota leben, stellt der Verbrauch von Substraten und die Bildung/Abgabe an Endprodukten dar. Denn wenn eine Darmmikrobe ein gewisses Substrat wie beispielsweise Xylan verbraucht und daraus Succinat, Acetat und Formiat bildet, werden die direkten mikrobiellen Nachbarn dies aufgrund sinkender Xylan- und steigender Endprodukt-Konzentration wahrnehmen (Fischbach & Sonnenburg, 2011). Wie zuvor beschrieben stellen Polysaccharide wie Hemicellulosen vor allem die Substrate der Darmmikrobiota bei einer ballaststoffreichen Ernährung dar. Letztendlich sind also Zucker-Moleküle Hauptnahrungsquelle der Darmbakterien. Demnach ist die Verwendung des SBPP möglicherweise zusätzlich eine Adaption an Substrate, die aus monomeren Zuckern aufgebaut sind. Dies wird ebenfalls durch die Hypothesen von

Wimmer et al. (2021) untermauert, da festgestellt wurde, dass PPI-abhängige Stoffwechselwege vermehrt in Organismen auftreten, die sich auf zuckerreiche Umgebungen spezialisiert haben. Zu diesen Zucker-Spezialisten mit PPI-abhängigen glykolytischen Stoffwechselwegen gehören unter anderem cellulolytische Clostridien wie *Pseudoclostridium thermosuccinogenes*, *Hungateiclostridium thermocellum* und *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* (Koendjiharie et al., 2020; Bielen et al., 2010), der humane Darm-Parasit *Entamoeba histolytica* (Susskind et al., 1982) und viele humane Darmbakterien wie *P. copri*, *Faecalibacterium prausnitzii* und *Akkermansia muciniphila* (diese Arbeit).

Für anaerobe Bakterien, kann daher vermutet werden, dass die Verwendung des SBPPs einen Wachstumsvorteil beim Wettbewerb um Nährstoffe haben könnte. Die konkurrenzfähige Verwertung der zuckerhaltigen Substrate in Mikrohabitaten wie dem humanen Darm, wird vermutlich hauptsächlich über schnelle Wachstumsraten gewährleistet. Da ein reversibler und daher flexibler Kohlenstoff-Metabolismus erforderlich ist, um sich leicht und vor allem schnell an Veränderungen der Nahrungsquelle anzupassen, kann angenommen werden, dass der SBPP und eine im EMP-Weg verknüpfte PPI-PFK vorteilhafte Merkmale für Darmbakterien sind. Diese Hypothese, dass sich die Verwendung des SBPPs für den Organismus als Wachstumsvorteil gegenüber Organismen mit PPP erweist, wurde dadurch bestärkt, dass PPI-PFKs vor allem in Organismen auftreten, die lediglich über limitierte Substratquellen verfügen und den zellulären ATP-Level über den Einsatz von PPI-PFKs im EMP-Weg schonen (Mertens, 1991; Moore et al., 2002). Damit Organismen trotz der Konkurrenz um Nährstoffe erfolgreich wachsen können, sind die wichtigsten Herausforderungen die Generierung von ATP, die Aufrechterhaltung des Redox-Gleichgewichts und die Erschließung einer Energiequelle in Form von Nahrung (Fischbach & Sonnenburg, 2011). Unter der Annahme, dass der SBPP zwangsweise mit einer PPI-abhängigen Phosphofruktokinase-Reaktion im EMP-Stoffwechselweg einhergeht, würden Organismen, die auf den SBPP für die Pentosen-Umwandlung setzen, somit nach Mertens (1991) Energie in Form von ATP einsparen. Gegenüber Organismen die eine ATP-PFK im EMP-Weg verwenden, besäßen die Organismen mit PPI-PFK aufgrund der effizienteren Nutzung von ATP daher einen deutlichen Wachstumsvorteil (Fischbach & Sonnenburg, 2011).

Aus evolutionärer Sicht wird seit langer Zeit angenommen, dass PPI im Vergleich zu Nukleotiden wie ATP als Energieträger in ursprünglichen Stoffwechselwegen verwendet wurde und PPI-abhängige Enzyme aus einer früheren Zeit stammten, in der Energie aus damaligen verfügbaren Phosphatmineralien gewonnen wurde (Lipmann, 1965; Mertens, 1993). Somit könnte auch das Auftreten der PPI-PFK im SBPP und im EMP-Weg eine ursprüngliche Form des mikrobiellen Stoffwechsels vergleichend zum regulären PPP mit Transaldolase und zum EMP-Stoffwechselweg mit ATP-PFK darstellen. Neuere Erkenntnisse deuten aber darauf hin, dass PPI keine eigenständige

Energiewährung darstellt, da P<sub>Pi</sub> in jedem Stoffwechsel immer aus Nucleosidtriphosphaten (NTP) gebildet wird (Wimmer et al., 2021). Die Verbindung der P<sub>Pi</sub>-Synthese und dem ATP-Verbrauch trifft auch für die putativen Möglichkeiten der P<sub>Pi</sub>-bildenden Reaktionen in *P. copri* zu (4.3). Zwar weisen einige biologische Moleküle Phosphatbindungen mit hoher Hydrolyse-Energie auf, aber nur NTPs stellen die universelle Energiewährung in allen Organismen dar, da durch die Spaltung entweder Pi oder P<sub>Pi</sub> freigesetzt werden kann (Decker et al., 1970). Darauf aufbauend vermuten die Autoren Wimmer et al. (2021), dass über die Möglichkeit der Bildung von Pi oder P<sub>Pi</sub> eine doppelte Kontrolle der katalysierten Reaktion vorliegt. Auf der einen Seite ist die Abspaltung von Pi oder P<sub>Pi</sub> thermodynamisch aufgrund der negativen  $\Delta G$ -Werte begünstigt und sorgt somit dafür, dass die Reaktion in Richtung Produktbildung abläuft. Zusätzlich weisen P<sub>Pi</sub>-abspaltende Reaktionen eine weitere Kontrolle auf, da die sofortige P<sub>Pi</sub>-Hydrolyse durch hoch-aktive Pyrophosphatasen im Cytoplasma die Reaktion mit der zuvor erforderlichen ATP-Hydrolyse irreversibel macht (Kornberg, 1962; Wimmer et al., 2021). Daher kann zwar in Bezug zum P<sub>Pi</sub>-abhängigen SBPP von einem putativ ursprünglichen Stoffwechselweg gesprochen werden, da die wie zuvor beschriebene P<sub>Pi</sub>-Hydrolyse als ursprünglich gilt (Kornberg, 1962; Siebers et al., 1998), aber der Ausdruck Energiewährung kann für P<sub>Pi</sub> nicht verwendet werden. P<sub>Pi</sub> war vermutlich nie eine alternative Energiewährung zu Beginn des zellulären Lebens und ist es heutzutage auch nicht (Wimmer et al., 2021). Für alle Lebewesen wie auch *P. copri* gilt deshalb ATP als universelle Energiewährung.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Verwendung des SBPPs anstelle des PPPs vermutlich eine Anpassung an eine anaerobe, zuckerreiche Umgebung ist. Es kann angenommen werden, dass der SBPP einen Wachstumsvorteil, begründet auf einer besseren Substratverwertung beim Wettbewerb um Nahrung, vermittelt. Durch den Austausch der Transaldolase durch die P<sub>Pi</sub>-PFK und die FBP-Aldolase wird dennoch die Reversibilität des Pentose-Stoffwechsels erhalten und daher ist eine schnelle Stoffwechselanpassung an Veränderungen der Nahrungsquelle möglich. Da die Verwendung einer P<sub>Pi</sub>-PFK im SBPP mit dem Austausch der ATP-PFK im EMP-Weg durch jene P<sub>Pi</sub>-PFK wahrscheinlich ist, wird durch beide P<sub>Pi</sub>-abhängigen Stoffwechselwege die für Zellwachstum unerlässliche P<sub>Pi</sub>-Hydrolyse effizienter genutzt. Zusätzlich spart der Wechsel von einer ATP-PFK auf eine P<sub>Pi</sub>-PFK im EMP-Stoffwechselweg vermutlich ein ATP-Molekül ein. Ohne Frage ist der SBPP eine bisher eher übersehene, aber offenbar weit verbreitete Alternative für den Pentose-Stoffwechsel in vielen wichtigen Mikroorganismen, von denen viele zu den Bewohnern des menschlichen Darms zählen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zum Pentose-Metabolismus in Darmbakterien zeigten deutlich, dass biochemische Analysen zu den Stoffwechselwegen notwendig sind, um physiologische Unterschiede der Mikroorganismen des Darms aufzudecken. Letztendlich liefert erst die detaillierte

biochemische Charakterisierung eine Grundlage für Untersuchungen zur Beziehung zwischen Darmflora und Mensch, die über Sequenzierungsanalysen allein nicht bestimmt werden kann.

#### 4.5 Biotechnologische Produktion von Succinat

Die Biotechnologie stellt die Technologie dar, die verschiedene Produkte unter Verwendung biologischer Prozesse, lebender Organismen oder ihrer Bestandteile wie Enzymen entwickelt oder herstellt. Biotechnologische Verfahren werden für zahlreiche industrielle Herstellungen wie Lebensmittel und Futtermittel, Arzneimittel und chemische Produkte eingesetzt. Mikroorganismen und mikrobielle Enzyme werden bereits seit Jahrtausenden für die Herstellung von z.B. Bier und Käse verwendet, aber erst die moderne Biotechnologie ermöglichte eine gezielte Optimierung der Produktionsprozesse auch für weitere Anwendungsbereiche (Kircher et al., 2020). Diese Optimierung basiert auf der von Cohen und Boyer 1973 entwickelten Technik zum Einbringen genetisch veränderter Moleküle in fremde Zellen über rekombinante DNA (*genetic engineering*; Cohen et al., 1973). Die sogenannte Gentechnik brachte den Durchbruch der biotechnologischen Forschung, da diese Methode die Möglichkeit der gezielten Verbesserung des genetischen Materials und somit auch der Produktion erlaubte (Bera, 2009). Beispiele für die moderne Biotechnologie sind die rekombinante Produktion des Hormons Insulin durch *E. coli*, die Produktion von Citronensäure mit gentechnisch manipulierten *Aspergillus niger*-Stämmen oder die rekombinante Reife-Optimierung der Tomatenpflanze „FLAVR SAVR“ (Kircher et al., 2020; Amato et al., 2020; Kramer & Redenbaugh, 1994). Der Einsatz von Mikroorganismen und deren Bestandteile innerhalb der industriellen Produktion laufen unter dem Begriff der weißen Biotechnologie (Drepper et al., 2006). Die Schwerpunkte der weißen Biotechnologie sind der Ersatz endlicher fossiler Brennstoffe durch regenerative Rohstoffe und der Austausch konventioneller petrochemischer Prozesse durch biologische Prozesse, um den Energie- und Rohstoffbedarf zu senken und die Anzahl der Prozessstufen zu minimieren (Soetaert & Vandamme, 2006). Die Produkte solcher nachhaltigen Prozesse werden auch als biobasierte Produkte bezeichnet. Die größte Herausforderung der weißen Biotechnologie ist es, mit der konventionellen Petrochemie zu konkurrieren. Aufgrund der derzeit akut diskutierten Klimadebatte und der steigenden Ölpreise gewinnt der Produktionsanstieg auf nachwachsende Rohstoffe innerhalb der industriellen Produktion ersichtlich an Bedeutung (Tylecote, 2019; Li et al., 2020; Nasser et al., 2021). In diesem Wandel der weißen Biotechnologie stehen auch die Produktionsmethoden der bedeutsamen Plattformchemikalie Succinat, wobei dann von sogenanntem Bio-Succinat gesprochen wird.

Succinat, das Salz der Bernsteinsäure, gilt als wichtige Bulkchemikalie, da jährlich mehr als 10.000 Tonnen hergestellt werden. Im Jahr 2014 wurden 16.000 – 30.000 Tonnen Succinat produziert und für den Prognosezeitraum 2019-2024 wird ein Produktionsanstieg für Bio-Succinat von 8,2 % vorhergesagt

(Mordor Intelligence, 2021a). Die industriellen Hauptakteure der Bio-Succinat Herstellung sind die Firmen BASF SE, Roquette Frères und Kawasaki Kasei Chemicals (Mordor Intelligence, 2021b). Succinat findet Einsatz innerhalb von Lebensmitteln, Tensiden und biologisch abbaubaren Kunststoffen wie beispielsweise als Lebensmittelzusatzstoff E363 oder als Vorstufe der Chemikalie 1,4-Butandiol (Bechthold et al., 2008). Petrochemisch wird Succinat hauptsächlich über die Hydrierung des fossil-basierten Maleinsäureanhydrid hergestellt (Nghiem et al., 2017). Wie zuvor beschrieben wird Bio-Succinat mithilfe von Mikroorganismen produziert. Da Succinat als Intermediat des Citratzyklus, des Glyoxylatwegs und Endprodukt der Fumarat-Atmung Teil bzw. teilweise Endprodukt des zentralen Stoffwechsels von Mikroorganismen ist, eignet sich das Molekül sehr gut für die biologische Produktion (Ahn et al., 2016). Der grundlegende Vorteil der Produktion von Bio-Succinat besteht darin, dass im Vergleich zum petrochemischen Prozess der Succinat-Herstellung, CO<sub>2</sub> verbraucht wird und deshalb eine deutlich bessere CO<sub>2</sub>-Bilanz vorliegt. Zusätzlich beruht die Produktion von Bio-Succinat auf erneuerbaren, zuckerbasierten Rohstoffen oder Nebenprodukten aus anderen industriellen Produktionen. Die angewandte Bio-Succinat-Produktion ermöglicht eine deutliche Kostenersparnis im Vergleich zur petrochemischen Herstellung (Tsapekos et al., 2021). Beispielsweise wird von der Firma BASF SE zur Produktion von Bio-Succinat preiswertes Glycerin, welches ein in großen Mengen verfügbares Nebenprodukt der Biodieselindustrie darstellt, als Ausgangssubstrat eingesetzt (Ahn et al., 2016).

Verschiedene Mikroorganismen wurden als effiziente Succinat-Produzenten identifiziert und zum Teil über die Veränderung der Stoffwechselwege zur Optimierung der Produktausbeute (*metabolic engineering*) verbessert. Dazu zählen beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* (eingesetzt von Roquette Frères), *E. coli*, *Mannheimia succiniciproducens* oder *Basfia succiniciproducens* (eingesetzt von BASF SE; Ahn et al., 2016). Grundsätzlich werden bei der gentechnischen Veränderung zur Erhöhung des Succinat-Ertrags und Succinat-Titers, Succinat-bildende Stoffwechselwege durch Gen-Überexpressionen verstärkt und dazu konkurrierende Stoffwechselwege, die zur Bildung von Nebenprodukten führen, über Gen-Deletionen ausgeschaltet. Die Produktion von Bio-Succinat erfolgt in der Regel über Batch- und Fed-Batch-Ansätze, Fed-Batch mit Zell-Recycling oder kontinuierliche Kulturen mit teilweise integrierten Membranen zum Zell-Recycling (Hoefel et al., 2012; Scholten et al., 2009; Kim et al., 2009; Jansen & Gulik, 2014). Auch für den Downstream-Prozess, also die Aufbereitung von Succinat, existieren mehrere Varianten. Das traditionell, industriell angewandte Verfahren erfolgt über Calcium-Titration, wodurch Carbonsäuren wie Bernsteinsäure zusammen mit Calcium-Ionen als unlösliche Salze ausgefällt werden. Folgerichtig ist eine anschließende Rückgewinnung mithilfe einer anderen Säure (meistens Schwefelsäure) nötig (Jansen & Gulik, 2014). Diese Methode auf Calcium-Ionen Basis hat einige Nachteile wie die hohen Kosten der nötigen Chemikalien (Titriermittel und Säure

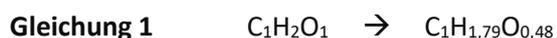
zur Rückgewinnung), weshalb alternative Prozesse zur Succinat-Aufbereitung entwickelt wurden. Dazu zählen die Ausfällung von Succinat mithilfe von Ammoniak (angewendet von der Firma Myriant), der Einsatz von Natriumhydroxid und anschließender Trennung durch eine Elektrodialyse (verwendet von der Firma BioAmber) oder die Verwendung von Magnesiumhydroxid als Titriermittel und darauf folgender Abtrennung und Aufbereitung von Magnesiumsuccinat (angewendet durch die Firma Corbion-Purac; Jansen & Gulik, 2014).

Die meisten Bakterien, die Succinat auf natürlicher Weise in signifikanten Menge bilden, stammen aus dem Pansen von Wiederkäuern. Dazu zählen beispielsweise *Actinobacillus succinogenes* (*A. succinogenes*), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (*A. succiniciproducens*), *Mannheimia succiniciproducens* (*M. succiniciproducens*) und *Bacteroides (B.) fragilis* (Beauprez et al., 2010). Das Habitat des Darms von Tieren aber auch Menschen, muss daher nachweislich eine einzigartige Umgebung für eine effiziente Succinat-Produktion darstellen. Da Darmbakterien bereits von Natur aus in der Lage sind, eine Vielzahl an nachwachsenden Rohstoffen wie Hemicellulosen als Substrat zur Succinat-Produktion zu verwerten (Flint et al., 2012), kommt die Anwendung dieser Organismen besonders für eine nachhaltige Bio-Succinat-Bildung in Frage. Ein Nachteil der Anwendung von Darmbakterien als Succinat-Produzenten ist, dass die meisten Organismen auxotroph sind, da Vitamine und Aminosäuren im natürlichen Lebens-Habitat leicht verfügbar sind. Dementsprechend werden für die Succinat-Produktion komplexe und damit kostenintensive Medien benötigt (Jansen & Gulik, 2014).

Bis 2019 zählte der Organismus *P. vulgatus* zur Gattung *Bacteroides* und wurde dann zur Gattung *Phocaeicola* phylogenetisch neu zugeordnet (Garcia-Lopez et al., 2019). Da Arten der Gattung *Bacteroides* und *Phocaeicola* zu den häufigsten xylanolytischen Organismen der humanen Darmflora zählen und zu der Verwertung nachhaltiger pflanzlicher Polysaccharide befähigt sind (Chassard et al., 2007; Bryant et al., 1958; Dehority, 1966), kann auch das Darmbakterium *P. vulgatus* zu den industriell anwendbaren Succinat-Produzenten gezählt werden (Franke, 2020). *P. vulgatus* bildet grundsätzlich über einen nicht-geschlossenen Citratzyklus Succinat. Der nicht-geschlossene Citratzyklus lässt sich in einen oxidativen und einen reduktiven Abschnitt unterteilen, wobei beide Wege mit der Bildung von Succinat enden. Dennoch basiert die zelluläre Produktion von Succinat in Organismen mit Fumarat-Atmung wie in *P. vulgatus* hauptsächlich aber auf dem reduktiven Abschnitt (Franke, 2020). Beim oxidativen Teil wird Oxalacetat zusammen mit Acetyl-CoA oxidativ zu Succinat umgeformt, wobei Reduktionsmittel (NADH und  $Fd_{red}$ ) und Vorstufen für Biosynthesen wie beispielsweise Aminosäuren gebildet werden. Somit liefert der oxidative Abschnitt des Citratzyklus essentielle Moleküle für den Anabolismus und kann daher zu den anabolen Reaktionen der Zelle zugeordnet werden. Da der

oxidative Teil somit zum Anabolismus zählt, trägt dieser kaum zur zellulären Succinat-Bildung in *P. vulgatus* bei. Im reduktiven Abschnitt des Citratzyklus wird Oxalacetat unter Verbrauch von Reduktionsmitteln reduktiv zu Succinat umgewandelt und deshalb kann dieser Teil des Citratzyklus zum Katabolismus eingeordnet werden. Zusammenfassend verstoffwechselt *P. vulgatus* Glukose über den EMP-Weg mit der Bildung von PEP, wobei PEP entweder über den reduktiven Citratzyklus und dazugehöriger Fumarat-Atmung zu Succinat oder mithilfe der Pyruvat-Kinase zu Pyruvat umgeformt wird. Pyruvat kann entweder katalysiert durch die Lactat-Dehydrogenase zu Lactat reduziert, über die Pyruvat-Formiat-Lyase zu Formiat und Acetyl-CoA oder mithilfe der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgewandelt werden. Acetyl-CoA wird final unter Bildung von ATP zu Acetat katalysiert durch die Phosphotransacetylase und die Acetatkinase umgeformt. Ein geringer Anteil an Succinat kann unter CO<sub>2</sub>-Freisetzung zu Propionat verstoffwechselt werden.

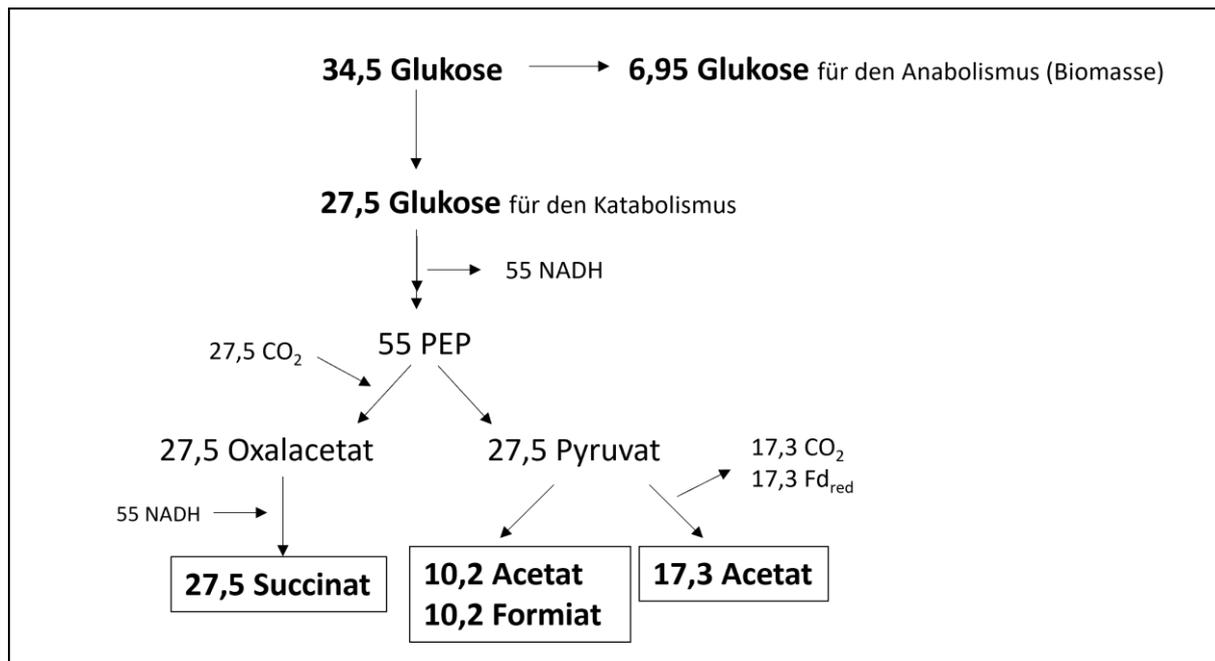
Für den Einsatz von *P. vulgatus* als Succinat-Produzent, war die Analyse des Kohlenstoffflusses in Bezug auf die theoretisch erzeugbare Menge des Endproduktes Succinat essentiell. Neben dem Kohlenstofffluss ausgehend von Glukose, spielte die Untersuchung der Redoxbilanz des Stoffwechsels für die Produktion von Succinat eine wichtige Rolle. Grundsätzlich sind für den Anabolismus einer Zelle Reduktionsäquivalente [H] entscheidend, die beispielsweise über den oxidativen Abschnitt des Citratzyklus in *P. vulgatus* erzeugt werden. Um die theoretisch maximale Menge an Succinat pro g Zelltrockenmasse (TG) zu berechnen, stellte sich deshalb die Frage, wie viele [H] benötigt *P. vulgatus* für die Bildung von 1 g TG. Da 50 % des Masseverhältnisses der Biomasse jeder Zelle Kohlenstoff ausmachen, konnte bestimmt werden, dass 41,7 mmol Kohlenstoff und somit 6,95 mmol Glukose für 1 g TG benötigt werden. Unter Berücksichtigung der Elementarzusammensetzung (vgl. vereinfachte Einheit der Biomasse von *P. copri* C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,48</sub>; Franke & Deppenmeier, 2018) zeigte sich, dass die kleinste Einheit der Biomasse von *P. vulgatus* im Vergleich zum Substrat Glukose (C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>) in einem reduzierteren Zustand vorlag. Deshalb musste Glukose reduziert werden, um den Reduktionsgrad der Zelle anzugleichen (s. Gleichung 1).



Für die Umwandlung von Glukose in Biomasse mussten demnach bei 6,95 mmol Glukose pro g TG, 41,7 mmol C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>-Einheiten/g TG in 41,7 mmol C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,48</sub>-Einheiten/g TG reduziert werden. Die [H]-Äquivalente mussten von 83,4 mmol/g TG auf 74,6 mmol/g TG und die [O]-Äquivalente von 41,7 mmol/g TG auf 20 mmol/g TG reduziert werden. Dies entsprach einer [H]-Differenz von 8,76 mmol/g TG und einer [O]-Differenz von 21,7 mmol/g TG, die entsprechend über Reduktionen entfernt werden mussten. Da Sauerstoff nur in Form von Wasser (H<sub>2</sub>O) zellulär entfernt werden kann, änderte sich die

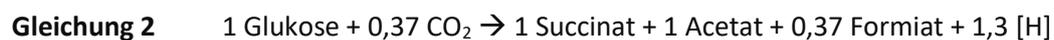
Bilanz der [H]-Äquivalente, sodass nunmehr 34,64 mmol [H] katabol gebildet werden mussten, um 1 g TG zu erzeugen ((21,7 mmol x 2) – 8,76 mmol). Dies entsprach, in Form von NADH oder  $Fd_{red}$  17,3 mmol, die im Zuge des Katabolismus von *P. vulgatus* erzeugt werden mussten (persönliche Mitteilung Prof. U. Deppenmeier, IfMB, Universität Bonn, 2021).

Anhand der Korrelation zwischen verfügbarer Energie (ATP), die durch den Katabolismus erzeugt wurde, und der daraus erzeugbaren Biomasse, konnte das Verhältnis zwischen Anabolismus und Katabolismus bestimmt werden. Theoretisch bildet *P. vulgatus* pro Glukose Molekül 3,4 Mol ATP. Vereinfacht wird jeweils 1 Mol ATP über die Reaktionen der PEP-Carboxykinase, der Pyruvatkinase und der Acetatkinase erzeugt und pro reduziertem Molekül Fumarat wird 0,4 Mol ATP für die Bildung von Biomasse produziert (Bernhard & Gottschalk, 1978). Durchschnittlich kann eine bakterielle Zelle pro mol ATP 10,7 g Trockenbiomasse bilden (Hempfling & Mainzer, 1975). Demnach würde *P. vulgatus* für die Bildung von 1 g TG 93,5 mmol ATP benötigen. Da pro Mol Glukose 3,4 Mol ATP gebildet werden, ließ sich bezogen auf die 93,5 mmol ATP/g TG anschließend berechnen, dass 27,5 mmol Glukose für die notwendige Bildung von 34,6 mmol [H] für 1 g TG über den Katabolismus verstoffwechselt werden mussten. Zusammenfassend werden ~ 80 % der Glukose über katabole Stoffwechselwege vereinfacht zu Succinat, Acetat und Formiat umgewandelt (Lactat und Propionat werden lediglich in geringen Mengen gebildet; Franke, 2020) und ~ 20 % der Glukose für das Zellwachstum eingesetzt (Abb. 45). Aus 34,5 mmol Glukose pro g TG und 10,2 mmol  $CO_2$ /g TG werden in *P. vulgatus* über katabole Reaktionen theoretisch 27,5 mmol Succinat/g TG, 27,5 mmol Acetat/g TG, 10,2 mmol Formiat/g TG und 17,3 mmol  $Fd_{red}$ /g TG gebildet. Also kann *P. vulgatus* pro g TG maximal 27,5 mmol Succinat produzieren. Diese Berechnungen waren mit den Beobachtungen von Franke (2020) ähnlich. In den bisher nicht zur Succinat-Bildung optimierten Versuchen, erzeugte *P. vulgatus* 21 mmol Succinat/g TG, 27 mmol Acetat/g TG und 9 mmol Formiat/g TG aus 37,45 mmol Glukose pro g TG.



**Abbildung 45:** Theoretisches Flussschema der Intermediate des vereinfachten Kohlenstoff-Stoffwechsels von *P. vulgatus* ausgehend vom Substrat Glukose. Die Produkte Lactat und Propionat wurden nicht beachtet, da sie nur in sehr geringen Mengen gebildet werden. Die Angabe der Intermediate erfolgte in Stoffmenge [mmol] pro Zelltrockenbiomasse [g]. PEP = Phosphoenolpyruvat; Fd<sub>red</sub> = reduziertes Ferredoxin.

Über die durchgeführten Berechnungen konnten schließlich eine Fermentationsgleichung (Gleichung 2) aufgestellt werden, wobei deutlich wurde, dass *P. vulgatus* zu gleichen Anteilen Succinat und Acetat produzierte.



Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass *P. vulgatus* bereits ohne Prozess- oder Stamm-Optimierung eine große Menge an Succinat produzieren kann. Auffällig war allerdings auch, dass pro g TG zu gleichen Anteilen Succinat und Acetat (jeweils 27,5 mmol/g TG) gebildet wurden, wobei dieses Produktverhältnis durchaus eine Grundlage für mögliche Optimierungsstrategien darstellte. Dennoch ähnelten die Produktionsparameter mit einem Ertrag von 0,35 g Succinat pro g Glukose (Franke, 2020) bereits ohne jegliche Optimierung den Erträgen anderer industriell genutzter Succinat-Produzenten. Der Vergleich zu anderen Succinat-Produzenten wird im nächsten Abschnitt und der Tabelle 15 beschrieben. *P. vulgatus* wird zwar bislang nicht für industrielle Anwendungen eingesetzt, da aber Organismen der Gattung *Bacteroides* als putativ probiotisch eingestuft werden (Tan et al., 2019), kann durchaus ein zukünftiger industrieller Einsatz in Erwägung gezogen werden. Zusätzlich gibt es Untersuchungen zur Herstellung von Bio-Succinat durch den nahverwandten Organismus *B. fragilis*, wobei die Autoren dem Bakterium eine industrielle Anwendung zusprechen (Isar et al., 2006).

Eine Vielzahl von Organismen, vor allem die zuvor beschriebenen Pansenbakterien, wurden auf ihre Fähigkeit zur natürlichen Produktion von Succinat untersucht und hinsichtlich der Succinat-Ausbeute genetisch manipuliert. In Tabelle 15 sind Beispiele für Bio-Succinat-Produzenten aufgeführt.

Das anaerobe aus Rinderpansen isolierte Bakterium *A. succinogenes* bildet natürlicherweise Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus (Guarnieri et al., 2017), wobei bis zu 67 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,74 g Succinat pro g Maisstroh erzielt werden konnte (Guettler et al., 1996; Salvachua et al., 2016). Mittels unterschiedlicher genetischer Veränderungen des Organismus konnte die Ausbeute an Succinat erhöht und die Reinheit des Produktes durch Verringerung der Nebenprodukte verbessert werden. Dazu zählten beispielsweise die plasmidbasierte-Überexpression der Schlüsselenzyme des reduktiven Abschnittes des Citratzyklus wie die Malat-Dehydrogenase (pMDH) wodurch der Ertrag (g/g) um 12,7 % gesteigert wurde. Außerdem konnte über die Gen-Deletion der Enzyme von konkurrierenden Wegen, die Reinheit von Succinat durch die Abnahme der Nebenprodukte wie Acetat und Formiat gesteigert werden (Guarnieri et al., 2017).

Ein anderes Beispiel für einen natürlichen Succinat-Produzenten ist das anaerobe Bakterium *A. succiniciproducens*. Bei dem Einsatz des kostengünstigen Substrats Glycerin konnte eine Succinat-Ausbeute von 1,4 g Succinat pro g Glycerin und ein Succinat-Titer von 14 g/l erzielt werden (Lee et al., 2010). Im Vergleich dazu wurde bei Verwendung von Glukose in einer anderen Studie von einem Succinat-Ertrag von 0,89 g Succinat pro g Glukose und einem Succinat-Titer von 83 g/l berichtet (Meynial-Salles et al., 2008).

Ein weiteres Bakterium, welches aus Rinderpansen isoliert wurde und natürlicher Weise Succinat in hohen Mengen produziert, ist *M. succiniciproducens*, wobei bis zu 13,5 g/l Succinat mit einer Ausbeute von 0,68 g Succinat pro g Glukose beobachtet werden konnten (Lee et al., 2002). Auch für diesen Organismus konnte durch genetische Veränderungen die Verschiebung des Kohlenstoffflusses zur Succinat-Produktion und gleichzeitiger Minimierung der Nebenprodukte, deutlich mehr Succinat (78,4 g/l) mit einem Ertrag von 1,07 g Succinat pro g Glycerin erreicht werden (Lee et al., 2016). In dieser Studie wurden konkurrierende Stoffwechselwege wie die Bildung von Lactat, Pyruvat und Acetat durch verschiedene Gendeletionen unterbunden.

Als weiteren natürlichen Succinat-Produzenten wird im Folgenden *Basfia succiniciproducens* (*B. succiniciproducens*) aufgeführt. Das Bakterium wurde ebenfalls aus Rinderpansen isoliert und produziert natürlicherweise bis zu 20 g/l Succinat mit einer Ausbeute von 0,49 g Succinat pro g Glukose (Becker et al., 2013). Auch für diese Art wurden bereits unterschiedliche genetische Manipulationen zur Produkt-Maximierung durchgeführt. Beispielsweise konnte durch die Deletion der Gene für die Enzyme Pyruvat-Formiat-Lyase (pfl) und Lactat-Dehydrogenase (ldh), der zentrale Stoffwechselweg von *B. succiniciproducens* in Richtung Succinat-Bildung optimiert werden. Dadurch produzierte der

Organismus bis zu 36,6 g/l Succinat mit einem Ertrag von 1,26 g Succinat pro g Glycerin (Scholten et al., 2011).

Auch für die zu *P. vulgatus* nahverwandten Darmbakterien *B. fragilis* und *P. copri* wurden Untersuchungen bezüglich der Prozess-Optimierung zur Succinat-Bildung unternommen. Natürlicherweise produzierte *B. fragilis* 12,5 g/l Succinat mit einer Ausbeute von 0,62 g Succinat pro g Glukose und *P. copri* erzielte bei Wachstum auf Glukose einen Succinat-Titer von 25 g/l mit einem Ertrag von 0,7 g Succinat pro g Glukose (Isar et al., 2006; Franke, 2020). Wie zuvor beschrieben erreichte *P. vulgatus* ohne jegliche Optimierung der Succinat-Produktion bereits einen Ertrag von 0,35 g Succinat pro g Glukose (Franke, 2020), weshalb der Organismus ein vielversprechender Succinat-Produzent ist und die Succinat-Ausbeute vermutlich durch Prozessoptimierungen erhöht werden könnte. Hinzu kommt, dass *P. vulgatus* die für Bio-Succinat eingesetzten nachwachsenden Ausgangsmaterialien wie Hemicellulosen verstoffwechseln und daraus Succinat produzieren kann, sodass der Organismus ein idealer Kandidat zur nachhaltigen Succinat-Produktion darstellt (Chassard et al., 2007; Bryant et al., 1958; Dehority, 1966).

**Tabelle 15:** Auflistung ausgewählter Bio-Succinat-Produzenten und entsprechender Herstellungsparameter.

Organismus	Ertrag Succinat/Substrat (g/g)	Succinat-Titer (g/l)	Substrat	Nebenprodukte	Fermentation	Anmerkung	Referenz
<i>A. succinogenes</i>	-	67	Glukose	Acetat, Formiat, Propionat, Pyruvat	Batch	WT, Stamm 130Z	Guettler et al., 1996
<i>A. succinogenes</i>	0,74	42,8	Maisstroh	Acetat, Formiat	Batch	WT, Stamm 130Z	Salvachua et al., 2016
<i>A. succinogenes</i>	0,71	34,2	Glukose, Xylose	Acetat, Formiat, Pyruvat	Batch	GVO, Stamm 130Z + pMDH	Guarnieri et al., 2017
<i>A. succiniciproducens</i>	1,4	14	Glycerin	Acetat	kontinuierlich	WT, Stamm ATCC 29305	Lee et a., 2010
<i>A. succiniciproducens</i>	0,89	83	Glukose	Acetat	Batch	WT, Stamm ATCC 53488	Meynial-Salles et al., 2008
<i>M. succiniciproducens</i>	0,68	13,5	Glukose	Acetat, Lactat, Formiat	Batch	WT, Stamm MBEL55E	Lee et al., 2002
<i>M. succiniciproducens</i>	1,07	78,4	Glycerin	Acetat, Lactat, Formiat	Fed-Batch	GVO, PALFK Stamm	Lee et al., 2016
<i>B. succiniciproducens</i>	0,49	20	Glukose	Acetat, Formiat, Lactat, Ethanol	Batch	WT	Becker et al., 2013
<i>B. succiniciproducens</i>	1,26	36,20	Glycerin	Acetat, Formiat, Lactat, Ethanol	Batch	GVO, Stamm $\Delta$ pfl, $\Delta$ ldh	Scholten et al., 2011
<i>B. fragilis</i>	0,62	12,5	Glukose	-	Batch	WT, Stamm MTCC 1045	Isar et al., 2006
<i>P. copri</i>	0,7	25	Glukose	Acetat, Formiat	Batch/Fed-Batch	WT, Stamm 18205	Franke, 2020
<i>E. coli</i>	0,96	96	Glukose	-	Batch	GVO, Stamm TG400	Grabar et al., 2018
<i>E. coli</i>	1,13	116,2	Glukose	-	Batch	GVO, Stamm SD121	Wang et al., 2011b

Die grundlegende Absicht einer Optimierungs-Strategie der Succinat-Produktion in einem Organismus, ist die Ausbeute an Succinat zu erhöhen und Nebenprodukt-Bildung zu verringern bzw. ganz zu verhindern. Bevor Stammoptimierungen für das Bakterium *P. vulgatus* durchgeführt werden, könnte die Succinat-Produktion durch Prozessoptimierungen durchaus gesteigert werden. Über die Erhöhung der Substratkonzentration, vergleichend zu den Experimenten von Franke (2020), von 30 mM auf 200 mM Glukose im angewandten Batch-Verfahren, könnte versucht werden, die Bildung von Succinat zu erhöhen. Dazu sollte wie bei der Succinat-Herstellung in *P. copri*, das Kulturmedium ebenfalls mit  $\text{CaCO}_3$  gepuffert werden, damit der pH-Wert der Fermentation stabil gehalten wird (Franke, 2020). Für *P. copri* konnte durch die Steigerung der Glukose-Konzentration auf 200 mM und mit der  $\text{CaCO}_3$ -Pufferung des Mediums, die Succinat-Konzentration um nahezu das 5-Fache gesteigert werden, was einem Ertrag von 0,7 g pro g Glukose im Batch-Verfahren entsprach (Franke, 2020). Ein positiver Nebeneffekt bei der Pufferung mit  $\text{CaCO}_3$  stellt die erhöhte  $\text{CO}_2$ -Verfügbarkeit zur Produktion von Succinat dar. Dies beruht darauf, dass die sauer reagierenden Carboxylgruppen der gebildeten Endprodukte Protonen auf  $\text{CaCO}_3$  übertragen und letztlich  $\text{CO}_2$  freigesetzt wird (Salek et al., 2015). Sowohl *P. copri* als auch *P. vulgatus* benötigen eine ausreichende Menge an  $\text{CO}_2$  für ein optimales Wachstum, da  $\text{CO}_2$  für die Umwandlung von PEP zu Oxalacetat und somit final für die Bildung des terminalen Elektronenakzeptors Fumarat essentiell ist. Auffällig ist aber, dass *P. vulgatus* bei Weitem nicht so stark  $\text{CO}_2$ -abhängig ist wie *P. copri*, da  $\text{CO}_2$  durch die Umwandlung von Succinat zu Propionat freigesetzt werden kann und für die Carboxylierung von PEP zur Verfügung steht (Franke & Deppenmeier, 2018; Reichardt et al., 2014). Diese Tatsache begründet auch, dass sich in *Bacteroides*-Arten bei niedrigen  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen das Verhältnis der Produkte in Richtung Propionat verschiebt (Caspari & Macy, 1983). Auch für die Succinat-Produktion in anderen Organismen wie beispielsweise *Citrobacter amalonaticus* oder *A. succiniciproducens* konnte gezeigt werden, dass  $\text{CO}_2$  essentiell für die Succinat-Bildung ist und bei ausreichender Menge zu einer geringeren Konzentration an Nebenprodukten führt (Amulya et al., 2019; Samuelov et al., 1991). Somit kann vermutet werden, dass die Succinat-Produktion in *P. vulgatus* über eine erhöhte Menge an  $\text{CO}_2$  optimiert werden könnte. Denn wenn  $\text{CO}_2$  in großen Mengen vorhanden ist, scheidet *P. vulgatus* das erzeugte Succinat als Stoffwechselendprodukt aus. Herrscht allerdings ein Mangel an  $\text{CO}_2$ , so regeneriert *P. vulgatus*  $\text{CO}_2$  aus Succinat über die Bildung von Propionat (Fischbach & Sonnenburg, 2011). Zusammenfassend kann angenommen werden, dass durch eine ausreichende Zuführung von  $\text{CO}_2$ , die Konzentration von Succinat erhöht und die Bildung an Nebenprodukten (Propionat) gesenkt werden könnte. Um eine industrielle Anwendung von *P. vulgatus* zur Succinat-Produktion zu realisieren, sollte eine kostengünstige  $\text{CO}_2$ -Quelle eingesetzt werden. Zusätzlich wäre es im Sinne der weißen Biotechnologie von besonderem Interesse,  $\text{CO}_2$  aus Verbrennungen fossiler Brennstoffe, wodurch die  $\text{CO}_2$ -Emission verringert würde, oder erneuerbaren Energien zu beziehen. Beispielsweise könnte der aufbereitete

Abgasstrom einer Ethanol-Produktionsanlage oder Biogas als CO<sub>2</sub>-Quelle verwendet werden (Jansen & Gulik, 2014; Tsapekos et al., 2021). Ein weiterer Vorteil bei Verwendung von Biogas zur Herstellung von Succinat besteht darin, dass die Reinheit des Bio-Brennstoffs Methan erhöht werden könnte. Beispielsweise wurde im Zuge der Succinat-Produktion durch den CO<sub>2</sub>-Verbrauch aus Biogas mithilfe des Organismus *A. succinogenes* hochreines Methan erzeugt und dadurch die Anwendungsmöglichkeiten von Methan erweitert (Gunnarsson et al., 2014).

Ebenfalls könnte ein Effekt der Produktsteigerung durch die Regulierung der Substratkonzentration über ein Fed-Batch Verfahren, also der kontinuierlichen Zufuhr an Substraten, erreicht werden. Möglicherweise liegt eine Produktionsinhibierung in *P. vulgatus* wie beispielsweise geringe Wachstumsraten aufgrund erhöhter Osmolalität des Mediums durch eine zu hohe Substratkonzentration vor (Kademi & Baratti, 1996). Diese könnte durch eine geringere Substratkonzentration minimiert und das Wachstum des Organismus somit gestärkt werden. Eine Erhöhung der Biomasse durch das Fed-Batch Verfahren führte beispielsweise bei *M. succiniciproducens* zu einer deutlichen Verbesserung der Succinat-Produktion (Lee et al., 2016). Allerdings kann sowohl für Batch-als auch Fed-Batch-Fermentationen die Akkumulierung der Stoffwechselendprodukte potenziell das Wachstum von *P. vulgatus* inhibieren. Bei Akkumulierung der schwachsauren Endprodukte Succinat, Acetat und Formiat liegen diese Moleküle trotz Pufferung anteilig protoniert vor. In protonierter Form können die Säuren dann die Cytoplasmamembran von *P. vulgatus* passieren, im Cytoplasma deprotonieren und so Protonen entgegen des elektrochemischen Protonengradienten in die Zelle leiten. Letztlich wird dadurch die Atmungskette entkoppelt und für die Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten muss Energie investiert werden (Herrero et al., 1985). Deshalb könnte eine kontinuierliche Fermentation, also die ständige Zufuhr von Substraten und Abfuhr von Endprodukten, in Betracht gezogen werden, um die Bildung von Biomasse für eine hohe Succinat-Menge zu gewährleisten. Industriell wird solch eine kontinuierliche Fermentationsanlage häufig mit einem Membran-Modul angewendet, wodurch die Produktionszellen recycelt werden. Solch eine kontinuierliche Fermentationsanlage mit und auch ohne Zell-Recycling-Modul, führte innerhalb der Bio-Succinat-Produktion mit *M. succiniciproducens* zu einer enormen Steigerung der Produktivität (Lee et al., 2016) und mit *A. succiniciproducens* zu einem hohen Succinat Ertrag von 1,4 g Succinat pro g Glycerin (Lee et al., 2010).

Zur Prozessoptimierung zählt folgerichtig auch die Wahl eines effizienten Ausgangsmaterials. Wie zuvor beschrieben ist *P. vulgatus* natürlicherweise in der Lage nachwachsende Rohstoffe wie Hemicellulose, die vor allem aus agrar- und forstwirtschaftlichen Erzeugnissen stammen, als Wachstumssubstrat zu verwenden und daraus Succinat als Endprodukt zu bilden. Durch den Einsatz

nachwachsender Rohstoffe als Ausgangsmaterial für die Succinat-Produktion, werden Produktionskosten eingespart und der Verbrauch von petrochemischen Verbindungen gemindert (Lu et al., 2021). Im Vergleich zu anderen Substraten wie Glukose oder Glycerin konnten ähnliche Succinat-Erträge beim Einsatz von lignocellulolytischen Ausgangssubstraten für anderen Organismen bestimmt werden. Weshalb davon ausgegangen werden kann, dass auch für *P. vulgatus* mit dem Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen hohe Succinat-Ausbeuten erzielt werden können. Zum Beispiel produzierte *A. succinogenes* mit Maisstroh als Substrat 42,8 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,74 g Succinat pro g Maisstroh und aus Eichenholz-Hydrolysat (49 % Cellulose, 26 % Hemicellulose, 22 % Lignin) bildete *A. succiniciproducens* 24 g/l Succinat mit einer Ausbeute von 0,88 g Succinat pro g Eichenholz-Hydrolysat (Salvachua et al., 2016; Lee et al., 2003).

Unter allen Succinat-Produzenten ist allerdings auffällig, dass die effektivsten Succinat-Produzenten gentechnisch veränderte *E. coli*-Stämme darstellen (Tab. 15). Natürlicherweise produziert *E. coli* nur relativ wenig Succinat im Zuge der gemischten Säuregärung (Clark, 1989). Für die *E. coli*-Stämme wurde deshalb der Metabolismus erheblich gentechnisch manipuliert, um hohe Erträge von ungefähr 1 g Succinat pro g Substrat und Succinat-Titer deutlich über 85 g/l zu erzielen (Ahn et al., 2016). Die in Tabelle 15 aufgeführten Stämme, können mit der Effizienz der genetisch veränderten *E. coli*-Stämme kaum mithalten. Auch industriell werden wie durch die Firmen BioAmber oder Myriant gentechnisch optimierte *E. coli*-Stämme zur Succinat-Produktion verwendet (Nghiem et al., 2017). Dazu zählt beispielsweise der von Myriant verwendete *E. coli*-Stamm TG400 ( $\Delta galP$ ) mit einer Mutation im Galaktose-Symporter (*galP*), die die Aktivität des PEP-abhängigen Phosphotransferase-Systems verringert und dadurch die gleichzeitige Verwendung von C5- und C6-Zuckern zur Succinat-Produktion ermöglicht. Dieser gentechnisch manipulierte Stamm produziert 96 g/l Succinat mit einem Ertrag von 0,96 g Succinat pro g Glukose/Xylose (Grabar et al., 2018; Tab. 15). Im Vergleich dazu bildet der *E. coli*-Stamm SD121, der das Gen der PEP-Carboxykinase überexprimiert und die Gene der Pyruvat-Formiat-Lyase und der Lactat-Dehydrogenase deletiert hat, 116,2 g/l Succinat mit einer Ausbeute von 1,13 g Succinat pro g Glukose (Wang et al., 2011b; Tab. 15).

Zu der Aufstellung der Succinat-Produzenten (Tab. 15) musste aber grundsätzlich angemerkt werden, dass generell zwar hohe Succinat-Ausbeuten und Succinat-Titer erzielt werden konnten, die trotz Gendeletionen allgegenwärtige Nebenprodukt-Bildung dennoch für eine ineffiziente Succinat-Produktion sorgt. Dadurch erscheint der industrielle Einsatz dieser Produktionsstämmen im Vergleich zur klassischen petrochemischen Succinat-Produktion wirtschaftlich nicht anwendbar. Zusätzlich tritt bei hohen Substratkonzentrationen während der exponentiellen Wachstumsphase häufig das Phänomen des sogenannten *overflow metabolism* auf (Szenk et al., 2017). Dies konnte beispielsweise

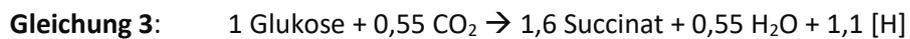
für *E. coli* nachgewiesen werden, wobei der Organismus zur Energiegewinnung vermehrt Gärung betreibt und dadurch Stoffwechsel-Intermediate enorm akkumulieren. Folglich wird darüber zusätzlich der Succinat-Ertrag minimiert und die Produkt-Aufreinigung erschwert (Basan et al., 2015). Grundsätzlich wird aber über den Vergleich mit den oben beschriebenen effizientesten Succinat-Produzenten deutlich, dass wenn *P. vulgatus* wettbewerbsfähig Succinat produzieren soll, der Metabolismus des Organismus bezüglich der Succinat-Bildung genetisch modifiziert werden muss. Generell sollte über die genetische Veränderung nicht nur die Succinat-Bildung von *P. vulgatus* erhöht, sondern auch die anderen Stoffwechselendprodukte (Acetat, Formiat, Lactat und Propionat) verringert werden, um die Reinheit von Succinat zu steigern. Letztlich entsprach dies dem Ziel einer Homosuccinat-Fermentation, also der Umsetzung des Substrates mit einem einzigen Stoffwechselendprodukt, nämlich Succinat. In Bezug zur industriellen Succinat-Produktion wäre ein Produktionsstamm mit Homosuccinat-Fermentation beispiellos, da bisher bei jeglichen Succinat-Produzenten eine Nebenproduktbildung nur vermindert, aber nicht unterbunden werden konnte. Derzeit existiert kein Succinat-Produktionsstamm, der nur Succinat ohne Nebenprodukte, bilden kann. Grundsätzlich beträgt der bisher kleinste erreichte Anteil der Nebenprodukte am gesamten Produktspektrum immerhin noch 10 % (Litsanov et al., 2012).

Generell stellte sich die Frage, was die Umstellung der regulären Fermentation zur Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* bedeuten würde. Natürlicherweise produziert *P. vulgatus* in gleicher Menge Succinat und Acetat als Hauptstoffwechselendprodukte (vgl. Gleichung 2). Die Bildung von Acetat aus Pyruvat führt zwar zu zusätzlichen [H], die in der Umwandlung von Oxalacetat zu Succinat im reduktiven Citratzyklus Verwendung finden, dennoch sorgt dies aber auch zum Verlust von Kohlenstoff, der nicht in die Succinat-Produktion fließen kann. Außerdem erschwert die vergleichend hohe Menge an Acetat die Produktaufreinigung von Succinat zusätzlich. Wenn der Anteil an Acetat minimiert wird, muss folgerichtig der Bedarf an [H] für Biomasse- und Succinat-Bildung anderweitig generiert werden. Zu beachten war aber dennoch, dass der Syntheseweg der Acetat-Bildung wie beispielsweise die Acetatkinase, nicht aus dem Stoffwechselschema über entsprechende Gendelektionen entfernt werden kann, da der oxidative Citratzyklus aufgrund der SCACT Acetat-abhängig ist (Abb. 30). Maßgebend für die Homosuccinat-Fermentation wäre die Nutzung des natürlicherweise anabolen oxidativen Citratzyklus für die katabole Produktion von Succinat. Dementsprechend würden die im oxidativen Abschnitt des Citratzyklus gebildeten Reduktionsmittel und das freiwerdende CO<sub>2</sub> für die Produktion des über den reduktiven Citratzyklus gebildeten Succinats verwendet. Der oxidative Citratzyklus würde innerhalb der Homosuccinat-Fermentation vergleichend zur natürlichen Fermentation einen deutlich höheren Anteil zur Succinat-Bildung beitragen. Da nunmehr die [H] aus dem oxidativen Teil des Citratzyklus für den katabolen Abbau von Glukose über

den reduktiven Citratzyklus verwendet würden, könnte die Acetat-Menge deutlich reduziert werden. Innerhalb der Homosuccinat-Fermentation wäre der [H]-Bedarf für die Bildung von 1 g TG zur natürlichen Fermentation (vgl. Abb. 45) identisch. Demnach würden auch hier 6,95 mmol Glucose für die Produktion von 1 g TG benötigt. Um den Reduktionsgrad der Zelle (vgl. Gleichung 1) anzugleichen, müssten auch in der Homosuccinat-Fermentation 34,64 mmol [H] katabol gebildet werden. Bezogen auf diesen errechneten [H]-Bedarf konnte ein theoretisches Kohlenstoffflussdiagramm der Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* aufgestellt werden (Abb. 46). In dem Schema des Kohlenstoffflusses wurden die Synthese-Wege für Formiat (Pyruvat-Formiat-Lyase), Lactat (Lactat-Dehydrogenase) und Propionat nicht mit einbezogen, da die Beiprodukt-Bildung innerhalb der Homosuccinat-Fermentation minimiert bzw. verhindert werden sollte. Die verschiedenen Ideen zu Gendelektionen werden in Kapitel 4.5.2 beschrieben. Generell fiel auf, dass im Vergleich zur regulären Fermentation durch die Verschiebung der Verhältnisse, weniger ATP pro Glukose Molekül gebildet würden und demnach mehr Glukose für die gleiche Bildung an Trockenbiomasse katabol abgebaut werden müsste. Theoretisch würde *P. vulgatus* über die Homosuccinat-Gärung 2,9 Mol ATP pro Glukose Molekül bilden. Im Detail würde jeweils 0,4 Mol ATP über die Reaktionen der Pyruvatkinase und der Acetatkinase erzeugt. Die Carboxylierung von PEP mithilfe der PEP-Carboxykinase würde zu 1,6 Mol ATP führen und da pro reduziertem Molekül Fumarat 0,4 Mol ATP gebildet werden (Bernhard & Gottschalk, 1978), würden aus 1 Mol Glukose 0,5 Mol ATP über die Fumarat-Atmung erzeugt. Wie zuvor erläutert werden für 1 g TG 93,5 mmol ATP benötigt, somit konnte berechnet werden, da 2,9 Mol ATP pro Mol Glukose in der Homosuccinat-Fermentation gebildet würden, dass 32,2 mmol Glukose für Bildung von 1 g TG katabol verstoffwechselt werden müssten. Zusammenfassend würden ~ 82 % der Glukose über katabole Stoffwechselwege zu Succinat und ~ 18 % der Glukose für das Zellwachstum eingesetzt (Abb. 46). Aus 39,15 mmol Glukose pro g TG und 17,6 mmol CO<sub>2</sub>/g TG könnten über die Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* 52,7 mmol Succinat/g TG und 21 mmol [H]/g TG gebildet werden. Also könnte *P. vulgatus* theoretisch pro g TG maximal 52,7 mmol Succinat produzieren, was im Vergleich zur regulären Fermentation eine Steigerung der Succinat-Menge um 60 % darstellt.



über die Kopplung von oxidativem und reduktivem Citratzyklus 52,7 mmol Succinat/g TG gebildet werden, wobei die Berechnungen die Fermentationsgleichung 3 ergaben.



Vergleichend zur regulären Fermentationsgleichung (vgl. Gleichung 2) war auffällig, dass aus der gleichen Menge Glukose 60 % mehr Succinat gebildet werden könnte. Hinzu kam wie der Begriff „Homosuccinat“ bereits verrät, dass Succinat als einziges Endprodukt gebildet würde, somit kein Acetat und auch kein Formiat entstehen. Um den aufgestellten Fluss der Intermediate (Abb. 46) innerhalb der Homosuccinat-Fermentation zu bestätigen, musste zusätzlich die Redoxbilanz des Modells geprüft werden. Im Zuge der Homosuccinat-Fermentation wurden 199 mmol [H]/g TG (aus NADH und  $\text{Fd}_{\text{red}}$ ) gebildet, wobei davon 164 mmol [H]/g TG durch die Reduktion von Oxalacetat und Fumarat wieder verbraucht würden. Zuvor wurde berechnet, dass für die Umwandlung von Glukose in Biomasse 43,4 mmol [H]/g TG für die Entfernung von 21,7 mmol [O]/g TG nötig sind (vgl. reguläre Fermentation; Abb. 45). Über die katabole Succinat-Bildung würden bereits 35 mmol [H]/g TG zur Verfügung gestellt, wobei 8,76 mmol [H]/g TG als Überschuss aus dem Aufbau von Biomasse hinzu kämen. Der Bedarf an [H] für den Anabolismus wären daher zu 100 % abgedeckt. Es kann zusammenfassend angemerkt werden, dass in der Theorie durch die Umstellung zur Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* deutlich mehr Succinat (60 % mehr) gebildet würde und zusätzlich die Nebenproduktbildung vollständig unterbunden werden könnte. Dies wäre möglich indem der oxidative und reduktive Abschnitt des Citratzyklus miteinander gekoppelt würden, sodass der [H]-Bedarf der Succinat- und Biomasse-Bildung abgesichert wäre (Abb. 46).

In dieser Arbeit wurden grundlegende Untersuchungen bezüglich einer Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation durchgeführt. Dabei sollte analysiert werden, ob das theoretische Modell der Homosuccinat-Fermentation (Abb. 46) in *P. vulgatus* verwirklicht werden könnte. Zunächst musste überprüft werden, ob die Gene des oxidativen und reduktiven Citratzyklus vorhanden waren und exprimiert wurden und ob die entsprechenden Enzyme in aufgereinigter Form die vorhergesagte Reaktion katalysieren. Zusätzlich war es für die Realisierbarkeit der Kopplung von oxidativem und reduktivem Citratzyklus wichtig, sowohl das Zusammenspiel der gereinigten Enzyme als auch auf zellulärer Ebene über cytoplasmatische Messungen zu überprüfen.

#### 4.6 Der „Flaschenhals“ der Succinat-Bildung in *P. vulgatus*

Wie zuvor beschrieben bildet der Organismus *P. vulgatus* im Zuge des oxidativen und reduktiven Citratzyklus Succinat als Stoffwechselendprodukt und gibt dieses in das umliegende Medium ab. *P.*

*vulgatus* betreibt Fumarat-Atmung und besitzt keinen geschlossenen Citratzyklus, weshalb bei ausreichender CO<sub>2</sub>-Konzentration Succinat akkumuliert. Beide Abschnitte des Citratzyklus münden zwar in der Bildung von Succinat, die zellulär relevante Succinat-Produktion basiert aber hauptsächlich auf dem reduktiven Teil. Eine besondere Reaktion des oxidativen Citratzyklus in *P. vulgatus* ist die Umwandlung von Succinyl-CoA zu Succinat durch eine SCACT anstelle einer Succinyl-CoA-Synthetase, wobei üblicherweise die Spaltungsenergie von Succinyl-CoA zur Bildung von ATP genutzt wird. In der durch die SCACT katalysierten Reaktion wird CoA von Succinyl-CoA auf ein Acetat-Molekül übertragen, wodurch Acetyl-CoA und Succinat entsteht. Auch in dem Essigsäurebakterium *Acetobacter aceti* konnte die untypische SCACT identifiziert werden, wobei angenommen wird, dass das Enzym die Toleranz gegenüber hohen Acetat-Mengen vermittelt (Mullins et al., 2008). Über die Verwendung der SCACT wird nicht nur die katalytische Aktivität der Succinyl-CoA-Synthetase kompensiert, sondern akkumuliertes Acetat wird ohne einen Phosphorylierungsschritt zu Acetyl-CoA umgeformt und so die Konzentration dieser schwachen Säure vermindert (Mullins et al., 2008). Auch für die Homosuccinat-Fermentation ist die Aktivität der SCACT entscheidend, da das gebildete Acetat so in den oxidativen Citratzyklus eingespeist wird und nicht als Nebenprodukt vorliegt (Abb. 46). In verschiedenen anderen Organismen konnte das Gen der SCACT nachgewiesen werden, dazu zählen beispielsweise einige Arten der  $\delta$ -Proteobacteria, *Kingella* spp., *Neisseria* spp., *Acetobacter* spp. und auch *Bacteroides* spp. (Kwong et al., 2017). Diese Arten, so auch *P. vulgatus*, haben eine Acetat-reichen Lebensraum wie beispielsweise dem Darm von Mensch und Tier gemeinsam, weshalb angenommen wird, dass der SCACT-abhängige Citratzyklus eine Nischenspezialisierung auf hohe Acetat-Mengen widerspiegelt (Kwong et al., 2017).

Somit bildet *P. vulgatus* natürlicherweise Succinat über den reduktiven Abschnitt des Citratzyklus durch die Umwandlung von Oxalacetat über Malat und Fumarat. Succinat wird auch über die Umformung von Oxalacetat und Acetyl-CoA über Citrat, Isocitrat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Succinyl-CoA im oxidativen Teil des Citratzyklus gebildet, da dieser Abschnitt aber dem Anabolismus der Zelle zugeordnet werden kann, ist der Anteil des gebildeten Succinats gering. Der oxidative Citratzyklus dient vornehmlich zur Bildung von Intermediaten und Reduktionsäquivalenten für Biosynthesen. Der Bedarf an [H] der Biomasse- und Succinat-Produktion, wird im regulären Stoffwechsel aus der katabolen Umsetzung von PEP über Pyruvat zu Acetat generiert. Aufgrund dessen bildet *P. vulgatus* als Nebenprodukte Acetat und Formiat. Für die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* müssen demnach die gebildeten [H] aus dem oxidativen Teil des Citratzyklus für die katabole Bildung von Succinat im reduktiven Citratzyklus eingesetzt werden.

Um zu untersuchen, ob eine Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* möglich wäre, wurden zunächst bioinformatischen Analysen durchgeführt. Es konnten alle notwendigen Gene des nicht-geschlossenen Citratzyklus im Genom von *P. vulgatus* identifiziert werden. Das aufgestellte Stoffwechselschema (Abb. 30) wurde anschließend experimentell überprüft. Zunächst wurde dazu die RNA der Gene des nicht-geschlossenen Citratzyklus und der relevanten Membrankomplexe quantitativ nachgewiesen. Damit wurde verifiziert, dass die Gene des postulierten Stoffwechselwegs exprimiert werden und die Kopplung des oxidativen und reduktiven Abschnitts auf RNA-Ebene möglich wäre (3.2.2). Um die funktionale Aktivität der Kopplung des nicht-geschlossenen Citratzyklus zu bestätigen, wurden Messungen auf Proteinebene durchgeführt. Dazu wurden als erstes die Einzelaktivitäten der gereinigten Enzyme des oxidativen und reduktiven Abschnitts untersucht. Alle zugewiesenen Aktivitäten der Proteine konnten über Enzymmessungen bestätigt werden und somit wurde der postulierte Stoffwechselweg (Abb. 30) in seinen Einzelreaktionen auf enzymatischer Ebene verifiziert (3.2.3). Anschließend musste überprüft werden, ob die Aktivitäten der Enzyme des oxidativen und des reduktiven Abschnittes des Citratzyklus gekoppelt werden können. Wie zuvor beschrieben, wäre es für die Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation notwendig, dass der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Produktion über den oxidativen Teil des Citratzyklus ausgeglichen wird. Das neuartige Modell einer Homosuccinat-Fermentation konnte über die Detektion von Succinat experimentell bekräftigt werden (3.2.4). Dem Organismus *P. vulgatus* wäre es über die Kopplung von oxidativem und reduktivem Citratzyklus somit möglich, aus Glukose lediglich Succinat ohne Nebenprodukte zu bilden. Es konnte daher gezeigt werden, dass der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Bildung (reduktiver Citratzyklus) über die Kopplung mit dem oxidativen Teil des Citratzyklus gedeckt werden kann und die [H] nicht mehr über andere glykolytische Prozesse bezogen werden müssen. Für die Anwendung von *P. vulgatus* als Succinat-Produktionsstamm waren außerdem Aktivitätsmessungen der Enzyme des nicht-geschlossenen Citratzyklus im Cytoplasma ausschlaggebend. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Enzyme des nicht-geschlossenen Citratzyklus ebenfalls zellulär vorhanden und aktiv waren. Dadurch wurde die Realisierbarkeit der Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* auch in lebenden Zellen aufgezeigt. Da der oxidative Abschnitt des nicht-geschlossenen Citratzyklus anabole Charakteristiken aufweist, wurden dementsprechend in den Messungen im Vergleich zu dem reduktiven Abschnitt geringe Enzymaktivitäten im Cytoplasma bestimmt (3.2.5). Die Enzymaktivitäten bewegten sich im Vergleich zu den Enzymen des reduktiven Abschnitts ( $\sim 1\text{-}3$  U/mg Protein im Cytoplasma) des Citratzyklus in sehr niedrigen Aktivitätsbereichen ( $\sim 4\text{-}59$  mU/mg Protein im Cytoplasma). Vor allem waren die cytoplasmatischen Aktivitäten der Aconitase ( $4 \pm 2$  mU/mg) und der Isocitrat-Dehydrogenase ( $15 \pm 2$  mU/mg) sehr gering. Für eine künftige Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation müssten daher die Enzymaktivitäten des oxidativen Teil gesteigert werden, damit die [H]-Versorgung gewährleistet ist und Succinat gebildet werden kann. Im folgenden Abschnitt werden

deshalb Strategien zur genetischen Veränderung des Organismus diskutiert, um die Produktion von Succinat und vor allem in Bezug auf die ausreichende Bereitstellung von [H] durch den oxidativen Citratzyklus zu sichern.

#### **4.7 Strategien zur Optimierung der Succinat-Produktion in *P. vulgaris* durch „metabolic engineering“ für das Konzept der Homosuccinat-Fermentation**

In den vorherigen Abschnitten wurde deutlich, dass für eine Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation einige genomische Anpassungen in *P. vulgaris* durchgeführt werden müssen. Dazu gehört vor allem die Verstärkung des oxidativen Abschnitts des Citratzyklus und die Unterbindung von Stoffwechselwegen, die zur Nebenproduktbildung führen.

Industriell werden in der Regel Produzenten eingesetzt, die Succinat bereits natürlicherweise in hohen Mengen bilden und deren Succinat-Ausbeuten zusätzlich über Prozessoptimierungen erhöht werden können. Allerdings werden Wild-Typ-Stämme häufig durch gentechnisch veränderte Organismen (GVO) ersetzt, da diese aufgrund ihrer effizienten Succinat-Produktion mit Ausbeuten über 1 g Succinat pro g Substrat und Produkt-Titern von über 85 g/l nicht von natürliche Produzenten übertroffen werden können (4.5; Tab. 15). Dennoch können auch diese effizienten Produktionsstämme die petrochemische Succinat-Produktion derzeit nicht ersetzen, da die unerwünschte aber allgegenwärtige Nebenproduktbildung den industriellen Einsatz unwirtschaftlich macht.

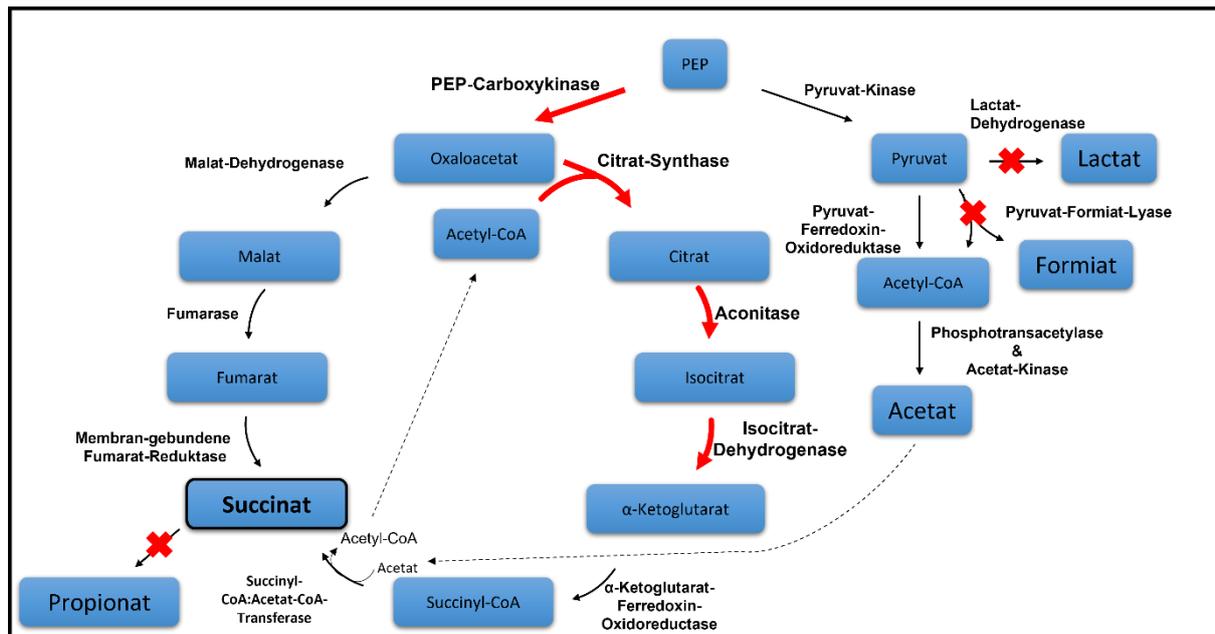
Damit *P. vulgaris* trotzdem industriell als Succinat-Produzent wettbewerbsfähig eingesetzt werden kann, sind einige metabolische Anpassungen zur Ertragsmaximierung notwendig. Generell wird bei der genetischen Veränderung versucht den Succinat-Ertrag zu erhöhen, indem der Kohlenstofffluss in Richtung Succinat-Bildung verschoben wird. Dadurch wird nicht nur die Ausbeute an Succinat gesteigert, da konkurrierende Stoffwechselwege minimiert werden, sondern die Konzentration an Nebenprodukten wird ebenfalls verringert, was die Aufreinigung des Succinats erleichtert. Wie zuvor beschrieben, bildet keiner der industriell eingesetzten Succinat-Produktionsstämme reines Succinat. Es liegt immer ein Gemisch an Stoffwechselendprodukten vor. Für die Steigerung der Produktionseffizienz wäre natürlich ein Organismus mit sogenannter Homosuccinat-Fermentation lohnend, weshalb in dieser Arbeit erste Untersuchungen für die Umsetzung in *P. vulgaris* durchgeführt wurden.

Für die Manipulation des Zentralstoffwechsels von *P. vulgaris* muss der Organismus generell genetisch zugänglich sein, also das Einbringen von rekombinante DNA in die Zelle und das Deletieren chromosomaler Gene muss ermöglicht werden. Erste Ergebnisse erlaubten bereits das Einbringen eines homologen Gens über einen *shuttle vector* und einen in das Chromosom integrierenden Vektor (Lück & Deppenmeier, 2022). Über das Einbringen des homologen Lactat-Dehydrogenase-Gens konnte die Lactat-Dehydrogenase Aktivität und auch die Lactat-Ausbeute deutlich gesteigert werden. Über den Einsatz dieser genetischen Werkzeuge ist somit die Manipulation des Zentralstoffwechsels in Bezug auf die Verschiebung der Produktbildung möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten auf, dass die Enzyme des oxidativen Citratzyklus aufgrund von vergleichend geringen zellulären Aktivitäten potentiell limitierend auf die Bildung von Succinat innerhalb der Homosuccinat-Fermentation wirken könnten. Da der oxidative Citratzyklus regulär anabole Eigenschaften aufweist wie z.B. auch geringe zelluläre Enzymaktivitäten, wäre es für die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgaris* von Bedeutung die Aktivität des oxidativen Zweigs zu verstärken. Dadurch könnte die [H]-Versorgung für die Bildung von Succinat und Biomasse gewährleistet werden. Im Vergleich wiesen die Enzyme des reduktiven Abschnitts des Citratzyklus eine ungefähr 100-250-fach höhere Aktivität auf. Für die Anpassung des oxidativen Zweigs an die vergleichend hohen Enzymaktivitäten des reduktiven Abschnitts des Citratzyklus, sollten die Gene des oxidativen Citratzyklus in *P. vulgaris* überexprimiert werden (Abb. 47). Dadurch würde aufgrund höherer Transkriptmenge und darauf basierender Proteinsynthese auch eine höhere Enzymaktivität resultieren. Letztlich könnte dadurch der regulär anabole oxidative Citratzyklus auf die katabole Aktivitätsebene des reduktiven Citratzyklus angeglichen werden. Da der [H]-Bedarf der Succinat-Bildung durch die Verstärkung des oxidativen Citratzyklus ausreichend gedeckt wäre, sollte die Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgaris* ablaufen können und für eine deutliche Steigerung von 60 % der Succinat-Ausbeute sorgen (vgl. Gleichung 3). Für die Überexpression der Gene des oxidativen Citratzyklus, kämen vor allem die Gene der Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase in Frage, da die entsprechenden Enzyme vergleichend die geringsten Enzymaktivitäten aufwiesen (Abb. 42).

In *E. coli* führte interessanterweise eine veränderte Citrat-Synthase mit geringerer enzymatischer Aktivität zu einem höheren Acetat-Ertrag, da aufgrund niedriger Citrat-Synthase-Aktivität die Konkurrenz um das Substrat Acetyl-CoA verringert wurde und mehr Acetyl-CoA für die Bildung von Acetat vorhanden war (Tovilla-Coutino et al., 2020). Da die Citrat-Synthase den Acetyl-CoA-Fluss des Citratzyklus kontrolliert (Weitzman und Jones, 1968), könnte möglicherweise deshalb durch die Überexpression des entsprechenden Gens in *P. vulgaris*, die Enzymaktivität intrazellulär erhöht werden. Dadurch würde mehr Acetyl-CoA in den Citratzyklus einfließen, wodurch letztendlich mehr

Succinat gebildet werden könnte (Abb. 47). Da die Aktivität der Citrat-Synthase im Cytoplasma von *P. vulgatus* ( $47 \pm 6$  mU/mg) vergleichend gering war, wurde das Anwendungspotential einer Überexpression des entsprechenden Gens und die daraus resultierende Aktivitätssteigerung der Citrat-Synthase bestätigt. Außerdem wird die Annahme dadurch untermauert, dass in *Corynebacterium glutamicum* durch die Überexpression des Citrat-Synthase-Gens die Succinat-Ausbeute um 22 % gesteigert werden konnte (Zhu et al., 2013).



**Abbildung 47:** Schema des zentralen Stoffwechselwegs von *P. vulgatus* beginnend von PEP mit Strategien zur genetischen Veränderungen für die Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation. Rote Pfeile geben Überexpressionsziele an. Rote Kreuze zeigen Deletionsziele an. PEP= Phosphoenolpyruvat. CoA= Coenzym-A.

Neben der für die Homosuccinat-Fermentation essentiellen Überexpression der Gene des oxidativen Citratzyklus (Abb. 47), könnte auch die Expression anderer Gene des zentralen Stoffwechselwegs in *P. vulgatus* zur einer Erhöhung der Succinat-Ausbeute führen. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte PEP-Carboxylierungseffizienz der entscheidende Faktor für eine hohe Succinat-Produktion darstellt (Dai et al., 2020). Über die Verstärkung der PEP-Carboxykinase-Aktivität wird der Kohlenstofffluss vermehrt in Richtung der Bildung von Oxalacetat und somit auch zur Produktion von Succinat über den Citratzyklus verschoben (Abb. 47). Beispielsweise führt die Überexpression des PEP-Carboxykinase-Gens in *E. coli* zur einer 6,5-fachen Steigerung der Succinat-Produktion (Kim et al., 2004). Daneben führt oftmals die Überexpression der Gene des reduktiven Citratzyklus wie die Malat-Dehydrogenase oder Fumarase ebenfalls zu einer erhöhten Succinat-Ausbeute. In *A. succinogenes* wurde über die Überexpression des Gens der Malat-Dehydrogenase der Succinat-Ertrag um 12,5 % und über die Überexpression des Fumarase-Gens um 6 % gesteigert (Guarnieri et al., 2017). Neben der Aktivitätserhöhung des reduktiven Zweigs des Citratzyklus durch entsprechende Gen-Überexpression,

werden wie zuvor beschrieben häufig Synthesewege von Nebenprodukten deletiert, um den Kohlenstoff-Fluss in Richtung Succinat zu lenken und die Reinheit des Produkts zu erhöhen (Abb. 47).

Für die Durchführung einer Homosuccinat-Fermentation waren neben Gen-Überexpressionen, auch die Deletion einiger Gene essentiell. Sinnvolle Eingriffe für *P. vulgatus* wären die Deletionen der Gene der Pyruvat-Formiat-Lyase und der Lactat-Dehydrogenase. Über die Pyruvat-Formiat-Lyase werden über die Umformung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Formiat keine Reduktionsäquivalente erzeugt, weshalb die Reaktion im Vergleich zur Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase bei einem Überschuss von Reduktionsäquivalenten abläuft (Franke, 2020). Die Deletion hätte somit keinen negativen Einfluss auf den Redoxhaushalt und könnte in *P. vulgatus* vermutlich unproblematisch durchgeführt werden. Das Gen der Lactat-Dehydrogenase sollte ebenfalls deletiert werden, da über die Reduktion von Pyruvat zu Lactat Reduktionsäquivalente in Form von NADH verbraucht werden und somit nicht für die Bildung von Succinat zur Verfügung stehen. Ohne die Pyruvat-Formiat-Lyase und Lactat-Dehydrogenase würde der Organismus *P. vulgatus* kein Formiat und Lactat bilden, die Menge an Acetat würde ebenfalls reduziert und es lägen mehr Reduktionsäquivalente für die Succinat-Bildung vor. Damit *P. vulgatus* Succinat nicht weiter zu Propionat verstoffwechselt, wäre die Deletion des Propionat-Stoffwechsels ebenfalls sinnvoll, auch wenn die Propionat-Menge durch eine ausreichende CO<sub>2</sub>-Konzentration gering gehalten werden kann. Grundsätzlich könnte für die Umsetzung einer Homosuccinat-Fermentation angenommen werden, dass jegliche Synthesewege der Acetat-Bildung, also neben der Formiat-Pyruvat-Lyase z.B. auch die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase, in *P. vulgatus* entfernt werden müssten. Wie bereits verdeutlicht, ist die Homosuccinat-Fermentation aufgrund des oxidativen Citratzyklus aber Acetat-abhängig, weshalb die Deletion des Gens der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase nicht in Betracht gezogen werden kann (Abb. 46). Zumal durch die Deletion ebenfalls wichtige [H] nicht zur Verfügung ständen und pro Acetyl-CoA-Molekül ein Mol ATP fehlen würde.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *P. vulgatus* zur industriellen Succinat-Produktion vermutlich gut geeignet ist, da zum Teil bereits natürlicherweise wichtige Eigenschaften zur Succinat-Bildung vorhanden sind. Im Sinne einer umweltfreundlichen Succinat-Produktion verstoffwechselt *P. vulgatus* natürlicherweise eine Vielzahl an nachwachsenden Rohstoffen über den reduktiven Citratzyklus zu Succinat. Weitere Endprodukte sind Acetat, Formiat, Lactat, und Propionat, die generell über den EMP-Weg und der Umformung von Pyruvat und Succinat gebildet werden. Die Umformung von Succinat zu Propionat kann vermutlich über eine ausreichenden CO<sub>2</sub>-Menge minimiert werden. Über genetische Modifikationen ließe sich die Bildung von Succinat verstärken und die Produktion weiterer Stoffwechselendprodukte verhindern. Für den Wechsel von *P. vulgatus* zur Homosuccinat-Fermentation sind zusätzliche [H] nötig, die aus dem regulär anabolen oxidativen Citratzyklus bezogen

werden sollen. Deshalb ist die Überexpressionen der Gene des oxidativen Citratzyklus notwendig, um den [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Bildung zu decken. Zusätzlich erschien die Überexpression des PEP-Carboxykinase-Gens wichtig, damit der Kohlenstofffluss in Richtung Oxalacetat und schließlich Succinat verschoben werden kann. Die Gen-Deletionen der Pyruvat-Formiat-Lyase und der Lactat-Dehydrogenase wären ebenfalls für die Redoxbilanz der Homosuccinat-Fermentation entscheidend, da so jegliche [H] in die Succinat-Produktion fließen können. Zusätzlich sollten die Gene des Propionat-Stoffwechselwegs deletiert werden, um bei potentielltem CO<sub>2</sub>-Mangel den Abbau von Succinat zu verhindern. Die Homosuccinat-Fermentation vermittelt durch *P. vulgatus* wäre eine neuartiges und zugleich das effizienteste Verfahren zur anaeroben Succinat-Herstellung. *P. vulgatus* mit Homosuccinat-Fermentation wäre der erste Succinat-Produktionsstamm, der aus 1 Mol Glukose und 0,55 Mol CO<sub>2</sub> 1,6 Mol Succinat ohne jegliche Nebenprodukte bilden könnte. So würde nicht nur reines Succinat gebildet, sondern gleichzeitig CO<sub>2</sub> klimaeffizient verbraucht.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Pentose-Metabolismus des bedeutsamen Darmbakteriums *Prevotella copri* (*P. copri*) untersucht, zum anderen wurde überprüft, ob die Umsetzung der sogenannten Homosuccinat-Fermentation mit dem wichtigen Darmbakterium *Phocaeicola vulgatus* (*P. vulgatus*) möglich ist.

Eine als gesund geltende ballaststoffreiche Ernährung fördert das Wachstum von bestimmten Bakterien im humanen Dickdarm. Insbesondere wird durch die Einnahme von Xylanen das Darmbakterium *P. copri* akkumuliert. In dieser Arbeit wurden deshalb detaillierte Untersuchungen von *P. copri* bezogen auf die Verstoffwechslung der Ballaststoffe, insbesondere Xylane, auf Ebene der monomeren Einheiten (Pentosen) durchgeführt.

- (1) Durch Wachstumsversuche konnte aufgezeigt werden, dass *P. copri* sowohl D-Xylose als auch Ballaststoffe (Xylan aus Hafer, Arabinoxylan aus Weizen und Xyloglucan aus Tamarinden), deren Grundbausteine Pentosen darstellen, als Wachstumssubstrate nutzen kann.
- (2) Über bioinformatische, transkriptionelle und enzymatische Analysen wurde ein Stoffwechselschema zur Verstoffwechslung von Pentosen für den Organismus *P. copri* erstellt. Da *P. copri* eines der zentralen Enzyme (Transaldolase) des klassischen Pentosephosphatwegs (PPP) fehlt, konnte festgestellt werden, dass das Bakterium Pentosen über einen alternativen Weg den sogenannten Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat-Weg (SBPP) verstoffwechselt. Dabei weicht der SBPP zum PPP insofern ab, dass die fehlende Transaldolase-Reaktion durch die Kombination der reversiblen Reaktionen der PPI-abhängigen Phosphofruktokinase (PPI-PFK) und der Fruktose-Bisphosphat (FBP)-Aldolase ersetzt wird. Das Produkt der Transketolase-Reaktion Sedoheptulose-7-Phosphat (S7P) wird durch die PPI-PFK zu SBP phosphoryliert und SBP anschließend durch die FBP-Aldolase zu Erythrose-4-Phosphat (E4P) und Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP) gespalten.
- (3) *P. copri* besitzt zwei PFKs, wobei die eine ATP- und die andere PPI-abhängig ist. Um die zelluläre Funktion beider PFKs zu identifizieren wurden die Proteine enzymatisch bezogen auf die Phosphorylierungseigenschaften für Fruktose-6-Phosphat (F6P) und S7P untersucht. Der PPI-PFK konnte aufgrund der im Vergleich zur ATP-PFK 370-fach höheren spezifischen Aktivität und 600-fach höheren katalytischen Effizienz für die Phosphorylierung von S7P, die Funktion innerhalb des SBPPs zugeordnet werden. Hinzu kam, dass nur durch die PPI-PFK die notwendige Reversibilität des Pentose-Stoffwechsels gewährleistet war und die Funktion der ATP-PFK im SBPP deshalb ausgeschlossen werden konnte. Aufgrund der enzymatischen Charakteristik der PPI-PFK in Bezug auf die Phosphorylierung von F6P im Embden-Meyerhof-Parnas (EMP)-Weg, wurde auch hier die katalytische Funktion der PPI-PFK zugewiesen. Im Vergleich zur ATP-PFK waren die Affinität 3-fach, die spezifische Aktivität 30-fach und die katalytische Effizienz 50-fach höher.
- (4) Anhand einer breitgefassten bioinformatischen Analyse wurde über die Kombination einer fehlenden Transaldolase und vorhandener PPI-PFK die Wichtigkeit des SBPPs verdeutlicht.

Neben *P. copri* wenden viele weitere Darmbakterien den SBPP für den Pentose-Metabolismus an. Dazu zählen unter anderem Vertreter der Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobakterien, Verrucomicrobia und Lentisphaerae wie beispielsweise die potentiell probiotischen Darmbakterien *Akkermansia muciniphila* und *Faecalibacterium prausnitzii*.

Damit ein Umstieg der traditionell petrochemischen Produktion der Bulk-Chemikalie Succinat auf einen bakterielle Herstellungsprozess erfolgen kann, muss die biotechnologische Succinat-Produktion deutlich effizienter werden. Insbesondere sorgt die bisher unausweichliche Nebenproduktbildung für hohe Produktionskosten und erschwert somit die Konkurrenzfähigkeit der biotechnologischen Succinat-Produktion. In dieser Arbeit wurde deshalb das Konzept einer Homosuccinat-Fermentation anhand von *P. vulgatus* ausgearbeitet, wobei ein Enzym-System etabliert werden sollte, welches letztendlich aus dem eingesetzten Substrat nur Succinat ohne weitere Endprodukte produziert.

- (1) Für die reduktive Succinat-Produktion innerhalb des Citratzyklus sind in *P. vulgatus* Reduktionsäquivalente [H] nötig, die aus anderen Stoffwechselwegen bezogen werden. Dadurch werden folglich neben Succinat weitere Nebenprodukte (vor allem Acetat) gebildet. Natürlicherweise produziert *P. vulgatus* Acetat in gleicher Menge wie Succinat, um die Redoxbilanz der reduktiven Succinat-Bildung auszugleichen. Fumarat-Atmer wie *P. vulgatus* besitzen keinen geschlossenen Citratzyklus, weshalb der oxidative Abschnitt des Citratzyklus wie auch der reduktive Teil mit der Bildung von Succinat endet. Im Konzept der Homosuccinat-Fermentation sollen künftig die beiden Abschnitte des nicht-geschlossenen Citratzyklus miteinander gekoppelt werden. Der [H]-Bedarf der reduktiven Succinat-Bildung würde über den oxidativen Teil des Citratzyklus abgedeckt und somit wäre die Nebenproduktbildung fortan nicht mehr erforderlich.
- (2) Anhand von bioinformatischen, transkriptionellen und enzymatischen Analysen konnte ein Stoffwechselschema des oxidativen und reduktiven Citratzyklus für den Organismus *P. vulgatus* erstellt werden. Die grundlegenden Einzelreaktionen des nicht-geschlossenen Citratzyklus wurden über die Enzymaktivitäten auf Proteinebene bestätigt.
- (3) Die Kopplung des oxidativen und reduktiven Abschnitts des Citratzyklus konnte mit gereinigten Enzymen und Membranfraktion durch die Bildung des Endproduktes Succinat nachgewiesen werden. Theoretisch wäre es durch die Homosuccinat-Fermentation in *P. vulgatus* möglich, den zellulären Kohlenstofffluss so zu verschieben, dass bis zu 60 % mehr Succinat ohne weitere Endprodukte gebildet werden könnte.
- (4) Über die Aktivitätsmessungen der Enzyme des Citratzyklus in den cytoplasmatischen- und Membran-Fractionen, wurde aufgezeigt, dass die Enzymaktivitäten des oxidativen Abschnittes im Vergleich zum reduktiven Teil bis zu 250-fach niedrigerer waren. Für die Umsetzung der Homosuccinat-Fermentation wäre deshalb die Überexpression der entsprechenden Gene des oxidativen Citratzyklus sinnvoll, um die notwendige [H]-Versorgung der reduktiven Succinat-Bildung zu gewährleisten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Accetto, T., & Avguštin, G. (2015). Polysaccharide utilization locus and CAZYme genome repertoires reveal diverse ecological adaptation of *Prevotella* species. *Systematic and applied microbiology*, 38(7), 453-461.
- Agarwal, L., Isar, J., & Saxena, R. K. (2005). Rapid screening procedures for identification of succinic acid producers. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 63(1), 24–32.
- Ahn, J. H., Jang, Y-S. & Lee, S. Y., (2016). Production of succinic acid by metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Biotechnology*, 42, 54–66.
- Akhtar, M. K., & Jones, P. R. (2008). Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H<sub>2</sub>-accumulation in *Escherichia coli* BL21(DE3). *Applied microbiology and biotechnology*, 78(5), 853–862.
- Amato, A., Becci, A., & Beolchini, F. (2020). Citric acid bioproduction: the technological innovation change. *Critical reviews in biotechnology*, 40 (2), 199–212.
- Amulya, K., & Mohan, S. V. (2019). Fixation of CO<sub>2</sub>, electron donor and redox microenvironment regulate succinic acid production in *Citrobacter amalonaticus*. *The Science of the total environment*, 695, 133838.
- Anon., (2000). AACC Board holds midyear meeting. *Cereal Foods World*, 45, 325.
- 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, 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., Consortium†, M., Weissenbach, J., Ehrlich, S. D. & Bork, P. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473, 174–80.
- Bai, N. J., Pai, M. R., Murthy, P. S., & Venkitasubramanian, T. A. (1982). Fructose-bisphosphate aldolases from mycobacteria. *Methods in enzymology*, 90 Pt E, 241–250.
- Bapteste, E., Moreira, D., & Philippe, H. (2003). Rampant horizontal gene transfer and phospho-donor change in the evolution of the phosphofruktokinase. *Gene*, 318, 185–191.
- Basan, M., Hui, S., Okano, H., Zhang, Z., Shen, Y., Williamson, J. R., & Hwa, T. (2015). Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature*, 528(7580), 99-104.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8(4), 353-368.
- Baughn, A. D., Garforth, S. J., Vilchèze, C., & Jacobs Jr, W. R. (2009). An anaerobic-type  $\alpha$ -ketoglutarate ferredoxin oxidoreductase completes the oxidative tricarboxylic acid cycle of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens*, 5(11), e1000662.
- Beauprez, J. J., De Mey, M., & Soetaert, W. K., (2010). Microbial succinic acid production: Natural versus metabolic engineered producers. *Process Biochemistry*, 45 (7), 1103–1114.
- Bechthold, I., Bretz, K., Kabasci, S., Kopitzky, R., Springer, A., (2008). Succinic Acid: A New Platform Chemical for Biobased Polymers from Renewable Resources, 31 (5), 647–654.

- Becker, J., Reinefeld, J., Stellmacher, R., Schäfer, R., Lange, A., Meyer, H., Lalk, M., Zelder, O., von Abendroth, G., Schröder, H., Haefner, S., & Wittmann, C. (2013). Systems-wide analysis and engineering of metabolic pathway fluxes in bio-succinate producing *Basfia succiniciproducens*. *Biotechnology and bioengineering*, 110 (11), 3013–3023.
- Bera, R. K. (2009). The story of the Cohen–Boyer patents. *Current science*, 96, 760–763.
- Berger, S., Welte, C., & Deppenmeier, U. (2012). Acetate activation in *Methanosaeta thermophila*: characterization of the key enzymes pyrophosphatase and acetyl-CoA synthetase. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 2012, 315153.
- Bernard, N. J. (2014). *Prevotella copri* associated with new-onset untreated RA. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(1), 2–2.
- Bernhard, T. H., & Gottschalk, G. (1978). Cell yields of *Escherichia coli* during anaerobic growth on fumarate and molecular hydrogen. *Archives of Microbiology*, 116(3), 235–238.
- Bielen, A. A., Willquist, K., Engman, J., van der Oost, J., van Niel, E. W., & Kengen, S. W. (2010). Pyrophosphate as a central energy carrier in the hydrogen-producing extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *FEMS microbiology letters*, 307 (1), 48–54.
- Blum, H., Beier, H., & Gross, H. J. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8, 93–99.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254
- Bragg, P. D., & Reeves, R. E. (1962). Pathways of glucose dissimilation in the Laredo strain of *Entamoeba histolytica*. *Experimental parasitology*, 12, 393–400.
- Bräsen, C., Esser, D., Rauch, B., & Siebers, B. (2014). Carbohydrate metabolism in Archaea: current insights into unusual enzymes and pathways and their regulation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78 (1), 89–175.
- Broeker, J., Mechelke, M., Baudrexl, M., Mennerich, D., Hornburg, D., Mann, M., Schwarz, W. H., Liebl, W., & Zverlov, V. V. (2018). The hemicellulose-degrading enzyme system of the thermophilic bacterium *Clostridium stercorarium*: comparative characterisation and addition of new hemicellulolytic glycoside hydrolases. *Biotechnology for biofuels*, 11(1), 1–18.
- Bryant, M.P., Small, N., Bouma, C., & Chu, H. (1958). *Bacteroides ruminicola* n. sp. and *Succinimonas amylolytica*; the new genus and species; species of succinic acid-producing anaerobic bacteria of the bovine rumen. *Journal of Bacteriology*, 76 (1), 15–23
- Caillaud, M., & Paul Quick, W. (2005). New insights into plant transaldolase. *The Plant Journal*, 43(1), 1–16.
- Cani, P. D., & Jordan, B. F. (2018). Gut microbiota-mediated inflammation in obesity: a link with gastrointestinal cancer. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 15(11), 671–682.
- Caspari, D., & Macy, J. M. (1983). The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. *Archives of microbiology*, 135(1), 16–24.
- Centanni, M., Hutchison, J. C., Carnachan, S. M., Daines, A. M., Kelly, W. J., Tannock, G. W., & Sims, I. M. (2017). Differential growth of bowel commensal *Bacteroides* species on plant xylans of differing structural complexity. *Carbohydrate polymers*, 157, 1374–1382.
- Chang, C. J., Lin, T. L., Tsai, Y. L., Wu, T. R., Lai, W. F., Lu, C. C., & Lai, H. C. (2019). Next generation probiotics in disease amelioration. *Journal of food and drug analysis*, 27(3), 615–622.

- 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.
- Chen, Y., Zhou, J., & Wang, L. (2021). Role and mechanism of gut microbiota in human disease. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 86.
- Cheng, M., & Ning, K. (2019). Stereotypes about enterotype: the old and new ideas. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17(1), 4-12.
- Chiba, Y., Kamikawa, R., Nakada-Tsukui, K., Saito-Nakano, Y., & Nozaki, T. (2015). Discovery of PPI-type Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Genes in Eukaryotes and Bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 290 (39), 23960–23970.
- Chu, D.-T., Nguyet, N. T. M., Dinh, T. C., Lien, N. V. T., Nguyen, K.-H., Ngoc, V. T. N., Tao, Y., Son, L. H., Le, D.-H., Nga, V. B., Jurgonski, A., Tran, Q.-H., Tu, P. V., & Pham, V.-H. (2018). An update on physical health and economic consequences of overweight and obesity. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 12(6), 1095–1100.
- Chung, W., Meijerink, M., Zeuner, B., Holck, J., Louis, P., Meyer, A. S., Wells, J. M., Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2017). Prebiotic potential of pectin and pectic oligosaccharides to promote anti-inflammatory commensal bacteria in the human colon. *FEMS microbiology ecology*, 93 (11).
- Chung, W.S.F., Walker, A.W., Louis, P., Parkhill, J., Vermeiren, J., Bosscher, D., Duncan, S. H., & Flint, H. J. (2016). Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biology*, 14, 3.
- Cifuentes, J. O., Comino, N., Trastoy, B., D'Angelo, C., & Guerin, M. E. (2019). Structural basis of glycogen metabolism in bacteria. *Biochemical Journal*, 476 (14), 2059-2092.
- Clark D. P. (1989). The fermentation pathways of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology reviews*, 5(3), 223–234.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., Boyer, H. W., & Helling, R. B. (1973). Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70 (11), 3240-3244.
- Collins, T., Gerday, C., & Feller, G., (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1), 3-23.
- Coyte, K. Z., & Rakoff-Nahoum, S. (2019). Understanding competition and cooperation within the mammalian gut microbiome. *Current Biology*, 29 (11), R538-R544.
- Dahms, A. S. (1974). 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 60(4), 1433-1439.
- Dai, Z., Guo, F., Zhang, S., Zhang, W., Yang, Q., Dong, W., Jiang, M., Jiangfeng, M., & Xin, F. (2020). Bio-based succinic acid: an overview of strain development, substrate utilization, and downstream purification. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 14(5), 965-985.
- De Filippis, F., Esposito, A., & Ercolini, D. (2022). Outlook on next-generation probiotics from the human gut. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(2), 1-18.
- De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., & Mithieux, G. (2016). Microbiota-produced succinate improves glucose homeostasis via intestinal gluconeogenesis. *Cell metabolism*, 24(1), 151-157.
- de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: mechanistic insights. *Gut*, 71(5), 1020–1032.

- Decker, K., Jungermann, K., & Thauer, R. K. (1970). Energy production in anaerobic organisms. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 9 (2), 138–158.
- Dehority, B.A. (1966). Characterization of several bovine rumen bacteria isolated with a xylan medium. *Journal of Bacteriology*, 91 (5), 1724–1729.
- Desvaux, M. (2006). Unravelling carbon metabolism in anaerobic cellulolytic bacteria. *Biotechnology progress*, 22 (5), 1229–1238.
- Dhingra, D., Michael, M., Rajput, H., & Patil, R. T. (2012). Dietary fibre in foods: a review. *Journal of food science and technology*, 49(3), 255–266.
- Dodd, D., Mackie, R. I., & Cann, I. K. (2011). Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. *Molecular microbiology*, 79(2), 292–304.
- Drepper, T., Eggert, T., Hummel, W., Leggewie, C., Pohl, M., Rosenau, F., Wilhelm, S., & Jaeger, K. E. (2006). Novel biocatalysts for white biotechnology. *Biotechnology journal*, 1 (7-8), 777–786.
- Eggerth, A. H., & Gagnon, B. H. (1933). The Bacteroides of Human Feces. *Journal of bacteriology*, 25(4), 389–413.
- Fan, Y., & Pedersen, O. (2021). Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 55–71.
- Fehlner-Peach, H., Magnabosco, C., Raghavan, V., Scher, J. U., Tett, A., Cox, L. M., Gottsegen, C., Watters, A., Wiltshire-Gordon, J. D., Segata, N., Bonneau, R., & Littman, D. R. (2019). Distinct Polysaccharide Utilization Profiles of Human Intestinal *Prevotella copri* Isolates. *Cell host & microbe*, 26(5), 680–690.e5.
- Fischbach, M. A., & Sonnenburg, J. L. (2011). Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell host & microbe*, 10 (4), 336–347.
- Flechner, A., Gross, W., Martin, W. F., & Schnarrenberger, C. (1999). Chloroplast class I and class II aldolases are bifunctional for fructose-1,6-biphosphate and sedoheptulose-1,7-biphosphate cleavage in the Calvin cycle. *FEBS letters*, 447 (2-3), 200–202.
- Flint, H. J., & Duncan, S. H. (2014). *Bacteroides* and *Prevotella*. In: Batt, C. A., & Tortorello, M. L. (Editors). *Encyclopedia of Food Microbiology* (Second Edition). Academic Press; p: 203–208.
- Flint, H. J., Duncan, S. H., & Louis, P. (2017). *The impact of nutrition on intestinal bacterial communities*. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 59–65.
- Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2015). Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proceedings of the Nutrition Society*, 74(1), 13–22.
- Flint, H. J., Scott, K. P., Louis, P., & Duncan, S. H. (2012). The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10), 577–589.
- Franke, T., & Deppenmeier, U. (2018). Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular microbiology*, 109(4), 528–540.
- Franke, T., (2020). Aufklärung des zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus des Darmbakteriums *Prevotella copri*. Dissertation. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.
- Fry, S. C. (1989). The structure and functions of xyloglucan. *Journal of experimental botany*, 40(1), 1–11.
- Fuchs, G., & E. Stupperich. (1980). Acetyl CoA, a central intermediate of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Archives of Microbiology*. 127, 267–272.

- Gänzle, M. G. (2015).** Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117.
- 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.
- Garschagen, L. S., Franke, T. & Deppenmeier, U. (2021).** An alternative pentose phosphate pathway in human gut bacteria for the degradation of C5 sugars in dietary fibers. *The FEBS Journal*, 288(6), 1839-1858.
- 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.
- Gibson, G. R., & Roberfroid, M. B. (1995).** Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *The Journal of nutrition*, 125(6), 1401-1412.
- Grabar, T., Gong, W., & Yocum, R. R. (2018).** *Metabolic evolution of Escherichia coli strains that produce organic acids*. Patent No. 10017793. Myriant Corporation.
- Guarnieri, M. T., Chou, Y. C., Salvachúa, D., Mohagheghi, A., St John, P. C., Peterson, D. J., Bomble, Y. J., & Beckham, G. T. (2017).** Metabolic Engineering of *Actinobacillus succinogenes* Provides Insights into Succinic Acid Biosynthesis. *Applied and environmental microbiology*, 83 (17), e00996-17.
- Guettler, M. V., Jain, M. K., & Rumler, D. (1996).** *Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants*. U.S. Patent No. 5,573,931. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Gunnarsson, I. B., Alvarado-Morales, M., & Angelidaki, I. (2014).** Utilization of CO<sub>2</sub> fixating bacterium *Actinobacillus succinogenes* 130Z for simultaneous biogas upgrading and biosuccinic acid production. *Environmental science & technology*, 48(20), 12464-12468.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*, 166(4), 557-580.
- 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.
- Hempfling, W. P., & Mainzer, S. E. (1975).** Effects of varying the carbon source limiting growth on yield and maintenance characteristics of *Escherichia coli* in continuous culture. *Journal of bacteriology*, 123(3), 1076-1087.
- Henard, C. A., Freed, E. F., & Guarnieri, M. T. (2015).** Phosphoketolase pathway engineering for carbon-efficient biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 36, 183-188.
- Herrero, A. A., Gomez, R. F., Snedecor, B., Tolman, C. J., & Roberts, M. F. (1985).** Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 22(1), 53-62.
- Hespell, R. B., & Whitehead, T. R. (1990).** Physiology and genetics of xylan degradation by gastrointestinal tract bacteria. *Journal of Dairy Science*, 73(10), 3013-3022.
- Hettrich K, Fischer S, Schroder N, Engelhardt J, Drechsler U & Loth F (2006)** Derivatization and characterization of xylan from oat spelts. In: Special Issue: Hemicelluloses, 232(1), 37-48. Wiley-VCH Verlag.

- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., Salminen, S., Calder, P. C., & Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 11(8), 506–514.
- Hipsley, E. H. (1953). Dietary “fibre” and pregnancy toxemia. *British medical journal*, 2(4833), 420.
- Hiseni, P., Rudi, K., Wilson, R. C., Hegge, F. T., & Snipen, L. (2021). HumGut: a comprehensive human gut prokaryotic genomes collection filtered by metagenome data. *Microbiome*, 9(1), 1-12.
- Hoefel, T., Faust, G., Reinecke, L., Rudinger, N., & Weuster-Botz, D. (2012). Comparative reaction engineering studies for succinic acid production from sucrose by metabolically engineered *Escherichia coli* in fed-batch-operated stirred tank bioreactors. *Biotechnology journal*, 7 (10), 1277-1287.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207–214.
- Hung, X. G., Tseng, W. C., Liu, S. M., Tzou, W. S., & Fang, T. Y. (2014). Characterization of a thermophilic L-arabinose isomerase from *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* NTOU1. *Biochemical Engineering Journal*, 83, 121-128.
- Inoue, T. (2006). Microbial aldolases as C-C bonding enzymes: investigation of structural-functional characteristics and application for streoselective reactions. Dissertation. Universität Stuttgart.
- Isar, J., Agarwal, L., Saran, S., & Saxena, R. K. (2006). Succinic acid production from *Bacteroides fragilis*: Process optimization and scale up in a bioreactor. *Anaerobe*, 12 (5-6), 231-237.
- Jansen, M. L., & van Gulik, W. M. (2014). Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Current opinion in biotechnology*, 30, 190–197.
- Kademi, A., & Baratti, J. (1996). Effect of substrate concentration on ethanol production by *Zymomonas mobilis* on cellulose hydrolysate. *Biotechnology Letters*, 18(9), 1019–1024.
- Kaoutari, A. E., Armougom, F., Gordon, G. I., Raoult, D., & Henrissat, B. (2013). The abundance and variety of carbohydrate-active enzymes in the human gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 11 (7), 497–504.
- Kendall, C. W., Esfahani, A., & Jenkins, D. J. (2010). The link between dietary fibre and human health. *Food Hydrocolloids*, 24(1), 42-48.
- Kim, D., & Kim, W. U. (2016). Editorial: Can *Prevotella copri* Be a Causative Pathobiont in Rheumatoid Arthritis?. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 68(11), 2565–2567.
- Kim, D., & Woo, H. M. (2018). Deciphering bacterial xylose metabolism and metabolic engineering of industrial microorganisms for use as efficient microbial cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(22), 9471-9480.
- Kim, H. J., & Oh, D. K. (2005). Purification and characterization of an L-arabinose isomerase from an isolated strain of *Geobacillus thermodenitrificans* producing D-tagatose. *Journal of Biotechnology*, 120(2), 162-173.
- Kim, M. I., Kim, N. J., Shang, L., Chang, Y., Lee, S., & Chang, H. N. (2009). Continuous production of succinic acid using an external membrane cell recycle system. *Journal of microbiology and biotechnology*, 19 (11), 1369-1373.

- Kim, P., Laivenieks, M., Vieille, C., & Zeikus, J. G. (2004). Effect of overexpression of *Actinobacillus succinogenes* phosphoenolpyruvate carboxykinase on succinate production in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 1238-1241.
- Kircher M., Bott M., & Marienhagen J. (2020). The Importance of Biotechnology for the Bioeconomy. In: Pietzsch, J. (Editor) *Bioeconomy for Beginners*. Berlin, Heidelberg: Springer, p: 105-128.
- Kiszonas, A. M., Fuerst, E. P., & Morris, C. F. (2013). Wheat arabinoxylan structure provides insight into function. *Cereal Chemistry*, 90(4), 387-395.
- Klemme J. H. (1976). Regulation of intracellular pyrophosphatase-activity and conservation of the phosphoanhydride-energy of inorganic pyrophosphate in microbial metabolism. *Zeitschrift für Naturforschung. Section C, Biosciences*, 31 (9-10), 544–550.
- Koendjibharie, J. G., Hon, S., Pabst, M., Hooftman, R., Stevenson, D. M., Cui, J., Amador-Noguez, D., Lynd, L. R., Olson, D. G., & van Kranenburg, R. (2020). The pentose phosphate pathway of cellulolytic clostridia relies on 6-phosphofructokinase instead of transaldolase. *The Journal of biological chemistry*, 295 (7), 1867–1878.
- Köhler, U., Cerff, R., & Brinkmann, H. (1996). Transaldolase genes from the cyanobacteria *Anabaena variabilis* and *Synechocystis* sp. PCC 6803: comparison with other eubacterial and eukaryotic homologues. *Plant molecular biology*, 30(1), 213-218.
- Koren, O., Knights, D., Gonzalez, A., Waldron, L., Segata, N., Knight, R., Huttenhower, C., & Ley, R. E. (2013). A guide to enterotypes across the human body: meta-analysis of microbial community structures in human microbiome datasets. *PLoS computational biology*, 9(1), e1002863.
- Kornberg, A. (1962). On the metabolic significance of phosphorolytic and pyrophosphorolytic reactions. In: Kasha, H., & Pullman, B. (Editors). *Horizons in Biochemistry*. New York: Academic Press, p: 251–264.
- Kötter, P., & Ciriacy, M. (1993). Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*, 38(6), 776-783.
- Kramer, M. G., & Redenbaugh, K. (1994). Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica*, 79, 293-297.
- Kuchenreuther, J. M., Grady-Smith, C. S., Bingham, A. S., George, S. J., Cramer, S. P., & Swartz, J. R. (2010). High-yield expression of heterologous [FeFe] hydrogenases in *Escherichia coli*. *PLoS one*, 5(11), e15491.
- Kulkarni, N., Shendye, A., & Rao, M., (1999). Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 23 (4), 411–456.
- Kumar, R., Basak, B., & Jeon, B. H. (2020). Sustainable production and purification of succinic acid: A review of membrane-integrated green approach. *Journal of Cleaner Production*, 277, 123954.
- Kwong, W. K., Zheng, H., & Moran, N. A. (2017). Convergent evolution of a modified, acetate-driven TCA cycle in bacteria. *Nature microbiology*, 2(7), 1-3.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685.
- Lee, J. W., Yi, J., Kim, T. Y., Choi, S., Ahn, J. H., Song, H., Lee, M. H., & Lee, S. Y. (2016). Homo-succinic acid production by metabolically engineered *Mannheimia succiniciproducens*. *Metabolic engineering*, 38, 409–417.

- Lee, P. C., Lee, S. Y., & Chang, H. N. (2010). Kinetic study on succinic acid and acetic acid formation during continuous cultures of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* grown on glycerol. *Bioprocess and biosystems engineering*, 33 (4), 465–471.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., & Chang, H. N. (2002). Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied microbiology and biotechnology*, 58 (5), 663–668.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., Chang, H. N., & Park, S. C. (2003). Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Biotechnology letters*, 25(2), 111–114.
- Lee, S. J., Lee, D. W., Choe, E. A., Hong, Y. H., Kim, S. B., Kim, B. C., & Pyun, Y. R. (2005). Characterization of a thermoacidophilic L-arabinose isomerase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*: role of Lys-269 in pH optimum. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 7888–7896.
- Li, J., Jia, H., Cai, X., Zhong, H., Feng, Q., Sunagawa, S., Arumugam, M., Kultima, J. R., Prifti, E., Nielsen, T., Juncker, A. S., Manichanh, C., Chen, B., Zhang, W., Levenez, F., Wang, J., Xu, X., Xiao, L., Liang, S., Zhang, D., Zhang, Z., Chen, W., Zhao, H., Al-Aama, J. Y., Edris, S., Yang, H., Wang, J., Hansen, T., Nielsen, H. B., Brunak, S., Kristiansen, K., Guarner, F., Pedersen, O., Dore, J., Ehrlich, S. D. Bork, P., Wang, J., & MetaHIT Consortium (2014). An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature biotechnology*, 32(8), 834–841.
- Li, K. Azadi, P., Collins, R., Tolan, J., Kim, J., & Eriksson, K., (2000). Relationships between activities of xylanases and xylan structures. *Enzyme and Microbial Technology*, 27 (1-2), 89–94.
- Li, L., Lin, J., Wu, N., Xie, S., Meng, C., Zheng, Y., Wang, X., Zhao, Y. (2020). Review and outlook on the international renewable energy development. *Energy and Built Environment*, 3, 2
- Linares-Pastén, J. A., Hero, J. S., Pisa, J. H., Teixeira, C., Nyman, M., Adlercreutz, P., Martinez, M. A., & Karlsson, E. N. (2021). Novel xylan-degrading enzymes from polysaccharide utilizing loci of *Prevotella copri* DSM18205. *Glycobiology*, 31(10), 1330–1349.
- Lipmann, F. (1965). The origins of pre-biological systems and of their molecular matrices. In: Fox, S.W. (Editor). *Projecting backward from the present stage of evolution of biosynthesis*, New York: Academic Press, p: 259–280.
- Litsanov, B., Brocker, M., & Bott, M. (2012). Toward homosuccinate fermentation: metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for anaerobic production of succinate from glucose and formate. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3325–3337.
- Lloyd-Price, J., Mahurkar, A., Rahnavard, G., Crabtree, J., Orvis, J., Hall, A. B., Brady, A., Creasy, H. H., McCracken, C., Giglio, M. G., McDonald, D., Franzosa, E. A., Knight, R., White, O., & Huttenhower, C. (2017). Strains, functions and dynamics in the expanded Human Microbiome Project. *Nature*, 550(7674), 61–66.
- Louis, P., & Flint, H. J. (2017). Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environmental microbiology*, 19(1), 29–41.
- Lu, J., Li, J., Gao, H., Zhou, D., Xu, H., Cong, Y., Zhang, W., Xin, F., & Jiang, M. (2021). Recent progress on bio-succinic acid production from lignocellulosic biomass. *World journal of microbiology & biotechnology*, 37(1), 16.
- 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.

- Lynch, S. V., & Pedersen, O. (2016).** The human intestinal microbiome in health and disease. *New England Journal of Medicine*, 375(24), 2369-2379.
- 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.
- Matheron, C., Delort, A. M., Gaudet, G., Forano, E., & Liptaj, T. (1998).** <sup>13</sup>C and <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance study of glycogen futile cycling in strains of the genus *Fibrobacter*. *Applied and environmental microbiology*, 64 (1), 74-81.
- McKendry, P. (2002).** Energy production from biomass (part 1): overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83 (1), 37-46.
- Men, Y., Zhu, Y., Zhang, L., Kang, Z., Izumori, K., Sun, Y., & Ma, Y. (2014).** Enzymatic conversion of D-galactose to D-tagatose: cloning, overexpression and characterization of L-arabinose isomerase from *Pediococcus pentosaceus* PC-5. *Microbiological research*, 169(2-3), 171–178.
- Mertens E. (1991).** Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme?. *FEBS letters*, 285(1), 1–5.
- Mertens, E. (1993).** ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists. *Parasitology Today*, 9(4), 122-126.
- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., & Soucaille, P. (2008).** A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and bioengineering*, 99 (1), 129-135.
- Miller, J. H. (1972).** Experiments in molecular genetics. *Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press* 433.
- Moehs, C. P., Allen, P. V., Friedman, M., & Belknap, W. R. (1996).** Cloning and expression of transaldolase from potato. *Plant molecular biology*, 32(3), 447-452.
- Moore, S. A., Ronimus, R. S., Roberson, R. S., & Morgan, H. W. (2002).** The structure of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Structure*, 10 (5), 659–671.
- Moorhead, G. B., & Plaxton, W. C. (1990).** Purification and characterization of cytosolic aldolase from carrot storage root. *The Biochemical journal*, 269 (1), 133–139.
- Mordor Intelligence (2021a).** Succinic Acid Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact and Forecasts (2021-2026). Online Verfügbar: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/succinic-acid-market> (aufgerufen 06.12.2021).
- Mordor Intelligence (2021b).** Bio-based Succinic Acid Market – Growth, Trends, COVID-19 Impact and Forecasts (2021-2026). Online Verfügbar: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-bio-based-succinic-acid-market-industry> (aufgerufen 06.12.2021).
- Mott, J. E., Grant, R. A., Ho, Y. S. & Platt, T. (1985).** Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the  $\lambda$  P<sub>L</sub> promoter: strategies for overproducing transcription termination factor p. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 82, 88–92.
- Mullins, E. A., Francois, J. A., & Kappock, T. J. (2008).** A specialized citric acid cycle requiring succinyl-coenzyme A (CoA): acetate CoA-transferase (AarC) confers acetic acid resistance on the acidophile *Acetobacter aceti*. *Journal of bacteriology*, 190(14), 4933-4940.

- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51, 263–273.
- Nasser, H. A., Mahmoud, M., Tolba, M. M., Radwan, R. A., Gabr, N. M., ElShamy, A. A., Yehya, M. S., Ziemke, A., & Hashem, M. Y. (2021). Pros and cons of using green biotechnology to solve food insecurity and achieve sustainable development goals. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*, 6, 1-19.
- Nghiem, N. P., Kleff, S., & Schwegmann, S. (2017). Succinic acid: technology development and commercialization. *Fermentation*, 3 (2), 26.
- Nore, B. F., Hussain, I., Nyrén, P., & Baltscheffsky, M. (1986). Synthesis of pyrophosphate coupled to the reverse energy-linked transhydrogenase reaction in *Rhodospirillum rubrum* chromatophores. *FEBS letters*, 200 (1), 133–138.
- Patrick, J. W., & Lee, N. (1968). Purification and properties of an L-arabinose isomerase from *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 243(16), 4312–4318.
- Péan, N., Le Lay, A., Brial, F., Wasserscheid, J., Rouch, C., Vincent, M., Myridakis, A., Hedjazi, L., Dumas, M. E., Grundberg, E., Lathrop, M., Magnan, C., Dewar, K., & Gauguier, D. (2020). Dominant gut *Prevotella copri* in gastrectomised non-obese diabetic Goto-Kakizaki rats improves glucose homeostasis through enhanced FXR signalling. *Diabetologia*, 63(6), 1223–1235.
- Pereira, F. C., & Berry, D. (2017). Microbial nutrient niches in the gut. *Environmental microbiology*, 19 (4), 1366-1378.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T., Mende, D. R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J-M., Hansen, T., Paslier, D. L., Linneberg, A., Nielsen, H. B., Pelletier, E., Renault, P., Sucheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Chang, Y., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J. MetaHIT Consortium, Bork, P., Ehrlich, S. D., & Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
- Quigley, E. M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology*, 9(9), 560.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G., & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. *The British journal of nutrition*, 101 (4), 541–550.
- Reeves, R. E. (1985). Metabolism of *Entamoeba histolytica* schaudinn, 1903. *Advances in parasitology*, 23, 105-142.
- Reeves, R. E., & Guthrie, J. D. (1975). Acetate kinase (pyrophosphate). A fourth pyrophosphate-dependent kinase from *Entamoeba histolytica*. *Biochemical and biophysical research communications*, 66 (4), 1389-1395.
- Reeves, R. E., Serrano, R., & South, D. J. (1976). 6-phosphofructokinase (pyrophosphate). Properties of the enzyme from *Entamoeba histolytica* and its reaction mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 251(10), 2958-2962.
- Reichardt, N., Duncan, S. H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K. P., Flint, H. J., & Louis, P. (2014). Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*, 8(6), 1323–1335.

- Reshetnikov, A. S., Rozova, O. N., Khmelenina, V. N., Mustakhimov, I. I., Beschastny, A. P., Murrell, J. C., & Trotsenko, Y. A. (2008). Characterization of the pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *FEMS microbiology letters*, 288(2), 202–210.
- Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1), 14.
- Roberfroid, M. (2007). Prebiotics: the concept revisited. *The Journal of nutrition*, 137(3), 830S-837S.
- Rohr, L. M., Teuber, M., & Meile, L. (2002). Phosphoketolase, a neglected enzyme of microbial carbohydrate metabolism. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, 56(6), 270-273.
- Rozova, O. N., Khmelenina, V. N., Mustakhimov, I. I., Reshetnikov, A. S., & Trotsenko, Y. A. (2010a). Characterization of recombinant fructose-1,6-bisphosphate aldolase from *Methylococcus capsulatus* Bath. *Biochemistry. Biokhimiia*, 75(7), 892–898.
- Rozova, O. N., Khmelenina, V. N., Vuilleumier, S., & Trotsenko, Y. A. (2010b). Characterization of recombinant pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase from halotolerant methanotroph *Methylomicrobium alcaliphilum* 20Z. *Research in microbiology*, 161(10), 861–868.
- Saavedra, E., Encalada, R., Vázquez, C., Olivos-García, A., Michels, P., & Moreno-Sánchez, R. (2019). Control and regulation of the pyrophosphate-dependent glucose metabolism in *Entamoeba histolytica*. *Molecular and biochemical parasitology*, 229, 75–87.
- Saavedra, E., Marín-Hernández, A., Encalada, R., Olivos, A., Mendoza-Hernández, G., & Moreno-Sánchez, R. (2007). Kinetic modeling can describe in vivo glycolysis in *Entamoeba histolytica*. *The FEBS journal*, 274(18), 4922-4940.
- Saheki, S., Takeda, A., & Shimazu, T. (1985). Assay of inorganic phosphate in the mild pH range, suitable for measurement of glycogen phosphorylase activity. *Analytical biochemistry*, 148(2), 277-281.
- Salek, S. S., Van Turnhout, A. G., Kleerebezem, R., & Van Loosdrecht, M. C. M. (2015). pH control in biological systems using calcium carbonate. *Biotechnology and bioengineering*, 112(5), 905-913.
- Salvachúa, D., Mohagheghi, A., Smith, H., Bradfield, M., Nicol, W., Black, B. A., Bidy, M. J., Dowe, N., & Beckham, G. T. (2016). Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnology for biofuels*, 9, 28.
- Salyers, A. A., & Leedle, J. A. (1983). Carbohydrate metabolism in the human colon. In: Hentges, D.J. (Editor). Human intestinal microflora in health and disease, *New York: Academic Press*; p: 129-146.
- Samland, A. K., & Sprenger, G. A. (2009). Transaldolase: from biochemistry to human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 41(7), 1482–1494.
- Samuelov, N. S., Lamed, R., Lowe, S., & Zeikus, J. G. (1991). Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and environmental microbiology*, 57(10), 3013-3019.
- Sautner, V., Friedrich, M. M., Lehweß-Litzmann, A., & Tittmann, K. (2015). Converting transaldolase into aldolase through swapping of the multifunctional acid–base catalyst: common and divergent catalytic principles in F6P aldolase and transaldolase. *Biochemistry*, 54(29), 4475-4486.

- Saxena, R. K., Saran, S., Isar, J., & Kaushik, R. (2017).** Production and applications of succinic acid. In: Pandey, A., Negi, S., & Soccol, C. R. (Editors), *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, Elsevier; p: 601-630.
- Scheller, H. V., & Ulvskov, P. (2010).** Hemicelluloses. *Annual review of plant biology*, 61, 263–289.
- Scher, J. U., Sczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., Pamer, E. G., Abramson, S. B., Huttenhower, C., & Littman, D. R. (2013).** Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2, e01202.
- Scholten, E., Daegele, D., Haefner, S., & Schroeder, H. (2011).** *Novel microbial succinic acid producer*. U.S. Patent No. US20110300589
- Scholten, E., Renz, T., & Thomas, J. (2009).** Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnology letters*, 31 (12), 1947-1951.
- Schürmann, M., & Sprenger, G. A. (2001).** Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 11055-11061.
- Schürmann, M., Schürmann, M., & Sprenger, G. A. (2002).** Fructose 6-phosphate aldolase and 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate synthase from *Escherichia coli* as tools in enzymatic synthesis of 1-deoxysugars. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19, 247-252.
- Sears, C. L. (2005).** A dynamic partnership: celebrating our gut flora. *Anaerobe*, 11(5), 247-251.
- Sekirov, I., Russell, S. L., Antunes, L. C., & Finlay, B. B. (2010).** Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 90(3), 859–904.
- Siebers, B., Klenk, H. P., & Hensel, R. (1998).** PPI-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *Journal of Bacteriology*, 180 (8), 2137-2143.
- Silva, Y. P., Bernardi, A., & Frozza, R. L. (2020).** The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Frontiers in endocrinology*, 11, 25.
- Soderberg, T., & Alver, R. C. (2004).** Transaldolase of *Methanocaldococcus jannaschii*. *Archaea*, 1(4), 255-262.
- Soetaert, W., & Vandamme, E. (2006).** The impact of industrial biotechnology. *Biotechnology journal*, 1 (7-8), 756–769.
- Sokatch J. R. (1962).** Phosphorylation of sedoheptulose 7-phosphate by *Streptococcus faecalis*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 99, 401–408.
- Stauffer, W., & Ravdin, J. I. (2003).** *Entamoeba histolytica*: an update. *Current opinion in infectious diseases*, 16 (5), 479-485.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer Alam, 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 the Cambridge Philosophical Society*, 90 (3), 927–963.
- Susskind, B. M., Warren, L. G., & Reeves, R. E. (1982).** A pathway for the interconversion of hexose and pentose in the parasitic amoeba *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical journal*, 204(1), 191–196.

- Szenk, M., Dill, K. A., & de Graff, A. (2017). Why Do Fast-Growing Bacteria Enter Overflow Metabolism? Testing the Membrane Real Estate Hypothesis. *Cell systems*, 5(2), 95–104.
- Tan, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2019). Investigations of *Bacteroides* spp. towards next-generation probiotics. *Food Research International*, 116, 637–644.
- Tan, H., Zhao, J., Zhang, H., Zhai, Q., & Chen, W. (2018). Isolation of Low-Abundant Bacteroidales in the Human Intestine and the Analysis of Their Differential Utilization Based on Plant-Derived Polysaccharides. *Frontiers in microbiology*, 9, 1319.
- Tan, J., McKenzie, C., Potamitis, M., Thorburn, A. N., Mackay, C. R., & Macia, L. (2014). The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Advances in immunology*, 121, 91–119.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C. T., Lin, H., Masters, S. L., Gottlieb, E., Kelly, V. P., Clish, C., Auron, P. E., Xavier, R. J., & O'Neill, L. A. (2013). Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ . *Nature*, 496(7444), 238–242.
- Taymaz-Nikerel, H., Borujeni, A. E., Verheijen, P. J., Heijnen, J. J., & van Gulik, W. M. (2010). Genome-derived minimal metabolic models for *Escherichia coli* MG1655 with estimated in vivo respiratory ATP stoichiometry. *Biotechnology and bioengineering*, 107 (2), 369–381.
- Tett, A., Huang, K. D., Asnicar, F., Fehlner-Peach, H., Pasolli, E., Karcher, N., Armanini, F., Manghi, P., Bonham, K., Zolfo, M., De Filippis, F., Magnabisco, C., Bonneau, R., Lusingu, J., Amuasi, J., Reinhard, K., Rattei, T., Boulund, F., Engstrand, L., Zink, A., Collado, M. C., Littmann, D. R., Eibach, D., Ercolini, D., Rota-Stabelli, O., Huttenhower, C., Maixner, F., & Segata, N. (2019). The *Prevotella copri* complex comprises four distinct clades underrepresented in westernized populations. *Cell host & microbe*, 26(5), 666–679.
- Tovilla-Coutiño, D. B., Momany, C., & Eiteman, M. A. (2020). Engineered citrate synthase alters Acetate Accumulation in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 61, 171–180.
- Trowell, H. (1976). Definition of dietary fiber and hypotheses that it is a protective factor in certain diseases. *The American journal of clinical nutrition*, 29(4), 417–427.
- Tsapekos, P., Khoshnevisan, B., Alvarado-Morales, M., Zhu, X., Pan, J., Tian, H., & Angelidaki, I. (2021). Upcycling the anaerobic digestion streams in a bioeconomy approach: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 151, 111635.
- Tylecote, A., (2019). Biotechnology as a new techno-economic paradigm that will help drive the world economy and mitigate climate change. *Research Policy*, 48 (4), 858–868.
- Van Soest, P. J. (1978). Dietary fibers: their definition and nutritional properties. *The American journal of clinical nutrition*, 31(10), S12–S20.
- Walker, A. W., Duncan, S. H., Louis, P., & Flint, H. J. (2014). Phylogeny, culturing, and metagenomics of the human gut microbiota. *Trends in microbiology*, 22 (5), 267–274.
- 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.
- Wan, Y., Yuan, J., Li, J., Li, H., Yin, K., Wang, F., & Li, D. (2020). Overweight and underweight status are linked to specific gut microbiota and intestinal tricarboxylic acid cycle intermediates. *Clinical nutrition (Edinburgh, Scotland)*, 39(10), 3189–3198.

- Wang, D., Li, Q., Song, Z., Zhou, W., Su, Z., & Xing, J. (2011b). High cell density fermentation via a metabolically engineered *Escherichia coli* for the enhanced production of succinic acid. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 86(4), 512–518.
- Wang, K., Liao, M., Zhou, N., Bao, L., Ma, K., Zheng, Z., Wang, Y., Liu, C., Wang, W., Wang, J., Liu, S. J., & Liu, H. (2019). *Parabacteroides distasonis* Alleviates Obesity and Metabolic Dysfunctions via Production of Succinate and Secondary Bile Acids. *Cell reports*, 26(1), 222–235.
- Wang, Y. C., McPherson, K., Marsh, T., Gortmaker, S. L., & Brown, M. (2011a). Health and economic burden of the projected obesity trends in the USA and the UK. *The Lancet*, 378(9793), 815–825.
- Weimberg, R. (1961). Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. *Journal of Biological Chemistry*, 236(3), 629–635.
- Weitzman, P. D. J., & Jones, D. (1968). Regulation of citrate synthase and microbial taxonomy. *Nature*, 219(5151), 270–272.
- Wimmer, J. L., Kleinermanns, K., & Martin, W. F. (2021). Pyrophosphate and irreversibility in evolution, or why PPI is not an energy currency and why nature chose triphosphates. *Frontiers in microbiology*, 2999.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y. Y., Keilbaugh, S. A., Bewtra, M., Knights, D., Walters, W. A., Knight, R., Sinha, R., Gilroy, E., Gupta, K., Baldassano, R., Nessel, L., Li, H., Bushman, F. D., & Lewis, J. D. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6052), 105–108.
- Yun, N. R., Arai, H., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2001). The genes for anabolic 2-oxoglutarate: ferredoxin oxidoreductase from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6. *Biochemical and biophysical research communications*, 282(2), 589–594.
- Zhou, J., Olson, D. G., Argyros, D. A., Deng, Y., van Gulik, W. M., van Dijken, J. P., & Lynd, L. R. (2013). Atypical glycolysis in *Clostridium thermocellum*. *Applied and environmental microbiology*, 79(9), 3000–3008.
- Zhu, N., Xia, H., Wang, Z., Zhao, X., & Chen, T. (2013). Engineering of acetate recycling and citrate synthase to improve aerobic succinate production in *Corynebacterium glutamicum*. *PLoS One*, 8(4), e60659.
- Zoetendal, E. G., Rajilić-Stojanović, M., & de Vos, W. M. (2008). High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut*, 57(11), 1605–1615.