

**Genetische Optimierung menschlicher Darmbakterien zur
biotechnologischen Succinat-Produktion und deren Rolle bei der
Nitrosierung von Medikamenten**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Mélanie Elisabeth Gindt

aus

Esch-sur-Alzette, Luxemburg

Bonn, 2025

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

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Uwe Deppenmeier

Gutachterin: PD Dr. Christiane Dahl

Tag der Promotion: 31.10.2025

Erscheinungsjahr: 2025

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Gindt, M. E., Lück, R., Deppenmeier, U. (2024). Genetic optimization of the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus* for enhanced succinate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108 (1), 465. DOI: 10.1007/s00253-024-13303-2

Neff, A., Lück, R., Gindt, M., Deppenmeier, U. (2024). Das unterschätzte biotechnologische Potenzial der Darmmikrobiota. *BIOspektrum*, 30 (1), 52-54. DOI: 10.1007/s12268-024-2087-z

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1. Einleitung.....	1
1.1 Die humane Intestinalmikrobiota.....	1
1.2 Xylan: Zusammensetzung und Abbau	3
1.3 Die Familie Bacteroidaceae	5
1.3.1 Der Organismus <i>P. vulgatus</i> und seine genetischen Tools	6
1.4 Biotechnologische Succinat-Produktion.....	7
1.5 N-Nitrosamine	8
1.6 Zielsetzung dieser Arbeit.....	9
2. Material und Methoden	11
2.1 Chemikalien und weitere Materialien	11
2.1.1 Chemikalien	11
2.1.2 Gase	11
2.1.3 Enzyme	11
2.1.4 Antibiotika	12
2.1.5 Pharmazeutisch aktive Wirkstoffe (API)	12
2.1.6 Kits	13
2.1.7 DNA-und Protein-Marker	14
2.1.8 Software und Datenbanken.....	14
2.1.9 Dienstleistungen.....	15
2.1.9.1 Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	15
2.1.9.2 Untersuchung von N-Nitroso-Verbindungen	15
2.2 Organismen, Oligonukleotide und Vektoren.....	16
2.2.1 Organismen	16
2.2.2 Oligonukleotide	17
2.2.3 Vektoren	20
2.3 Mikrobiologische Methoden	22
2.3.1 Medien und Kultivierung von <i>E.coli</i>	22

2.3.2 Medien und Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen	23
2.3.2.1 Kultivierung von <i>P. vulgaris</i> im anaeroben Kleinfermenter	26
2.3.3 Stammerhaltung der verwendeten Mikroorganismen	27
2.3.4 Messung der optischen Dichte und Bestimmung der Wachstumsparameter	27
2.3.5 Erstellung eines Antibiotogramms mittels Agardiffusionstest.....	28
2.3.6 Herstellung einer synthetischen Darmmikrobiota	29
2.3.7 Inkubation mit aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API)	30
2.3.8 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von APIs auf Darmbakterien	31
2.4 Molekularbiologische Methoden	32
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	32
2.4.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	32
2.4.3 Isolierung genomischer DNA.....	32
2.4.4 Bestimmung von DNA- und RNA- Konzentrationen	33
2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.4.6 Agarose Gelelektrophorese	36
2.4.7 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten.....	37
2.4.8 DNA-Ligation.....	37
2.4.9 Klonierung mittels NEBuilder DNA Assembly Kit	38
2.4.10 Transformation in chemisch kompetente <i>E. coli</i> Stämme	40
2.4.11 Transformation in <i>E. coli</i> β 2155 mittels Elektroporation.....	40
2.4.12 Transformation von Plasmid-DNA in <i>P. vulgaris</i> , <i>B. cellulosilyticus</i> und <i>B. xylanisolvans</i>	41
2.4.13 Markerlose Deletion von Genen in <i>P. vulgaris</i>	43
2.4.14 Überexpression von Genen in <i>P. vulgaris</i>	44
2.4.15 RNA-Isolierung.....	45
2.4.16 Quantitative PCR (qPCR) und quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (RT-qPCR)	46
2.5 Biochemische Methoden	48
2.5.1 Überproduktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	48
2.5.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall.....	49
2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie.....	49

2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	50
2.5.5 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
2.5.6 Nanoluc-Luciferase Assay	51
2.5.7 Ethanol-Fällung von Xylanen	52
2.6 Analytische Methoden	53
2.6.1 Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)	53
2.6.2 Quantifizierung von Wasserstoff mittels Gaschromatographie	54
2.6.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Pyrophosphat	55
2.6.4 Bestimmung der Pyruvat:Orthophosphat-Dikinase Aktivität aus <i>P. vulgatus</i>	56
2.6.5 Kolorimetrische Quantifizierung von Nitrit	57
3. Ergebnisse.....	59
3.1 Optimierung der Succinat-Produktion in <i>P. vulgatus</i>	60
3.1.1 Deletion des für die Pyruvat-Kinase kodierenden Gens <i>bvu_0876</i>	60
3.1.1.1 Phänotypanalyse von <i>P. vulgatus</i> 3xKO $\Delta 0876$	64
3.1.1.2 Heterologe Produktion der Pyruvat:Ortophosphat-Dikinase (BVU_3358) in <i>E. coli</i>	65
3.1.1.3 Charakterisierung der Pyruvat:Ortophosphat-Dikinase (BVU_3358)	68
3.1.2 Weitere Ansätze zur Unterbindung der Acetat-Produktion in <i>P. vulgatus</i>	71
3.1.2.1 Deletionsversuch der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787)	71
3.1.2.2 Deletionsversuch der Phospho-transacetylase (BVU_0523) und der Acetatkinase (BVU_0524)	73
3.1.3 Regulation der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787)	76
3.1.3.1 Deletion der Gene des Rhamnose-Operon (<i>bvu_0595-0597</i>)	78
3.1.3.2 Integration des Vektors pMM656_RP_3787 in <i>P. vulgatus</i>	91
3.1.3.3 Deletion der genomischen Kopie von <i>bvu_3787</i>	96
3.1.4 Homologe Überexpression der Gene aus dem PPW in der dreifach Deletionsmutante <i>P. vulgatus</i> $\Delta 0309-0310 \Delta 2499 \Delta 2880$	99
3.1.4.1 Homologe Überexpression des für die Transketolase kodierenden Gens <i>tkt</i> ..	99
3.1.4.2 Homologe Überexpression des für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierenden Gens <i>g6pdh</i>	106
3.1.4.3 Parallele, homologe Überexpression der für die TKT und G6PDH kodierenden Gene	111

3.1.5 Succinat-Produktion durch <i>P. vulgatus</i> 3xKO pG106_p2499_g6pdh im anaeroben Kleinfärmenter	117
3.2 Übertragung der genetischen Werkzeuge aus <i>P. vulgatus</i> auf weitere Stämme der Familie Bacteroidaceae	119
3.2.1 Screening nach geeigneten Organismen	119
3.2.1.1 Xylanverwertung durch verschiedene Vertreter der Bacteroidaceae	119
3.2.1.2 Antibiotogramm von <i>P. vulgatus</i> , <i>B. cellulosilyticus</i> , <i>B. intestinalis</i> und <i>B. xylanisolvens</i>	121
3.2.1.3 Transfer des genomintegrativen Vektors pMM656_TetQ_nanoluc in <i>B. cellulosilyticus</i> und <i>B. xylanisolvens</i>	123
3.2.2 Deletion der Methyl-Malonyl-CoA-Mutase (BXY_12020, BXY_12030) in <i>B. xylanisolvens</i>	128
3.3 Wechselwirkung zwischen pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen und der menschlichen Darmmikrobiota	136
3.3.1 Auswirkung der APIs auf das Wachstumsverhalten verschiedener Darmorganismen	137
3.3.2 Nitrosierung von APIs durch Darmbakterien	142
3.3.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die chemische Nitrosierung von APIs	142
3.3.2.2 Biologische Nitrosierung von APIs durch Darmorganismen	144
3.3.3 Abbau von NA-Enalapril und NA-Propranolol durch <i>E. coli</i>	148
4. Diskussion	151
4.1 Optimierung der Succinat-Produktion in <i>P. vulgatus</i>	152
4.1.1 Markerlose Deletion von Genen aus dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus von <i>P. vulgatus</i> zur Steigerung der Succinat-Produktion	155
4.1.1.1 Deletion der Pyruvat-Kinase in <i>P. vulgatus</i>	155
4.1.1.2 Deletionsversuch der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787), Phosphotransacetylase (BVU_0523) und der Acetatkinase (BVU_0524) in <i>P. vulgatus</i>	157
4.1.1.3 Regulation der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase	159
4.1.2 Homologe Überexpression der Gene aus dem PPW in der dreifach Deletionsmutante <i>P. vulgatus</i> Δ 0309-0310 Δ 2499 Δ 2880	164
4.2 Weitere Xylan-verwertende Succinat-Produzenten	175

4.2.1 Xylan-Verwertung in Spezies der Ordnung Bacteroidales.....	175
4.2.2 Übertragung der genetischen Werkzeuge aus <i>P. vulgatus</i> auf weitere Spezies der Familie Bacteroidaceae	178
4.2.2.1 <i>B. xylanisolvens</i> , ein vielversprechender Kandidat zur umweltfreundlichen Succinat-Produktion	183
4.2.2.2 Die Xylan-Verwertung in <i>B. xylanisolvens</i>	186
4.3 Wechselwirkung zwischen pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen und der menschlichen Darmmikrobiota	190
4.3.1 Auswirkung der APIs auf das Wachstumsverhalten verschiedener Darmorganismen	191
4.3.2 Nitrosierung von APIs durch Darmbakterien	193
4.3.3 Abbau von NA-Enalapril und NA-Propranolol durch <i>E. coli</i>	198
5. Zusammenfassung	201
6. Literaturverzeichnis.....	203
7. Danksagung	227

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
% [v/v]	Volumenprozent
% [w/v]	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
3xKO	Dreifach Deletions-Mutante <i>P. vulgaris</i> Δ0309-10 Δ2499 Δ2880
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AHT	Anhydrotetrazyklin
AMP	Adenosinmonophosphat
AmpR	Ampicillin-Resistenz
API	Active Pharmaceutical Ingredient ; Aktiv Pharmazeutische Wirkstoffe
Ar	Argon
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain Heart Infusion ; Komplexmedium
Blast	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
Bzw.	Beziehungsweise
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym-A
DAP	2,6-Diaminopimelinsäure
DMM(G/X)	Defined Minimal Media ; Minimalmedium (Mit G lukose oder X ylose)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Down	<i>downstream</i>
dsDNA	<i>Double-stranded</i> DNA
DSMZ	D eutsche S ammlung von M ikroorganismen und Z ellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMP-Weg	Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg
ErmR	Erythromycin-Resistenz
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> ; und andere
Fd _{ox}	Oxidiertes Ferredoxin
F _{dred}	Reduziertes Ferredoxin
Fw	<i>Foward</i> Primer

Abkürzungsverzeichnis

G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GH	Glykosid-Hydrolase
h	Stunde
H ₂	Wasserstoff
H ₂ O dest	Destilliertes Wasser
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	<i>Half maximal-Inhibitory concentration</i> 50; mittlere inhibitorische Konzentration
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LB	Lysogeny Broth
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelte Massenspektrometrie
LDH	Lactat-Dehydrogenase
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mV	Millivolt
N ₂	Stickstoff
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDEA	N-nitrosodiethylamine
NDMA	N-nitrosodimethylamine
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600nm
PAGE	Polyarcylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEP	Phosphoenolpyruvat
PFL	Pyruvat-Formiat-Lyase
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PPi	Pyrophosphat
PPW	Pentose-Phosphat-Weg

Abkürzungsverzeichnis

PY	<i>Peptone Yeast</i> ; Komplexmedium
Pyr	Pyruvat
R5P	Ribose-5-Phosphat
rev	<i>Reverse</i> Primer
rH ₂ O	reinst Wasser
RI	L-Rhamnose-Isomerase
RK	Rhamnulokinase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RS	L-Rhamnose-H ⁺ -Symporter
RT	Raum-Temperatur
Ru5P	Ribulose-5-Rhospat
SCFAs	<i>Short-chain fatty acids</i> ; Kurzkettige Fettsäuren
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TetQ	Tetracyklin-Resistenz
TG	Trockengewicht
TKT	Transketolase
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
Up	<i>upstream</i>
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenkonzentration, Volumen pro Volumen
w/v	Massekonzentration, Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
ε	Extinktionskoeffizient
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1 Die humane Intestinalmikrobiota

Die Gesamtheit aller Mikroorganismen, welche den Menschen sowohl auf den äußeren Körperflächen wie auch im Inneren des Körpers besiedelt, wird als humane Mikrobiota bezeichnet. Berechnungen zufolge handelt es sich hierbei um etwa $3,8 \times 10^{13}$ prokaryotische Zellen, die den Menschen als Lebensraum nutzen (Sender *et al.*, 2016). Der größte Teil der Bakterien ist im Darm angesiedelt und wird als humane Intestinalmikrobiota bezeichnet. Im Gegensatz zur Haut, wo aufgrund von kühleren Temperaturen, einem niedrigen pH-Wert und Flüssigkeitsmangel nur vergleichsweise wenige Bakterien überleben können (Byrd *et al.*, 2018), bietet der menschliche Verdauungstrakt mit stabilen 37°C und einer kontinuierlichen Nahrungszufuhr optimale Lebensbedingungen. Dennoch gibt es auch innerhalb des Intestinaltraktes einen Gradienten der prokaryotischen Zelldichte. Angefangen mit 10^3 - 10^4 Bakterien/ml im sauren Magen, nimmt mit zunehmendem pH-Wert die Anzahl der Bakterien im distalen Dünndarm zu und erreicht letztendlich einen Höchstwert von etwa 10^{11} Bakterien/g Kolon-Inhalt (O'Hara & Shanahan, 2006; Sender *et al.*, 2016). Neben der hohen Zelldichte verfügt der Dickdarm zusätzlich mit etwa 1000 verschiedenen Spezies über eine große Diversität (Zhu *et al.*, 2010; Lozupone *et al.*, 2012).

Die genaue Zusammensetzung der menschlichen Intestinalmikrobiota ist von Mensch zu Mensch individuell und wird neben genetischen Faktoren (Ley *et al.*, 2008) auch durch äußere Einwirkungen wie beispielsweise durch die geografische Lage (Yatsunenko *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2016), das Alter (Lozupone *et al.*, 2012), die Ernährung (David *et al.*, 2014; Wexler & Goodman, 2017) und die Einnahme von Medikamenten (Dethlefsen & Relman, 2011; Vich-Vila *et al.*, 2020) beeinflusst. Im Gegensatz zu erwachsenen Menschen, verfügen Säuglinge über eine geringe Vielfalt der Darmmikrobiota aber einem vergleichsweise hohen Anteil an Lactobacillen und Bifidobakterien. Bereits die Art der Geburt sowie die Fütterung innerhalb der ersten Wochen spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung der späteren Diversität der Darmbakterien (O'Hara & Shanahan, 2006; Lozupone *et al.*, 2012). Trotz der großen Variabilität in der Zusammensetzung der menschlichen Darmmikrobiota, wurden in den letzten Jahren die Bacteroidota und Bacillota als zwei dominierende Phyla identifiziert

(Wexler & Goodman, 2017; King *et al.*, 2019). Hierbei sind Spezies der Gattungen *Bacteroides* (B.) und *Phocaeicola* (P.) aus der Familie der Bacteroidaceae, besonders häufig vertreten und machen etwa 40 % der menschlichen Darmorganismen aus (The Human Microbiome Project Consortium, 2012; King *et al.*, 2019).

Durch das enge Zusammenleben zwischen den Bakterien und dem menschlichen Wirt, hat sich eine bidirektionale Wechselwirkung zwischen den Prokaryoten und dem Menschen entwickelt (O'Hara & Shanahan, 2006; Tremaroli & Bäckhed, 2012; Vernocchi *et al.*, 2020; Montagnani *et al.*, 2023). Hierbei spielen die Mikroorganismen eine wichtige Rolle in der Verstoffwechslung von Nahrungsbestandteilen, die vom Menschen nicht selbst verwertet werden können. Besonders wichtig ist hierbei der Abbau von pflanzlichen Heteropolysacchariden, welche einen Großteil der humanen Ernährung ausmachen können (Chassard *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2011; Flint *et al.*, 2012). Während Disaccharide vom menschlichen Körper verstoffwechselt und die daraus entstehenden Monosaccharide im Dünndarm aufgenommen werden können, ist der Mensch für den Abbau von Heteropolysacchariden, wie beispielsweise Xylane, auf spezialisierte Enzyme der Bakterien angewiesen (Dodd *et al.*, 2011; Flint *et al.*, 2012; Thomas *et al.*, 2011). Durch den enzymatischen Abbau der Polymere entstehen in Fermentationsprozessen kurzkettige Fettsäuren (*short chain fatty acids* = SCFAs), welche von den Bakterien in das Darmlumen freigesetzt werden (Den Besten *et al.*, 2013; Louis & Flint, 2009). Zu den am häufigsten produzierten SCFA's zählen dabei Acetat, Propionat und Butyrat, welche wiederum Auswirkungen auf den Menschen als Wirtsorganismus haben. Butyrat wird beispielsweise von den Kolonozyten aufgenommen und wird von diesen als Energiequelle verwertet (Louis & Flint, 2009). Auch Acetat wird eine positive Wirkung auf die Darmepithelzellen zugeschrieben, da es beispielsweise die Permeabilität der Epithelbarriere reduziert und so vor enteropathogenen Infektionen schützt (Fukuda *et al.*, 2012). Formiat hingegen steht unter Verdacht die Gesundheit des Menschen negativ zu beeinflussen, indem es an der Entstehung von Kolonkrebs oder Parkinson beteiligt ist (Ternes *et al.*, 2022; Montagnani *et al.*, 2023; Duan *et al.*, 2024). Zusätzlich gibt es den Verdacht, dass die enzymatische Aktivität einiger Bakterien wie *Escherichia coli* oder weiteren Enterobakterien zur Bildung reaktiver Verbindungen, wie beispielsweise krebserregenden N-Nitrosaminen, führt (Calmels *et al.*, 1987; O'Donnell *et al.*, 1988). Auf der anderen Seite, sind die Darmbakterien neben der Verstoffwechslung von unverdaulichen Nahrungsbestandteilen, ebenfalls am Abbau von Medikamenten und anderen Xenobiotika wie beispielsweise

Pestiziden beteiligt (Harishankar *et al.*, 2013; Zimmermann *et al.*, 2019; Lindell *et al.*, 2022). Die Wechselwirkung zwischen der humanen Intestinalmikrobiota und ihrem Wirt stellt somit ein komplexes Zusammenspiel dar, welches sowohl positive als auch potenziell negative Auswirkungen für den Menschen umfasst.

1.2 Xylan: Zusammensetzung und Abbau

Die Zusammensetzung der humanen Intestinalflora wird von der Nahrungsaufnahme des Wirtes beeinflusst (David *et al.*, 2014; Rinninella *et al.*, 2023). Das stark von tierischen Proteinen, raffiniertem Zucker, gesättigten Fettsäuren und verarbeiteten Lebensmitteln geprägte westliche Ernährungsmuster wird beispielsweise mit einer verringerten Diversität an Mikroorganismen sowie einem höheren Anteil an Enterobakterien wie *Escherichia coli* in Verbindung gebracht. Im Vergleich dazu führt die mediterrane Ernährungsweise, die reich an Vollkornprodukten, Gemüse und Hülsenfrüchten ist, zu einer höheren Artenvielfalt der Darmbakterien sowie zu größeren Mengen an gesundheitsfördernden SCFA's (David *et al.*, 2014; Rinninella *et al.*, 2023).

Ein wichtiger Unterschied beider Ernährungsweisen ist der Anteil an für den Menschen unverdaulichen Ballaststoffen. Hierzu zählen neben Lignin auch Heteropolysaccharide wie Cellulosen, Hemicellulosen und Pektine (Rinninella *et al.*, 2023). Neben den Cellulosen machen die Hemicellulosen mit einem Anteil von 20-40 % der gesamten Pflanzenbiomasse, den zweithäufigsten Bestandteil der pflanzlichen Zellwand aus (Chassard *et al.*, 2007; McKendry, 2002). Unter den Hemicellulosen sind die Xylane, neben Mananen und Galactanen, die häufigsten Vertreter (Hespell & Whitehead, 1990; Dodd & Cann, 2009; Polizeli *et al.*, 2005). Diese Polymere kommen sowohl in Gehölzern wie auch in Gräsern und Getreiden in großen Mengen vor. Anders als das homogene Polymer Cellulose, handelt es sich bei Xylan um ein Heteropolymer. Hauptbestandteil dieses Polymers ist die Pentose Xylose, welche durch β -1,4-Verknüpfungen das Rückgrat bildet. Die Seitenketten sind zusätzlich mit Arabinose-Resten, Acetyl-, Arabinofuranosyl-, Ferulasäure oder 4-O-Methyl-Glucuronyl-Gruppen substituiert (Abb. 1) (Hespell & Whitehead, 1990; Bastawde, 1992; Dodd & Cann, 2009; Flint *et al.*, 2012). Je nach Zusammensetzung oder Herkunft der Xylane unterscheidet man so zwischen Homoxylan, Arabinoxylan, Glucuronoxylan und Arabinoglucuronoxylan (Dodd &

Cann, 2009). Die verknüpften Seitenketten machen die Xylane im Gegensatz zu den Mono- und Disacchariden wie Lactose, Maltose und Saccharose, für den menschlichen Körper unzugänglich und erreichen somit größtenteils unverändert den Dickdarm. Hier befinden sich Mikroorganismen, welche auf den Abbau pflanzlicher Heteropolysaccharide spezialisiert sind und davon bis zu 72 % verstoffwechseln können (Slavin *et al.*, 1981; Dodd *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014).

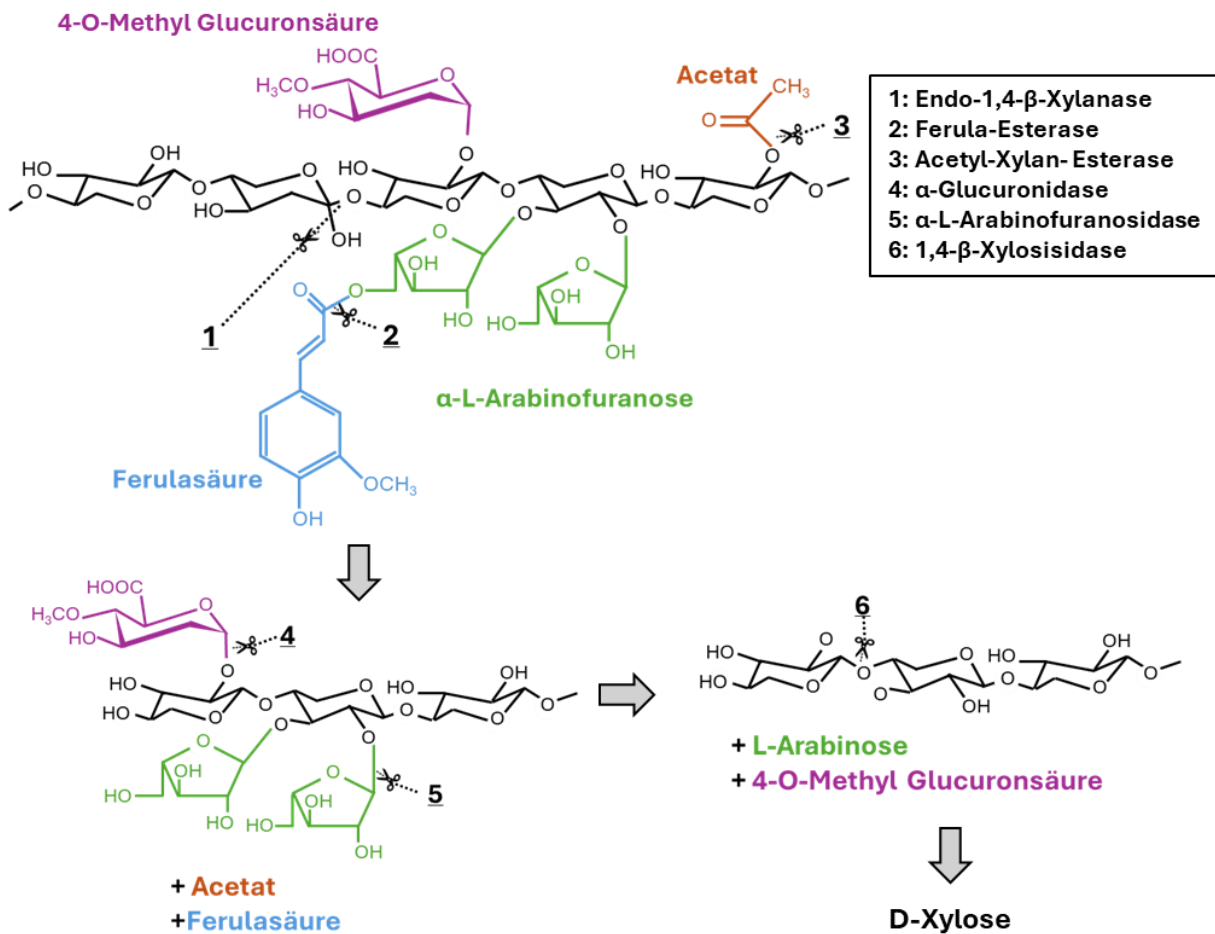


Abbildung 1: Zusammensetzung von Xylanen und deren enzymatischer Abbau (angepasst nach Dodd & Cann, 2009). Dargestellt ist der Abbau von Xylan mit komplex verknüpften Seitenketten bis hin zum Monomer Xylose sowie die dafür erforderlichen Enzyme (1-6). Die Scheren zeigen die Angriffspunkte der jeweiligen Enzyme.

Um den Abbau zu bewerkstelligen, verfügen die Bakterien neben Enzymen zur Bindung und zum Transport von Polysacchariden auch über Transkriptionsregulatoren und CAZ-Enzyme

(*carbohydrate active enzymes*) (Martens *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2014). Letztere beinhalten Glykosid-Hydrolasen (GHs), Polysaccharid-Lyasen (PLs) und Kohlenhydrat-Esterasen (CEs, *carbohydrate esterases*) (Martens *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2023). Die wichtigsten Enzyme zum Abbau von Xylan, gehören zu den Familien der GHs. Hierzu zählen die Ferula-Esterase, die α -L-Arabinofuranosidase, die α -Glucuronidase und die Acetyl-Xylan-Esterase zum Abspalten der Seitenketten von Ferulasäure, Arabinose, 4-O-Methyl-Glucoronyl- und Acetyl-Gruppen (Abb.1, 2-5). Zusätzlich spielen die Enzyme Endo-1,4- β -Xylanase und 1,4- β -Xylosidase, ebenfalls Mitglieder der GH-Familie, eine essenzielle Rolle im Abbau des Xylan-Rückgrats. Während die Xylanase das Rückgrat in kleinere Fragmente abbaut, setzt die Xylosidase monomere Xylose-Einheiten an den nicht reduzierten Enden der Oligosaccharide frei (Abb.1, 1 und 6) (Dodd & Cann, 2009). Alle Gene für die genannten Enzyme sind in so genannten *Polysaccharide utilization loci* (PULs) angeordnet (Martens *et al.*, 2011). Vor allem Vertreter des Phylums Bacteroidota sind für ihre Fähigkeit zum Abbau von Xylanen bekannt (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012; Schwalm & Groisman, 2017). Bei einigen von ihnen machen die Gene zum Transport und Abbau von pflanzlichen Polysacchariden bis zu 20 % ihres Genoms aus (Xu *et al.*, 2003; McNulty *et al.*, 2013; Schwalm & Groisman, 2017).

1.3 Die Familie Bacteroidaceae

Die Familie der Bacteroidaceae ist Teil der Ordnung Bacteroidales und gehört somit zum Phylum der Bacteroidota, welches den größten Anteil der humanen Intestinalmikrobiota ausmacht (Wexler & Goodman, 2017; King *et al.*, 2019). Innerhalb der Bacteroidaceae sind es vor allem die Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola*, die als Kommensale stark im Darm verbreitet sind und etwa 40 % der dort vorhandenen Spezies ausmachen (The Human Microbiome Project Consortium, 2012; King *et al.*, 2019). Zudem nehmen die Vertreter der Familie Bacteroidaceae durch ihre Fähigkeit zum Abbau von pflanzlichen Polysacchariden eine wichtige Rolle in der Physiologie des Menschen ein (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012). Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* sind gram-negative, pleomorphe stäbchenförmige und obligat anaerobe Bakterien. Innerhalb der Gattung *Bacteroides* sind es vor allem *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens*, die zwischen 3 und 5 % der Darmmikrobiota ausmachen (King *et al.*, 2019). *B. xylanisolvens* wurde außerdem nach seiner Isolierung aus

einer Stuhlprobe im Jahr 2008 die Fähigkeit zum Wachstum auf unterschiedlichen Xylanen zugeschrieben (Chassard *et al.*, 2008). Innerhalb der Gattung *Phocaeicola* können die beiden Vertreter *P. dorei* und *P. vulgatus*, gemeinsam bis zu 30 % aller Prokaryoten im Darm ausmachen.

1.3.1 Der Organismus *P. vulgatus* und seine genetischen Tools

P. vulgatus wurde zum ersten Mal im Jahre 1933 aus humanen Faeces unter dem Namen *Bacteroides vulgatus* isoliert (Eggerth & Gagnon, 1933) und bereits damals als eines der am häufigsten in Faeces vorkommen Mikroorganismen beschrieben (Eggerth & Gagnon, 1933). Im Jahr 2019 erfolgte dann aufgrund von neuen phylogenetischen Erkenntnissen eine Neueinordnung des Organismus in die Gattung *Phocaeicola* (García-López *et al.*, 2019). Frühere bioinformatische Untersuchungen haben ergeben, dass die Verstoffwechslung von Zuckern in *P. vulgatus* sowohl über den Pentosephosphatweg (PPW) als auch über den Emden-Meyerhoff-Parnas-Weg (EMP-Weg) ablaufen kann (Franke, 2020). Die aufgenommenen Zucker werden so zu Phosphoenolpyruvat (PEP) verstoffwechselt. Anschließend teilt sich der zentrale Kohlenstofffluss in *P. vulgatus* in einen respiratorischen und einen fermentativen Ast. Der respiratorische Ast entspricht hierbei dem reduktiven Teil des Citratzyklus. Das auf diesem Weg entstehende Fumarat wird als finaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette von *P. vulgatus* verwendet und das dadurch entstehende Succinat zu einem Teil freigesetzt und zum andern Teil weiter zu dem Endprodukt Propionat verstoffwechselt. Über den fermentativen Ast werden ausgehend von PEP die Endprodukte Formiat, Lactat und Acetat von dem Organismus ausgeschieden. Auf diesem Weg werden zusätzlich CO₂, Reduktionsäquivalente und Acetyl-CoA gebildet. Durch die Freisetzung der SCFA's Acetat, Lactat, Formiat, Propionat und Succinat spielt der Organismus nicht nur eine wichtige Rolle in der Physiologie des Menschen, sondern bietet eine vielversprechende Aussicht auf biotechnologische Anwendungen. (Lück, 2023). Die Entwicklung genetischer Tools für *P. vulgatus* wurde ebenfalls in den letzten Jahren stark vorangetrieben (Lück & Deppenmeier, 2022; Lück, 2023; Neff *et al.*, 2023). Somit wurden bereits der *shuttle vector* pG106 als auch der Integrationsvektor pMM656 als geeignete Werkzeuge zur Protein-Überproduktion und Steuerung des Kohlenstoffflusses in *P. vulgatus* adaptiert (Lück & Deppenmeier, 2022). Zusätzlich wurde eine aus *B. subtilis* stammende Levansucrase SacB als geeigneter Gegenselektionsmarker für *P. vulgatus* identifiziert, was die

Anpassung eines markerlosen Deletionssystems an den Organismus ermöglichte (Neff *et al.*, 2023). Mit Hilfe dieser Werkzeuge konnte der Kohlenstofffluss von *P. vulgaris* bereits in die Richtung der Succinat-Produktion gelenkt und die Nebenprodukte Propionat, Formiat und Lactat eliminiert werden (Lück, 2023).

1.4 Biotechnologische Succinat-Produktion

Succinat spielt nicht nur in biochemischen Prozessen eine wichtige Rolle, sondern findet auch industrielle, sowie lebensmitteltechnologische Anwendungen. Als Salz der Bernsteinsäure dient Succinat beispielsweise als Baustein zu Herstellung von Detergenzien, Kosmetika sowie dem Kunststoff Polybutylen-Succinat (PBS) und wird zusätzlich als Lebensmittelzusatzstoff eingesetzt (Nghiem *et al.*, 2017; Saxena *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020). Damit zählt die Verbindung zu den wichtigsten Plattformchemikalien weltweit (Werpy & Petersen, 2004; Bozell & Petersen, 2010; Cok *et al.*, 2014). Um den steigenden Bedarf an Plattformchemikalien trotz der begrenzten Verfügbarkeit an fossilen Rohstoffen decken zu können, wächst die Notwendigkeit der Entwicklung von biotechnologischen, auf erneuerbaren Ressourcen basierenden Herstellungsmethoden (Nghiem *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2023).

Demnach hat die biotechnologische Herstellung mit Hilfe von Mikroorganismen in den letzten Jahren an Aufmerksamkeit gewonnen. Besonders gut eignen sich hierfür anaerobe Bakterien, welche Succinat als Endprodukt der Fumarat-Atmung bilden und somit auf natürliche Art und Weise Succinat freisetzen. Bisher erfolgten bereits vielversprechende Entwicklungen von genetischen Systemen zur Optimierung der Succinat-Produktion in verschiedenen Einzellern wie beispielsweise *Escherichia coli*, *Basfia succinogenes*, und *Mannheimia succinogenes* (Lee *et al.*, 2006; Thakker *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014; D'ambrosio *et al.*, 2021). Um eine Produktion basierend auf nachwachsenden Rohstoffen zu ermöglichen, bietet die biotechnologische Anwendung von Vertretern der Familie Bacteroidaceae, die auf den Abbau von pflanzlichen Polysacchariden spezialisiert sind, ein großes Potential (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012). Aus diesem Grund ist in den letzten Jahren der Organismus *P. vulgaris* als Mitglied der Familie Bacteroidaceae als natürlicher Succinat-Produzent in den Fokus der Produktions-Optimierung gelangt, wobei die Anwendung neuer genetischer Systeme (Lück & Deppenmeier, 2022; Neff

et al., 2023) bereits eine Steigerung der Succinat-Produktion um 95 % erreichte (Lück, 2023). Somit bergen *P. vulgatus* und auch weitere Spezies der Bacteroidaceae, wie *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* als Xylan-Verwerter (Robert *et al.*, 2007; Chassard *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2023) Potenzial zur biotechnologischen, umweltfreundlichen Succinat-Produktion.

1.5 N-Nitrosamine

N-Nitrosamine sind eine Gruppe an organischen Verbindungen, denen bereits seit 1956 mutagene Eigenschaften zugesprochen werden (Magee & Barnes, 1956). Seit der Beschreibung der Tumorbildung in der Leber von Ratten (Magee & Barnes, 1956) wurde die Karzinogenität von N-Nitrosaminen in vielen weiteren Spezies, wie unter anderem in der Maus, in Vögeln und in Affen nachgewiesen (Bogovski & Bogovski, 1981; Tricker & Preussmann, 1991).

Durch ihr ubiquitäres Vorkommen unter anderem in Lebensmitteln (Tricker & Preussmann, 1991; Park *et al.*, 2015), chlorhaltigem Wasser (Nawrocki & Andrzejewski, 2011; Nanda *et al.*, 2021) und Tabak-Produkten (Brunnemann & Hoffmann, 1991) sind Nitrosamine in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Forschung gerückt. Zusätzlich hat der Rückruf des Arzneimittels Valsartan aufgrund einer Kontamination mit N-Nitrosodimethylamin (NDMA) im Juli 2018 die Aufmerksamkeit auf mögliche N-Nitrosamin-Kontaminationen in pharmazeutisch aktiven Substanzen (API) stark erhöht (Parr & Joseph, 2019; Tuesuwan & Vongsutilers, 2021). Neben der Aufnahme von Nitrosaminen aus der Umwelt, können diese aber auch endogen im Menschen gebildet werden (Lundberg *et al.*, 2004).

Die Entstehung der Nitrosamine erfolgt zum größten Teil unter sauren oder oxidativen Bedingungen aus der Reaktion von sekundären Aminen mit einer reaktiven Stickstoffspezies wie Distickstofftrioxid (N_2O_3) oder einem Nitrosiumion (NO^+), welche sich in den meisten Fällen von Nitrit (NO_2^-) ableiten (Abb. 2) (Anselme, 1979; Lundberg *et al.*, 2004; Nanda *et al.*, 2021).

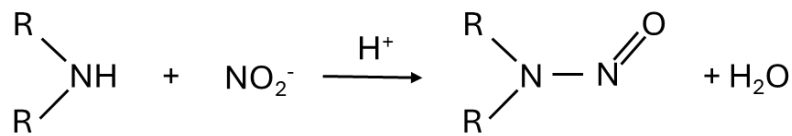


Abbildung 2: Entstehung von N-Nitrosaminen aus sekundären Aminen und Nitrit. Sekundäre Amine reagieren unter sauren oder oxidativen Bedingungen mit Nitrit und bilden so N-Nitrosamine. NO_2^- : Nitrit; R: Alkyl-Reste

Die endogene Generierung von N-Nitrosaminen findet hierbei hauptsächlich im Magen, bei saurem pH-Wert statt (Correa, 1992; Vermeer *et al.*, 2001). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass Enterobakterien als Teil der Intestinalmikrobiota, an der Entstehung von N-Nitrosaminen beteiligt sein könnten, (Calmels *et al.*, 1987; O'Donnell *et al.*, 1988; Ralt *et al.*, 1988).

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Infolge des fortschreitenden Klimawandels ist in den vergangenen Jahren die Nachfrage für umweltfreundliche industrielle Produktionsverfahren gestiegen. Unter anderem gewann so die biotechnologische und nachhaltige Herstellung von Plattformchemikalien wie Succinat immer mehr an Bedeutung. Besonders interessant sind hierfür Spezies der Familie Bacteroidaceae, die durch den Abbau von komplexen pflanzlichen Polysacchariden bereits auf natürliche Weise Succinat freisetzen. Die Anpassung und Optimierung genetischer Tools haben in den letzten Jahren ermöglicht den Kohlenstofffluss von *P. vulgatus* in Richtung Succinat-Produktion zu lenken und somit den Organismus in den Fokus der Forschung zu rücken (Lück & Deppenmeier, 2022; Lück, 2023; Neff *et al.*, 2023). Basierend auf einer bereits in Vorarbeit erstellten Dreifach-Deletionsmutante von *P. vulgatus* (Lück, 2023) war ein Ziel dieser Arbeit, die weitere Optimierung des Succinat-Ertrags durch zielgerichtete Manipulation und Kontrolle des Stoffwechselweges. Zusätzlich sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Xylanverwerter der Familie Bacteroidaceae identifiziert und deren Eignung zur biotechnologischen Succinat-Produktion durch die Anpassung der genetischen Tools überprüft werden.

Die Freisetzung von Stoffwechselend-Produkten sowie Abbau-Produkten durch Bakterien spielt jedoch nicht nur aus industrieller Sicht, sondern auch in Bezug auf die menschliche Gesundheit eine entscheidende Rolle. Während der humanen Intestinalmikrobiota eine Vielzahl an positiven Effekten hinsichtlich der Wechselwirkung mit ihrem Wirtsorganismus zugesprochen werden, gibt es auch einige Studien über deren potenzielle negativen Auswirkungen. So regte in den 1980er und 1990er Jahren vor allem die Bildung von kanzerogenen N-Nitrosaminen durch Vertreter der humanen Intestinalmikrobiota für Aufsehen. Allerdings fokussierten sich die Studien hierbei hauptsächlich auf Spezies der Enterobacteriaceae. Dementsprechend war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Bildung von N-Nitroso-Verbindungen ausgehend von aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API) mit sekundären Amin-Gruppen durch verschiedene Vertreter der menschlichen Darmmikrobiota. Diese Untersuchungen waren Teil der Studie *Endogenous formation of nitrosamines from drug substances* (GITox) der *European medicines agency* (EMA) und wurden in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) und dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und weitere Materialien

2.1.1 Chemikalien

Sofern nicht anders vermerkt, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Fluka (Sigma Aldrich, München, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder VWR (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Chemikalien entsprachen mindestens der Qualitätsstufe *pro analysis* (p.a.).

2.1.2 Gase

Die verwendeten Gase CO₂ (99,9 %), N₂ (99,9 %) H₂ (99,9 %) und Ar (99,9 %) wurden im technischen Reinheitsgrad von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Zur anaeroben Begasung wurden die Gase N₂ und CO₂ über eine Gasmischanlage in einem Mischungsverhältnis von 80 % N₂ : 20 % CO₂ verwendet.

2.1.3 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sowie deren Bezugsquelle sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
OneTaq-Polymerase	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Klonierung	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Q5-High-Fidelity DNA-Polymerase	Kolonie-PCR	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
DNase I	Verdau von DNA	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)

DpnI-Restriktions- Endonuklease	Entfernen von methylierter DNA	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Lysoszym from chicken egg	Zelllyse	Sigma Aldrich (München, Deutschland)
<i>Bsa</i> I	Restriktionsverdau	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)

2.1.4 Antibiotika

Die in dieser Arbeit verwendeten Antibiotika dienten als Selektionsmarker bei Klonierungen, zur Gewährleistung der Reinheit von Kulturen und zur Erstellung eines Antibiotogrammes. Die Namen der Antibiotika, sowie deren entsprechenden Konzentrationen und Lösungsmittel sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration (µg/ml)
Erythromycin 100	100 % Ethanol	100
Erythromycin 200	100 % Ethanol	200
Carbenicillin 100	50 % Ethanol	100
Carbenicillin 200	50 % Ethanol	200
Gentamycin 200	rH ₂ O	200
Gentamycin 300	rH ₂ O	300
Tetrazyklin 10	70 % Ethanol	10
Tetrazyklin 20	70 % Ethanol	20

2.1.5 Pharmazeutisch aktive Wirkstoffe (API)

Zur Untersuchung der Nitrosierung von aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API) durch Darmbakterien, wurden die in Tabelle 3 aufgelisteten APIs in ihrer jeweiligen Tageshöchstdosis eingesetzt. Diese Informationen wurden von den nationalen Experten im Rahmen des EMA-Projektes mitgeteilt. Die Chemikalien wurden vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3: Verwendete APIs

Name (API)	Tageshöchst-dosis	Konzentration im Versuchsansatz ^{a)} [mg/L]
Enalapril	20 mg	40
Fluoxetin	60 mg	120
Methylphenidat	60 mg	120
Metoprolol	100 mg	200
Propranolol	160 mg	320

a) Konzentration berechnet anhand der Tageshöchstdosis und ausgehend von einem Magenvolumen nach Nahrungsaufnahme von 0,5 L (Shiller *et al.* 2005; Perlas *et al.* 2009; Kim *et al.* 2020)

2.1.6 Kits

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Kits

Kit	Verwendung	Hersteller
Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Total RNA Miniprep Kit	Aufreinigung von RNA	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Monarch® Plasmid Miniprep Kit	Aufreinigung von Plasmiden	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes	Gezielte Klonierung von Fragmenten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Luna® Universal qPCR Master Mix	Quantitative Echtzeit-Bestimmung von PCR-Produkten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit	Umschreibung von RNA in cDNA und quantitative Echtzeit-Bestimmung von PCR-Produkten	New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland)
Nano-Glo® Luciferase Assay System	Biolumineszenz Messung zum Nachweis des funktionsfähigen Rhamnosepromotors	Promega (Madison, USA)

NEB® Instant Sticky-end
Ligase Master mix

Ligation von DNA-Fragmenten

New England Biolabs
(Frankfurt am Main,
Deutschland)

2.1.7 DNA-und Protein-Marker

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

2.1.8 Software und Datenbanken

Die in dieser Arbeit verwendeten Softwares und Datenbanken sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Verwendete Software und Datenbanken

Name	Verwendung
Microsoft Office 365	Tabellenkalkulation, Textverarbeitung, Erstellung von Abbildungen
Clustal Ω	Multisequenz-Alignment
NEBuilder Assembly Tool	Generierung spezifischer Primer für Klonierungen mithilfe des NEBuilder® HiFi DNA <i>Assembly</i> Master Mixes
NEBiocalculator	DNA-Konzentrationsbestimmung der DNA-Fragmente, welche für die Assemblierung eingesetzt wurden
KEGG	Informationen zu Nukleotidsequenzen und Proteinen, Analyse von Stoffwechsel-Prozessen
NCBI BLAST	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen
Snapgene 1.1.3	Planung, Visualisierung und Dokumentation von Klonierungen und PCR-Reaktionen, Analyse von DNA-Sequenzen
SciDavis	Erstellung von Funktionsgleichungen

GraphPad Prism 8.0	Erstellung von Graphen, Analyse, Berechnung der IC50 und Signifikanzberechnung (<i>two way anova</i> und <i>one sample t-test</i>)
Primer 3	Erstellung von Oligonukleotiden für (RT-)qPCR
Magellan 6	Steuerung des Tecan Plattenlesegerätes
Zotero 7.0.11	Literaturverwaltung und Zitationsmanagement

2.1.9 Dienstleistungen

2.1.9.1 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten zur Verifizierung von generierten Plasmiden sowie genetischen Modifikationen in den Zielorganismen erfolgte durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Hierfür wurden die entsprechenden Fragmente nach der PCR mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA *Cleanup* Kit (Tab. 4) aufgereinigt und anschließend 5 µl der DNA mit 5 µl eines geeigneten Sequenzierungs-Primers (10 pmol µl) versetzt. Die Auswertung der Sequenzdateien erfolgte unter der Verwendung des Programmes Snapgene 1.1.3 (Tab. 5).

2.1.9.2 Untersuchung von N-Nitroso-Verbindungen

Die Untersuchung der Inkubationsansätze von Darmorganismen mit verschiedenen API auf N-Nitroso-Verbindungen erfolgte mittels LCMS (*liquid chromatographie/ mass spectrometrie*) am BfArm (Bonn, Deutschland) durch Herrn Dr. Matthias Vogel. Hierfür wurden die Proben nach der 24-stündigen Inkubationszeit in eine 96-Well-Platte überführt, 1:1 mit Acetonitril versetzt, und bis zur Übergabe bei -20°C gelagert. Nach dem Erhalt der Signalstärken der einzelnen Proben sowie der Kontrollansätze in einer Excel-Datei, wurden diese zur Auswertung untereinander verglichen.

2.2 Organismen, Oligonukleotide und Vektoren

2.2.1 Organismen

Alle, in dieser Arbeit verwendeten, Organismen sind in Tabelle 6 beschrieben.

Tabelle 6: Verwendete Organismen

Organismus	Genotyp	Quelle
<i>Escherichia coli</i> NEB®5-alpha	<i>fhuA2</i> Δ (<i>argF-lacZ</i>) U169 <i>phoA</i> <i>glnV44</i> Φ 80 Δ (<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>thi-1</i> <i>hsdR17</i>	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>Escherichia coli</i> 10 β	Δ (<i>ara-leu</i>) 7697 <i>araD139</i> <i>fhuA</i> Δ <i>lacX74</i> <i>galK16</i> <i>galE15</i> <i>e14-</i> ϕ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i> (<i>Str^R</i>) <i>rph</i> <i>spoT1</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>)	New England Biolabs (Ipswich, USA)
<i>E. coli</i> β 2155	<i>thrB1004</i> <i>pro</i> <i>thi</i> <i>strA</i> <i>hsdsS</i> <i>lacZD</i> M15 (F' <i>lacZ</i> Δ M15 <i>lacIq</i> <i>traD36</i> <i>proAB+</i>) Δ <i>dapA::erm</i> (EryR) <i>pir::RP4</i> [::kan (KanR) aus SM10]	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Phocaeicola vulgatus</i> DSM 1447	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Phocaeicola vulgatus</i> Δ 0309- 0310 Δ 2499 Δ 2880 (Bezeichnet als <i>P. vulgatus</i> 3xKO)	Δ <i>bvu_0309-0310</i> Δ <i>bvu_2499</i> Δ <i>bvu_2880</i>	Lück, 2023; Gindt et al., 2024
<i>Bacetroides cellulosilyticus</i> DSM 14838	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Bacetroides intestinalis</i> DSM 17393	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Bacetroides xylanisolvens</i> DSM 18836	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Bacetroides graminisolvens</i> DSM 19988	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Phocaeicola dorei</i> DSM 17855	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)

<i>Escherichia coli</i> MC4100 (bezeichnet als <i>E. coli</i>)	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Agathobacter rectalis</i> DSM 17629	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Hominimerdicola aceti</i> DSM 102216	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Roseburia intestinalis</i> DSM 14610	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Bifidobacterium longum</i> <i>infantis</i> DSM 20088 (Bezeichnet als <i>B. longum</i>)	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)
<i>Akkermansia muciniphila</i> DSM 22959	WT	DSMZ (Braunschweig, Germany)

2.2.2 Oligonukleotide

Die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer wurden händisch, mit Hilfe des NEBuilder Assembly Tool (New England Biolabs) oder mit Hilfe des Programms Primer 3 erstellt. Die Synthese der Primer erfolgte durch Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Die Sequenzen der Primer, die für Klonierungen, Kolonie-PCR, RT-qPCR oder Sequenzierungen in dieser Arbeit eingesetzt wurden, sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Sequenzen aller verwendeten Oligonukleotide.

Primer	Sequenz (5' -> 3')
pg106 screening fw	CGATCGGTGCGGGCCTCTTC
pg106 screening rev	AGTTAGCTCACTCATTAGGC
qPCR_0309_fw	ACTCCGGACGACTTCTCTGA
qPCR_0309_rev	GACTGCTTCCAGCATTCTC
qPCR_ldh_fw	TTACGGTGCGGTTGATGTTA
qPCR_ldh_rev	TGTTACGGGCAAAATTGTA
qPCR_2880_fw	GAACGTGCCAATAACGGAGT
qPCR_2880_rev	ATGGCAGGCTTTTTCTACGA
Pg106_bb_fw	AATAGCATGCAAGCTTGG
Pg106_bb_rev	AATTGTTTTTCCATTTATAGTTCATATAAATAAC
BVU_2796_fw	CTATAAATGGAAAAACAATTATGAGTTTACCACATAGTTTATTTTT G

BVU_2796_rev	CGCCAAGCTTGCATGCTATTTTACAATTTACAGTATAAATTGGAAT G
Scr_TKT_fw	TGCGTAAGGAGAAAATACCG
scr_TKT_rev	GTGAGTTAGCTCACTCATTAGG
Scr G6PDH fw	TGTCATTGAAATGCTGTCTAAGG
Scr G6PDH rev	GATCTATGTAGAATACAATGGCGA
BB pG106 fw	TCAAAACGAAAAACAGAAATAGAG
BB pG106 rev	GGCGCTACTTAGTAGCTC
AS_G6PDH fw	TAGAGCTACTAAGTAGCGCCTAACGTTTGCAGAATTGTC
AS_G6PDH rev	ATTTCTGTTTTTCGTTTTGATTACAATTTACAGTATAAATTGGAATG
pMM656_Ko_BB_fw	AGTTCGAGAGCCTGTCTC
pMM656_Ko_BB_rev	GGAGGGGAATTCCCATGTC
up_3787_fwd_neu	TGACATGGGAATTCCCCTCCATATACGTTAGTGGAGTTTG
up_3787_rev_neu	CATATATACTAACAATTACTAATTATTAGGTAATAAAATCTATTC
down_3787_fwd_neu	TAGTAATTGTTAGTATATATGAGGTCACCC
down_3787_rev_neu	GAGAGACAGGCTCTCGAACTGGCATAATAATGACGTTTG
pMM656sacB seq_fw	GAGAGCCTGTCTCTCCGCAA
pMM656sacB seq_rev	ACGGCTAAAAACAATAGGCC
scr-pMM656_up_fw	ATCAGCAACTTAAATAGCCTCTAAG
scr-pMM656-down_rev	CAATGAAACCTATCCACTCTTGAT
qPCR_BVU0876_for	CGGTGATTGTTGCTACCCAG
qPCR_BVU0876_rev	GCAATCTTGCCATCGTCTT
scr_KO_BVU0876_for	GATAAGCATCTACCGTATTGTCA
Scr_KO_BVU0876_rev	GTGTTATCGGCAATGATGTATC
pASK for	GAGTTATTTTACCACTCCCT
pASK rev	CGCAGTAGCGGTAAACG
PASK5_Bvu_3358_fw	ATGGTAGGTCTCAGCGCCGATAAAAAAAGAGTTTACACCTTTGG
PASK5_Bvu_3358_rev	ATGGTAGGTCTCATATCATTCTCAACGGCGGCCTGAGC
up_3787_fwd_neu	TGACATGGGAATTCCCCTCCATATACGTTAGTGGAGTTTG
up_3787_rev_neu	CATATATACTAACAATTACTAATTATTAGGTAATAAAATCTATTC
down 3787_fwd_neu	TAGTAATTGTTAGTATATATGAGGTCACCC
down 3787_rev_neu	GAGAGACAGGCTCTCGAACTGGCATAATAATGACGTTTG
seq delta3787 neu fw	GATCACTCATGTCTGTTCATCAAC
seq delta3787 neu rev	GTCATTATACATATCCTTTTCTTTCAATGT
bvu 0523 up_fw_fwd	TGACATGGGAATTCCCCTCCACCACCACAACAGCGGCC AACAATAAAAGATAATATATTAATTATGTACGTTCTAAAGACGAGT GTTG
bvu 0523 up_fw_rev	
bvu 0524 down_fw	TAATATATTATCTTTTATTGTTTGTTAAATATATAAATTATAGAAG
bvu 0524 down_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTAGTGAAGAAGCTAAATTGG
qPCR_BVU_0523_fw	GCAGTTTGTACCGCTCAGAC
qPCR_BVU_0523_rev	CTGCAATTTCTGATCCCGGG
Operon_up_fw	TGACATGGGAATTCCCCTCCTCTGCAAAATCCTCTCC

Operon_up_rev	AGTAATTCTTGCCTTTATTTTTGATTTTAAGGAATTAATAG
Operon_down_fw	AAATAAAGGCAAGAATTACTATATTTGTAGCATACTG
Operon_down_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTGTACGCGATTTATCTTTTG
0595/0596_down_fw	AAATAAAGGCTCAATATCCAACACTACAAGATTG
0595/0596_down_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTACGTTACTGAAAGTAACATTC
qPCR 0595 fw	ACCAACCAACCTGTACCACA
qPCR 0595 rev	CACTGGGACCTGCTATGACA
qPCR 0596 fw	CGAACTGATGCTGCACGTAA
qPCR 0596 rev	CAGTTTGGCAATCGGTTCCA
qPCR 0597 fw	CCTACTGGCAGGTGTGATGA
qPCR 0597 rev	GTTGCAGACAGTAAACCGCA
scr delta Op fw	ATTTCCGTTTCATACTGGCTG
scr delta Op rev	TTGTGAGACAGGGCAATCAG
pMM656bb_fwd	TATAACCTCTCCTTAATTTATTGC
pMM656bb_rev	TGTATCGCTATTTAATAGTTATAAAATATTTAAC
TetQ_pMM656_fwd	AACTATTAAATAGCGATACATTATTTTGATGACATTGATTTTTGG
TetQ_pMM656_rev	TAAATTAAGGAGAGGTTATAATGAATATTATAAAATTTAGGAATTCT TGC
Scr_pMM656_TetQ_fw	GGACTTTACATCGTCCTGAAAG
Scr_pMM656_TetQ_rev	GAAACACATAGAAAAGTTGCTGATAT
screen_pMM656_fw	ACACTTAACGCTGACATGG
screen_pMM656_rev	CACTGGAAGATAGGCAATTAG
Bac_16S2_for	TCAGYTGTAAGTTTGS
Bac_16S2_rev	GTRTATCGCMAACAGCGAGTAT
656_TetQ_BB_RP fw	TGAACTGCACTTGCTTTG
656_TetQ_BB_RP rev	GGTATTTTGTCTATATATTTAAGGTATC
BVU_3787 fw	AAATATATAGACAAAATACCATGACTAAACAAAAAATTCATCAC
BVU_3787 rev	ATCAAAGCAAGTGCAGTTCATTATTCACCCAATTCATTG
scr 656_tetQ_BVU3787 fw	CAGCAACTTAAATAGCCTCTAAGGT
scr 656_tetQ_BVU3787 rev	TGATGGATTTCATACAAGCGGTC
attB for	CGTTGTACTGCGAGGTACC
seq_delta3787_fw	TACATTAAGTATCTGGCAGATGCG
seq_delta3787_rev	CTGTTGGTCGGTCATTATCAGTA
qPCR_0523_fw	GCAGTTTGTACCGCTCAGAC
qPCR_0523_rev	CTGCAATTTCTGATCCCGGG
qPCR_0524_fw	TTTCTGCCATTCTGCCAAC
qPCR_0524_rev	CGCCAAGGAATTCGCATACA
Seq Rham Fw	ATCAATTCCGTGATAGGTGG
Seq Rham Rev	CAGCAGCCATATCCATAACTT
BcellWH2_04704	ATGCGTACAAATTCAGTCACGAGG
BcellWH2_04746	GATTATTTAGGCATAGGGCTGCG
Bxy_12020 up_fwd	TGACATGGGAATTCCTCCTGACGAATACGGGAACAAAC

Bxy_12020 up_rev	CAGAATTTCCAGTTTATCTAAAATTAAAACAAGATTAATATTGTC
Bxy_12030_down_fwd	TAGATAAACTGGAAATTCTGATGGATGAAG
Bxy_12030_down_rev	GAGAGACAGGCTCTCGAACTGTAGAAAATGAATCCGCC
scr_Bxy 12020 up_rev	GCATCTTCCTCCGATTTAGTC
scr_Bxy 12030 down_fw	GCTGGAGTCCCACAATAAA
qPCR_bvu2317_for	AAGGCATCAGCATGACATTG
qPCR_bvu_2317_rev	CTTTTCAATGCGCTTTTGGT
qPCR_bvu0050_for	GATAAAGGATGCCGGAATGA
qPCR_bvu0050_rev	CCTGCGAACCTGTATTGTT
qPCR_bvu2318_for	TGCTGTTACCAGCGAAGATG
qPCR_bvu2318_rev	AACTGGAATCATCCGCTTTG
qPCR_bvu4109_for	AGAAACCGCCTTAGCTTTCC
qPCR_bvu4109_rev	AACGACCGCCTACATTATCG
qPCR_bvu2796_for	GGCGATGTGTCTGTATGTGG
qPCR_bvu2796_rev	ATGGCTATGCGCTGAAGAAT
qPCR_bvu2795_for	GGCAAAAGCTGAGGATGGTA
qPCR_bvu2795_rev	CAGACGTCCTTTGTCCCATT
qPCR_bvu3333_for	ATTGCCACCAATTACGAAGG
qPCR_bvu3333_rev	GCCGACAAACGGAGATACAT
qPCR_l23_for	TCGATTCGGCTTTATTGTACG
qPCR_l23_rev	CGCCTTCTTTCAATGTTACGA

2.2.3 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten und erstellten Vektoren sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 8: Verwendete Vektoren

Vektor	Beschreibung	Quelle
pMM656	Rhamnose-induzierbare <i>nanoluc</i> Expression, pNBU2-Rückgrat, <i>AmpR</i> , <i>EryR</i>	Mimee <i>et al.</i> , 2015
pMM656_IdhnP_sacB	Derivat von pMM656, mit 257 bp der 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>sacB</i> aus <i>B. subtilis</i>	Neff <i>et al.</i> , 2023
pMM656_Δ0876	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens <i>bvu_0876</i>	Diese Arbeit

2. Material und Methoden

pMM656_Δ3787	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp <i>up-</i> und <i>downstream</i> des Gens <i>bvu_3787</i>	Diese Arbeit
pMM656_Δ0523-0524	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp upstream des Gens <i>bvu_0523</i> und 1000 BP <i>downstream</i> des Gens <i>bvu_0524</i>	Diese Arbeit
pMM656_Δ0595-0596	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp upstream des Gens <i>bvu_0595</i> und 1000 BP <i>downstream</i> des Gens <i>bvu_0596</i>	Diese Arbeit
pMM656_Δ0595-0597	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp upstream des Gens <i>bvu_0595</i> und 1000 BP <i>downstream</i> des Gens <i>bvu_0597</i>	Diese Arbeit
pMM656_TetQ_nanoluc	Derivat von pMM656, <i>AmpR</i> , <i>TetQ</i>	Diese Arbeit
pMM656_RP_3787	Derivat von pMM656_TetQ_nanoluc mit dem Sequenz des Gens <i>bvu_3787</i>	Diese Arbeit
pMM656 mit Δ12020-12030	Derivat von pMM656 mit <i>sacB</i> und 1000 bp upstream des Gens <i>bxy_12020</i> und 1000 BP <i>downstream</i> des Gens <i>bxy_12030</i>	Diese Arbeit
pG108	<i>ErmAM</i> , <i>TetQ</i> , <i>origin of replication</i> für <i>Bacteroides</i> spp.	Jones <i>et al.</i> , 2020
pG106	<i>ErmAM</i> , <i>ErmF</i> , <i>origin of replication</i> für <i>Bacteroides</i> spp	Jones <i>et al.</i> , 2020
pG106_p2499_tkt	Derivat von pG106, mit 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>bvu_2318</i>	Lück, 2023; Gindt <i>et al.</i> , 2024
pG106_p2499_g6pdh	Derivat von pG106, mit 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>bvu_2796</i>	Diese Arbeit
pG106_tkt_g6pdh	Derivat von pG106_p2499_tkt, mit zusätzlicher 5'-UTR des Gens <i>bvu2499</i> und Sequenz des Gens <i>bvu_2796</i>	Diese Arbeit

pASK5	Induzierbarer Tet-Promotor, <i>AmpR</i> , N-terminales Strep-tag	IBA (Göttingen, Deutschland)
pASK5_ <i>Bvu</i> _3358	Derivat von pASK5, mit Sequenz des Gens <i>bvu</i> _3358	Diese Arbeit

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Medien und Kultivierung von *E.coli*

Die aufgeführten Medien wurden vor Verwendung zur Sterilisation für 20 min bei 121°C autoklaviert. Zur Herstellung von Agarplatten wurde vor dem Autoklavieren 1,5 % (w/v) Agar zu dem jeweiligen Medium hinzugefügt. Für die Kultivierung von *E. coli* β 2155 wurden dem Medium und den Agarplatten, nach ausreichender Abkühlung, 0,3 mM DAP zugesetzt. Je nach Bedarf wurden dem Medium und den Agarplatten zusätzlich Antibiotika zugesetzt. Die Kultivierung aller *E. coli* Stämme erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37°C und 180 rpm in LB (Lysogeny-Broth) -Medium. Zur aeroben heterologe Überproduktion von Proteinen in *E. coli* wurde das nach Mott *et al.* (1985) modifizierte *Maximal induction*-Medium (MI-Medium) verwendet. Dem autoklavierten Basis-Medium wurden M9-Salze in einfacher Endkonzentration hinzugefügt.

LB-Medium (Lysogeny-Broth)

Substanz	Menge
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
dH ₂ O	ad 1000 ml
pH 7,1 eingestellt mit NaOH	

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

Substanz	Menge
Trypton	32 g
Hefeextrakt	20 g
M9-Salze	50 ml
dH ₂ O	ad 950 ml

20x M9-Salze

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

2.3.2 Medien und Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen

Zur Anzucht von *P. vulgatus* sowie den restlichen anaeroben Organismen wurde PY-, BHI-, DMM- oder Shime®-Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgte unter anaeroben Bedingungen ohne schütteln bei 37°C in 100 ml Serumflaschen bei einem Kulturvolumen von 50 ml. Nach der Erstellung der Medien in dH₂O wurde der Sauerstoffindikator Resazurin zugesetzt (1mg/ml). Dieser, in Gegenwart von Sauerstoff, blauer Indikator (Resazurin), wechselt unter reduktiven Bedingungen die Farbe zu Pink (Resofurin) und wird letztendlich farblos (Dehydroresofurin). Als nächstes wurde der pH-Wert der jeweiligen Medien mit KOH auf pH 8 eingestellt. Anschließend wurden die Medien zur Anaerobisierung erst 10 min mit N₂ und dann bis zum Erreichen von pH7 (durch die Ansäuerung mit CO₂) mit einem N₂/CO₂ Gemisch (80%/20%, v/v) begast. Um die anaeroben Bedingungen zu gewährleisten, wurden die Serumflaschen nach dem Begasen mit einem Butyl-Gummistopfen und einer Metallkrampe abgedichtet. Zur Sterilisation der Medien wurde diese für 20 min bei 121°C autoklaviert. Vor der Inokulation wurden die Medien mit 1 ml/L Hämin (0,5 mg/L), 1 ml/L Wolin (0,4% v/v) (Wolin *et al.*, 1963) und 0,2 ml/L Vitamin K1 (1 µl/L) versetzt. Zusätzlich wurden 2ml/L L-Cystein (12,5 g/50ml) als Reduktionsmittel für den Restsauerstoff verwendet. Dem DMM-Medium wurde schließlich Glukose oder Xylose in der gewünschten Konzentration als Substrat sowie 1ml/L Butyrat (2M) beigelegt. Zum Gießen von anaeroben Agarplatten wurden diese entweder analog zu den Medien begast und unter dem anaeroben Zelt gegossen oder die Platten wurden

unter aeroben Bedingungen unter der Sterilbank vorbereitet und über Nacht im anaeroben Zelt anaerobisiert.

BHI-Medium (Brain heart Infusion broth)

Substanz	Menge
Brain-Heart Infusion Broth	37 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

PY-Medium (Modifiziert nach DSMZ Nr. 104) + Py Salze

Substanz	Menge
Pepton aus Soja	5 g
Trypton aus Casein	5 g
Hefeextrakt	10 g
Fleischextrakt	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
PY-Salzlösung	40 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml

PY-Salzlösung

Substanz	Menge
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,25 g
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
NaHCO ₃	10 g
NaCl	2 g
dH ₂ O	ad 1000 ml

DMM-Medium

Substanz	Menge
NaHCO ₃	4 g
KH ₂ PO ₄	1,7 g
K ₂ HPO ₄	2,2 g
NaCl	0,9 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	26 mg
NH ₄ Cl ₂	0,75 g
FeSo ₄ -Lösung	1 ml
SL-6-Lösung	2 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml

SL6-Lösung

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

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

Substanz	Menge
Biotin	20 mg
Folsäure	20 mg
Pyridoxin x HCl	100 mg
Thiamin x HCl	50 mg
Na-Riboflavin	50 mg
Nicotinsäure	50 mg
Ca-Pantothenat	50 mg
Vitamin B12	1 mg
<i>p</i> -Aminobenzoat	50 mg
α -Liponsäure	50 mg
dH ₂ O	ad 1000 ml

Hämin-Lösung (sterilfiltriert)

Substanz	Menge
Hämin	50 mg
1 M NaOH	1 ml
dH ₂ O	ad 100 ml

Vitamin K1-Lösung (sterilfiltriert)

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

FeSO4-Lösung

Substanz	Menge
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	278 mg
HCl (konzentriert)	2 Tropfen
dH ₂ O	ad 1000 ml

Cystein

Substanz	Menge
L-Cystein	12,5 g
dH ₂ O	ad 50 ml

Shime®-Medium

Substanz	Menge
Xylan aus Haferspelz	1 g
Glucose (separate autoklaviert)	1.8 g
Hefeextrakt	0.3 g
Lösliche Stärke aus Mais	0.3 g
Pepton aus Fleisch	0.3 g
Mucin (75-95 % aus Schweinemagenschleimhaut)	1 g
Pektin aus Äpfeln	1 g
NaHCO ₃	2.5 g
NaCl	2 g
K ₂ HPO ₄	7.4 g
KH ₂ PO ₄	5.8 g
NH ₄ Cl	1 g
Shime® Salze	1 ml
H ₂ O _{dest}	Ad 1000 ml

Shime®-Salze

Substanz	Menge
K ₂ HPO ₄	56 g
KH ₂ PO ₄	44 g
NaHCO ₃	25 g
NaCl	20 g
NH ₄ Cl	10 g
CaCl ₂	80 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	80 mg
dH ₂ O	ad 1000 ml

2.3.2.1 Kultivierung von *P. vulgatus* im anaeroben Kleinfermenter

Zur Durchführung einer Fed-Batch Fermentation von *P. vulgatus* im Kleinfermenter wurde ein *benchtop* Bioreaktorsystem von DASGIP® (Jülich, Deutschland) verwendet. Zur Gewährleistung der anaeroben Bedingungen, wurde dieser nach der Sterilisation ins anaerobe Zelt eingeschleust und über einen Sterilfilter der Luftaustausch garantiert. Als Wachstumsmedium

dienten 500 ml DMMX und eine Ausgangskonzentration von 36 mM Xylose. Das Medium wurde mit einer Vorkultur zu einer Start-OD von 0,5 angeimpft. Ein Magnetrührer diente dem Mischen der Bakterien bei 100 rpm und über eine Heitz-Manschette wurde die Inkubation bei 37°C gewährleistet. Zur Überwachung des pH-Wertes wurde eine pH-Sonde angebracht. Um die Ansäuerung des Mediums, durch die während der Kultivierung von den Bakterien produzierten kurzkettigen Fettsäuren zu verhindern, und den pH-Wert bei 7 aufrecht zu halten, wurde mit Hilfe einer an die pH-Sonde gekoppelten, vollautomatischen Pumpe und KOH (2 M) gegentitriert. Bei Bedarf wurde mit Xylose und Spurenelementen nachgefüttert. Die Entnahme der Kultur zur Bestimmung des Zellwachstums und der Bildung von Endprodukten, sowie zur Überwachung des Xyloseverbrauchs erfolgte mit Hilfe einer Spritze (1 ml).

2.3.3 Stammerhaltung der verwendeten Mikroorganismen

Die kurzfristige Lagerung aller verwendeter Stämme erfolgte in Flüssigkultur bei 4 °C. Für die langfristige Lagerung wurden die verwendeten Mikroorganismen bei -70 °C kryokonserviert. Im Falle der *E. coli* Stämme wurden hierfür 800 µl einer auf LB gewachsenen Übernachtskultur mit 200 µl sterilem Glycerol (100 %) in 1,5 ml Kryoröhrchen versetzt. Zur Reaktivierung der Kulturen wurde unter der Sterilbank mit Hilfe einer sterilen Impföse etwas Material für die Inokulation eines Kulturmediums aus dem Kryogefäß entnommen. Die langfristige Konservierung der anaeroben Stämme erfolgte in 10 ml Serumflaschen mit Butyl-Gummistopfen. Hierfür wurde eine Übernachtskultur 1:1 mit 2 ml sterilem, anaerobem 50 %-Glycerol vermischt. Zur Reaktivierung der anaeroben Kulturen wurden diese auf Eis und unter steriler N₂-Begasung so lange angetaut, bis einige Tropfen der Kryokultur für eine Inokulation entnommen werden konnten.

2.3.4 Messung der optischen Dichte und Bestimmung der Wachstumsparameter

Zur Quantifizierung des Wachstums bakterieller Zellsuspensionen wurde die optische Dichte der Kulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD₆₀₀) bestimmt. Ab einer OD₆₀₀ von 0,3 wurden die Proben mit Medium verdünnt, um den Effekt der Mehrfachstreuung zu verhindern. Zur Bestimmung des Leerwertes wurde das entsprechende Medium verwendet. Da sich die

anaerobisierten Kulturmedien aufgrund des beinhalteten Redoxindikators Resazurin bei Sauerstoffkontakt verfärben, wurde vor der Messung jeweils mit einer Pipettenspitze ein wenig Natriumdithionit zugegeben. Dies ist ein starkes Reduktionsmittel und verhindert somit den Farbumschlag des Redoxindikators.

Die kontinuierliche Analyse des Wachstumsverhaltens von Mikroorganismen zur Erstellung von Wachstumskurven erfolgte in einem Plattenlesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) welches sich in einer anaeroben Kammer befand. Die Kultivierung erfolgte in 600 µl in einer 48-Well Platte bei 37°C. Die Messung der optischen Dichte erfolgte alle 20 Minuten nachdem die Platte für 30 Sekunden bei 250 rpm geschüttelt wurde.

Zur Bestimmung der Wachstumsrate μ und der Verdopplungszeit t_d wurde die optische Dichte logarithmisch gegen die Zeit aufgetragen, wodurch sich die exponentielle Wachstumsphase als einen linearen Bereich darstellen ließ. Anhand der Steigung konnten die Wachstumsrate und die Verdopplungszeit mit Hilfe folgender Formeln berechnet werden. Hierbei entsprechen t und t_0 zwei Zeitpunkten innerhalb des exponentiellen Wachstumsverlaufs und N_t und N_0 den zugehörigen OD_{600} -Werten.

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

$$\text{Verdopplungszeit } t_d = \ln(2)/\mu$$

2.3.5 Erstellung eines Antibiotogramms mittels Agardiffusionstest

Zur Analyse der Sensitivität der Organismen gegenüber verschiedenen Antibiotika beziehungsweise zur Erstellung eines Antibiotogramms wurde ein modifizierter Kirby-Bauer-Agardiffusionstest (Biemer, 1973) durchgeführt. Bei diesem Test werden runde, in Antibiotika getränkte Plättchen, auf beimpfte Agarplatten verteilt, so dass die Testsubstanz in den Agar diffundieren kann. Mit zunehmender Entfernung zum Plättchen nimmt die Antibiotika-Konzentration im Agar ab. Ist ein Organismus sensitiv gegenüber einer Substanz, so bildet sich ein Hemmhof um das Plättchen. Der Durchmesser dieses Hemmhofes verhält sich proportional zu der Sensitivität.

Zur Durchführung des Testes wurden die zu untersuchenden Stämme in BHI-Medium bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bis zur exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurden

die ausgewachsenen Kulturen von *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens* flächenmäßig auf anaeroben BHI-Agarplatten ausgestrichen.

Die Agardiffusionsplättchen mit 2 mm Durchmesser wurden in der vorliegenden Arbeit aus Whatman® Filterpapier ausgestampft und mit den zu testenden Antibiotika (Tetracyclin 10 und 20 µg/ml, Erythromycin 100 und 200 µg/ml, Gentamycin 200 und 300 µg/ml und Carbenicillin 100 und 200 µg/ml, Tab. 2) getränkt. Nach dem diese getrocknet waren wurden je zwei Plättchen auf den beimpften Agarplatten verteilt. Diese wurden 24-48 h bei 37°C unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Abschließend wurde der Radius des Hemmhofs ausgehend von der Mitte des Antibiotikum-Plättchen bis zum gewachsenen Zellrasen mit Hilfe eines Lineals bestimmt.

2.3.6 Herstellung einer synthetischen Darmmikrobiota

Die hohe Diversität der menschlichen Darmmikrobiota mit über 1000 verschiedenen Arten (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014; Blanco-Míguez *et al.*, 2023) macht es schwierig jede einzelne Spezies in der Wechselwirkung mit dem Wirtsorganismus zu untersuchen. Da es allerdings auch zwischen den einzelnen Organismen zu Wechselwirkungen kommt, ist es wichtig die verschiedenen Spezies nicht nur einzeln, sondern auch als ganze Mikrobiota zu betrachten. Um diesem Kriterium bestmöglich nachzukommen, wurde eine synthetische Darmmikrobiota erstellt.

Die Zusammensetzung des synthetische Darmmikrobiota beruht auf dem *core species concept* nach King *et al.* (2019) und beinhalten die Spezies, die in der Mehrheit der Menschen vertreten sind. In der vorliegenden Arbeit wurden folglich elf Vertreter des Kolons für die Untersuchung der Auswirkung der Darmmikrobiota auf die Nitrosierung von APIs gewählt.

Diese auserwählten Vertreter repräsentieren die prominentesten Phyla der Bacteroidota, Bacillota und Proteobacteria. Zudem decken die Spezies etwa 80 % der häufigsten vertretenen Gattung ab. Die verwendeten Spezies sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Verwendete Spezies zur Erstellung der synthetische Darmmikrobiota und deren Abundanz im menschlichen Darm

Spezies	Phylum	Durchschnittliche ^{a)} Abundanz [%]
<i>Phocaeicola (P.) dorei</i>	Bacteroidota	17.4
<i>Phocaeicola (P.) vulgatus</i>	Bacteroidota	15.0
<i>Agathobacter (A.) rectalis</i>	Bacillota	6.2
<i>Bacteroides (B.) xylanisolvens</i>	Bacteroidota	4.9
<i>Faecalibacterium (F.) prausnitzii</i>	Bacillota	3.5
<i>Bacteroides (B.) cellulosilyticus</i>	Bacteroidota	3.4
<i>Ruminococcus (R.) bicirculans</i>	Bacillota	2.5
<i>Escherichia (E.) coli</i> MC4100	Proteobacteria	1.9
<i>Roseburia (R.) intestinalis</i>	Bacillota	1.1
<i>Bifidobacterium (B.) longum</i>	Actinomycetota	0.7
<i>Akkermansia (A.) muciniphila</i>	Verrucomicrobia	0.7

a) Durchschnittliche Häufigkeit im Dickdarm, berechnet anhand der Analyse von Stuhlproben von mehr als 200 gesunden Menschen (King *et al.* 2019)

Zur Erstellung der synthetische Darmmikrobiota wurden die einzelnen Stämme in 50 ml BHI-Medium bei 37°C unter anaeroben Bedingungen bis zum Ende der exponentiellen Phase kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen geerntet, in 2 ml Shime®-Medium resuspendiert und die optische Dichte (OD₆₀₀) bestimmt. Als nächstes wurden die einzelnen Organismen nach ihrer Abundanz im Kolon (King *et al.*, 2019) zusammen gemischt. Hierfür wurde die jeweilige OD auf die von *E. coli* als Referenzstamm normiert und mit dem prozentualen Vorkommen (Tab. 9) verrechnet. Nachdem alle Kulturen vermischt waren, wurde der Mix mit 50 % Glycerin versetzt und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

2.3.7 Inkubation mit aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API)

Um die Nitrosierung von aktiven pharmazeutischen Inhaltsstoffen (API) durch Darmbakterien untersuchen zu können, wurden die in Tabelle 9 aufgelisteten Organismen mit den verschiedenen API in ihrer jeweiligen Tageshöchstdosis (Tab. 3) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte während 24 h in 48-Well Platten bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen. Hierfür wurden die einzelnen Organismen aus einer jeweiligen Vorkultur in 600 µl BHI- bzw. Shime® Medium mit 100 µM Nitrit (NO₂⁻) angeimpft. Um die Ansäuerung des BHI-Mediums durch die

von den Bakterien produzierten kurzkettigen Fettsäuren möglichst zu verhindern, wurde das BHI Medium zusätzlich mit 65 mM KHCO_3 und 35 mM Kalium-Phosphat auf pH 7 gepuffert. Anschließend wurden die API in ihrer entsprechenden Konzentration zugegeben. Das Wachstum wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes verfolgt (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz). Da Fluoxetin und Propranolol eine wachstumshemmende Wirkung auf die Darmorganismen zeigten, erfolgte die Inkubation dieser API nicht mit wachsenden, sondern ausgewachsenen Zellen. Hierfür wurden 600 μl einer Vorkultur mit 100 μM NO_2^- und Fluoxetin bzw. Propranolol in ihrer entsprechenden Konzentration zugegeben. Um am Ende eine Aussage über die biologische Nitrosierung durch Bakterien treffen zu können, wurden zusätzlich Kontroll-Ansätze ohne Bakterien und bei unterschiedlichen pH-Werten jeweils in BHI- und in Shime®-Medium angesetzt. Dies diente der Untersuchung und der Beurteilung der chemischen Nitrosierung. Die Inkubation erfolgte wie zuvor beschrieben. Am Ende der Inkubation wurde der pH-Wert der Kultur bestimmt und 50 μl der Probe zur Nitrit-Bestimmung (Kapitel 2.6.5) entnommen. Der Rest der Probe wurde 1:1 mit Acetonitril versetzt (100 %) und bis zur Übergabe an Herrn Dr. Vogel vom BfArM zur Untersuchung mittels LCMS bei -20°C gelagert.

2.3.8 Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration von APIs auf Darmbakterien

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Wachstumshemmende Wirkung von Fluoxetin und Propranolol auf die zu testenden Organismen festgestellt. Um diese Wirkung genauer zu untersuchen, wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) der beiden Arzneimittel für die jeweiligen Organismen bestimmt. Als IC_{50} wird die Konzentration eines Stoffes bezeichnet, durch die eine biologische oder biochemische Reaktion zu 50 % inhibiert wird. Bezogen auf die Wachstumshemmung der Organismen bezeichnet die IC_{50} die Konzentration des Stoffes, bei der die Zellen nur noch die Hälfte ihres Wachstums erreichen. Die Bestimmung der IC_{50} erfolgte modifiziert nach Smith *et al.* (2015) und Gerlach *et al.* (2021) über die Messung der Optischen Dichte. Zur Vorbereitung wurde eine Vorkultur der jeweiligen Organismen in BHI-Medium angelegt. Diese wurden zur Inokulation von 600 μl BHI-Medium in einer 48-Well-Platte verwendet. Zusätzlich wurden die Kulturen mit unterschiedlichen

Konzentrationen an Fluoxetin (0,05 – 0,35 mM) und Propranolol (0,1 - 1,1 mM) versetzt und für 24 h bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) wurde die optische Dichte der einzelnen Kulturen alle 20 min bestimmt. Anhand der Wachstumskurve wurde anschließend die maximale OD₆₀₀ bestimmt. Um zu bewerten um wieviel Prozent das Wachstum der Organismen durch die API verringert wurde, wurde eine Kontrolle ohne Fluoxetin und Propranolol kultiviert und deren maximale OD₆₀₀ auf 100 % festgelegt. Abschließend wurde das prozentuale Wachstum gegen die jeweils verwendete Konzentration an API aufgetragen. Dabei ergab sich eine, für Hemmstoff-Antwort Wirkung, typische sigmoidale Kurve. Anhand dieser Kurve wurde mit Hilfe der nicht linearen Regressionsgerade und der Funktion „Hemmstoff-Antwort“ in Graph-Pad Prism die IC50 bestimmt.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Monarch® Plasmid Miniprep Kits (Tab. 4). Hierfür wurden 2x2 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min). Die weitere Aufbereitung der Zellpellets und Durchführung der Isolierung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.4.2 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

Die während der PCR generierten Amplifikate wurden mit Hilfe des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kits (Tab. 4) und nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.4.3 Isolierung genomischer DNA

Die Aufreinigung der genomischen DNA aus *P. vulgatus* erfolgte mit Hilfe des Monarch® Genomic DNA Purification Kit (Tab. 4). Die Aufreinigung erfolgte aus 2 ml Kulturvolumen und nach Herstellerangaben.

2.4.4 Bestimmung von DNA- und RNA- Konzentrationen

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte mittels photometrischer Quantifizierung. Hierfür wurde das BioPhotometer® D30 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) mit der entsprechenden Eppendorf G1.0 µCuvette® genutzt. Zur Messung wurden 4 µl der Probe auf die Küvette gegeben und die Absorption der Lösung bei der für Nukleinsäuren charakteristischen 260 nm (A_{260}) gemessen. Als Leerwert der Messung wurden 4 µl rH₂O verwendet. Die Reinheitsbestimmung der gemessenen Nukleinsäure erfolgte ebenfalls über das BioPhotometer®. Dieses gab die Verhältnisse der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A_{260}/A_{280}) bzw. 260 nm und 230 nm (A_{260}/A_{230}) und somit das Maß an Kontamination durch Proteine (A_{280}) und Lösungsmittel (A_{230}) an. Das jeweilige Verhältnis liegt bei reiner DNA und RNA idealerweise zwischen 1,8 und 2.

2.4.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur in-vitro-Amplifizierung ausgewählter DNA-Fragmente (Mullis *et al.*, 1986 Mullis & Faloona 1987). Diese Methode kann sowohl zur Amplifikation von Plasmid-DNA als auch für genomische DNA verwendet werden. Das Prinzip der PCR beruht auf den drei Schritten Denaturierung, Anlagerung (*Annealing*) und Elongation, welche sich zyklisch wiederholen. Während des Hitze-Denaturierungsschrittes kommt es zu einer Trennung des DNA-Doppelstranges in zwei komplementäre Einzelstränge. Die selektive Amplifizierung einer spezifischen DNA-Sequenz erfolgt unter Verwendung zweier gegenläufiger Oligonukleotid-Primer welche das gewünschte DNA-Fragment flankieren. Nach der Denaturierung hybridisieren die Primer bei einer Primer-spezifischen Annealing-Temperatur (T_A) an die komplementären DNA-Bereiche. In einem nächsten Schritt werden während der Elongationsphase freie Nukleotide komplementär an das freie 3'-OH-Ende der Primer angelagert. Dies führt zur Entstehung eines neuen Doppelstranges. Dieser Schritt wird durch eine hitzestabile DNA-Polymerase katalysiert. Wichtig ist es bei diesem Schritt die Schmelztemperatur (T_m) der verwendeten Oligonukleotid-Primer für die Auswahl der *Annealing*-Temperatur (T_A) zu beachten. Letztere sollte hierbei etwa 2 - 5°C unter der T_m liegen. Pro Zyklus wird so eine Verdopplung des gewünschten DNA-

Fragmentes erzielt, was über mehrere Zyklen zu einem exponentiellen Anstieg der Fragmente führt.

Je nach Anwendungsziel wurden die *OneTaq* Polymerase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) oder die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet.

Zur Amplifizierung von Nukleotidsequenzen zur Generierung von neuen Vektoren wurde die Q5 High-Fidelity DNA-Polymerase verwendet. Diese zeichnet sich durch eine geringe Fehlerrate und eine Elongationsgeschwindigkeit von 10-20 s/kb aus. Der PCR-Ansatz sowie das verwendete Programm sind in Tabelle 10 und 11 aufgeführt.

Tabelle 10: Reaktionsansatz zur Gen-Amplifizierung mittels Q5 DNA-Polymerase

Komponente	Volumen
5x Q5 <i>Reaction Buffer</i>	10 µl
5x Q5 <i>High GC Enhancer</i>	10 µl
<i>Forward-Primer</i> (10 pmol/µl)	2,5 µl
<i>Reverse-Primer</i> (10pmol/µl)	2,5 µl
dNTP-Mix (25 mM)	0,5 µl
DNA/ <i>Template</i>	1 µl
Q5 DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl
rH ₂ O	ad 50 µl

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen zur Gen-Amplifizierung mittels Q5 DNA-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initialdenaturierung	98 °C	3 min	1 x
Denaturierung	98 °C	10 s	30 x
<i>Annealing</i>	T _A ¹ °C	20 s	
Elongation	72 °C	10-20 s/kb	
Finale Elongation	72 °C	3 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

¹T_A: Anlagerungstermperatur der Primer

Nach Abschluss der PCR wurden der korrekte Verlauf sowie die Amplifizierung mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die jeweiligen Fragmente wurden dann vor der Weiterverwendung mittels Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 4) aufgereinigt.

Zur Identifizierung positiver Transformanten und neu generierter Stämme nach einer Transformation wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde jeweils Zellmaterial der zu untersuchenden Kolonien in 10 µl rH₂O resuspendiert. Hiervon wurden 5 µl zur Inokulation von 100 µl LB-Backups verwendet. Die restlichen 5 µl der Suspension wurden in dem in Tabelle 12 aufgeführten Reaktionsansatz eingesetzt. Für die Amplifikation wurde eine modifizierte One-*Taq*®-DNA-Polymerase (Tab. 1) verwendet. Die entsprechenden Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 12: Reaktionsansatz zur Gen-Amplifizierung mittels One-*Taq*®-Polymerase

Komponente	Volumen
5x One- <i>Taq</i> Mastermix	12,5 µl
Forward-Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse-Primer (10pmol/µl)	0,5 µl
DNA/Template	5 µl
rH ₂ O	ad 25 µl

Tabelle 13: Reaktionsbedingungen zur Gen-Amplifizierung mittels One*Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
Initialdenaturierung	94 °C	5 min	1 x
Denaturierung	94 °C	25 s	30 x
Annealing	T _A ¹ °C	25 s	
Elongation	68 °C	1 min/kb	
Finale Elongation	68 °C	5 min	1 x
Lagerung	4 °C	∞	1 x

¹T_A: Anlagerungstermperatur der Primer

Nach Abschluss der PCR wurden der korrekte Verlauf sowie die Amplifizierung mittels Agarose- Gelelektrophorese überprüft. Bei erfolgreicher Amplifizierung eines ausgewählten Gen-Bereichs wurden die Backups in LB-Medium für die Inokulation von Übernachtskulturen eingesetzt.

2.4.6 Agarose Gelelektrophorese

Zur Visualisierung und Überprüfung der PCR-Amplifikate wurde die Methode der Agarose-Gelelektrophorese genutzt. Über eine Auftrennung der DNA-Fragmente nach Größe und einen anschließenden Vergleich mit definierten Nukleinsäure-Standards ermöglicht diese Methode die Größenbestimmung von linearer, doppelsträngiger DNA (Sambrook *et al.*, 1989). Das Prinzip beruht hierbei auf der unterschiedlichen Wander-Geschwindigkeit von Fragmenten unterschiedlicher Größe durch ein engmaschiges Agarose-Polymer-Gel in einem elektrischen Feld. Die negativ geladene DNA bewegt sich hierbei in Richtung der positiv geladenen Katode. Dabei wandern die kleinen Fragmente schneller als die großen Fragmente. Zusätzlich zu der Größe der Fragmente wird die Laufgeschwindigkeit durch die Porengöße des Agarose-Polymer-Gels bestimmt. Diese variiert je nach Agarose-Konzentration. In der vorliegenden Arbeit wurden die Gele unter Verwendung von 1%-iger [w/v] Agarose in NEO Ultra-Qualität und 30 ml 1x TAE-Puffer (Tab. 14) hergestellt. Nach kurzem aufkochen zum Lösen der Agarose, wurde dem Gemisch, zur späteren Visualisierung der Fragmente, 1 µl ROTI® GelStain Red (Carl Roth; Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt. Die Visualisierung beruht darauf, dass der Farbstoff mit der doppelsträngigen DNA interkaliert und unter späterer UV-Bestrahlung fluoresziert. Hierbei ist die Intensität proportional zur Menge an DNA. Zum Gießen und Laufen der Gele wurde in dieser Arbeit das Gelelektrophorese-Systems „Horizon® 58“ der Firma Whatman Inc. (Little Chalfont, Großbritannien) verwendet. Fragmente welche mittels Q5-Polymerase erzeugt wurden, mussten vor der elektrophoretischen Auftrennung zusätzlich mit dem 6X Ladepuffer Purple (NEB; Frankfurt a.M., Deutschland) versetzt werden. Der OneTaq Mastermix hingegen beinhaltet bereits einen Ladepuffer, weshalb Proben, welche mit diesem Mix generiert wurden, direkt auf das Gel aufgetragen werden konnten. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für eine Stunde. Zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente wurde der Nukleinsäure-Standard Quick-Load® Purple 1 kb DNA Ladder von NEB (Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet.

Tabelle 14: Zusammensetzung 50x TAE-Puffer

Substanz	Menge
Tris	242 g
EDTA (0,05 M)	100 ml
Essigsäure (1 M)	57,4 ml
dH ₂ O	ad 1000 ml
Auf pH8 einstellen	

2.4.7 Restriktionsverdau von DNA-Fragmenten

Die Ligation zwischen einem DNA-Fragment (Insert) und einem Plasmid setzt einen Restriktionsverdau voraus. Hierbei werden die Phospho-di-Ester-Bindungen der doppelsträngigen DNA mit Hilfe von Endonukleasen (Restriktionsenzyme) an einer spezifischen palindromischen Sequenz gespalten. Die dabei entstehenden DNA-Fragmente haben je nach gewähltem Restriktionsenzym glatte oder kohäsive Ende (klebrige Enden/ *sticky ends*). Werden Insert und Plasmid durch das gleiche Restriktionsenzym verdaut, so erlauben die überhängenden Nukleotide der erzeugten linearen Fragmente eine Hybridisierung aus Insert- und Plasmid-Sequenz. Der Verdau wird durch eine anschließende Aufreinigung der DNA-Fragmente mittels Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 4) gestoppt.

In der vorliegenden Arbeit wurden Insert und Vektor zur Generierung von pASK5_*bvu*_3358 mit dem Restriktionsenzym *Bsa*I behandelt. Die Zusammensetzung des Restriktionsansatzes ist in Tabelle 15 aufgeführt. Der Verdau erfolgte für 15 min bei 37°C. Nach dem Abstoppen der Reaktion über eine Aufreinigung unter Verwendung des Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 4) konnten die Fragmente in der Ligation eingesetzt werden.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Restriktionsansatzes mit dem Restriktionsenzym *Bsa*I

Komponente	Menge
DNA-Fragment (Insert bzw. Plasmid)	16 µl
<i>Bsa</i> I	2 µl
10x CutSmart® Puffer ¹	2 µl

¹ von NEB, Frankfurt a.M., Deutschland

2.4.8 DNA-Ligation

Anschließend an den Restriktionsverdau (Kapitel 2.4.7) erfolgt die Hybridisierung zwischen den komplementären Enden des Inserts und des entsprechenden Vektors. Diese Verknüpfung wird durch eine T4-DNA-Ligase katalysiert. Während dieses Prozesses werden die freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektorrückgrats unter ATP-Verbrauch mit den 5'-Phosphatenden des verdauten DNA-Inserts ligiert. Da durch den Verdau mit *Bsa*I die Grundvoraussetzung von *sticky ends* gegeben war, wurde für die Ligation des pASK5-Vektors und der Sequenz von

bvu_3358 in dieser Arbeit der *Instant Sticky-end Ligase Master Mix* von NEB[®] (Frankfurt a.M., Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 16 aufgeführt. Dieser wurde nach Herstellerangaben gemischt und anschließend ohne Inkubationszeit für die Transformation in *E. coli* DH5 α eingesetzt.

Tabelle 16: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes unter Verwendung des Instant Sticky-end Ligase Master Mix

Komponente	Menge
Insert-DNA (verdaut und aufgereinigt)	1,5 μ l
Vektor-DNA (verdaut und aufgereinigt)	0,5 μ l
Instant Sticky-end Ligase Master Mix	2 μ l

2.4.9 Klonierung mittels NEBuilder DNA Assembly Kit

Neben den klassischen Klonierungsstrategien wie beispielsweise enzymatischer Restriktionsverdau mit anschließender Ligation (Kapitel 2.4.7 und 2.4.8) haben sich in der Molekularbiologie auch ligationsunabhängige Klonierungsmethoden etabliert. Die *Seamless cloning* Methode ist hierbei ein Ansatz, welcher durch den Verzicht einen Restriktion-Verdau und einer Ligation zeitsparend ist. Das NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Kit basiert auf dieser Methode und erlaubt die Fusionierung mehrere DNA-Fragmente zu einem zirkulären Plasmid, unabhängig von den Fragmentgrößen, der Insertionsstelle und der Endkompatibilität. In der vorliegenden Arbeit wurde das NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Kit zur Generierung von Überproduktions- und Deletions-Plasmiden für *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* basierend auf den Vektoren pG106 und pMM656 verwendet.

Ausgangsschritt der Assemblierung war die Amplifikation der zu klonierenden Genom-Sequenz sowie des Vektorrückgrats. Die entsprechenden Primer wurden mit Hilfe des NEBuilder[®] Assembly Tool (Tab. 5) erstellt. Diese sorgten während der Amplifikation zur Bildung von zum Vektor-Rückgrat komplementären Überhängen an der Genom-Sequenz. Diese Überhänge gewährleisteten während der Assemblierung die Verknüpfung der Fragmente in der richtigen Orientierung. Nach der Amplifikation wurden die jeweiligen Fragmente mit Hilfe des Monarch[®] PCR & DNA Cleanup Kit (Tab. 4) aufgereinigt und die DNA-Konzentration

mittels Nanodrop bestimmt (Kapitel 2.4.4). Anschließend erfolgte die Assemblierung der einzelnen Fragmente. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 17 dargestellt. Der Ansatz wurde je nach Anzahl der Fragmente 15 min (1 Insert) oder 60 min (2 Inserts) bei 50°C inkubiert.

Tabelle 17: Zusammensetzung einer Assemblierungsreaktion unter Verwendung des NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mixes

Komponente	Menge
Insert	X µl (0,03 -0,2 pmol) ^{1,2}
Backbone (Vektor)	X µl (0,03 -0,2 pmol) ^{1,2}
2x NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	10 µl
H ₂ O	ad 20 µl

¹ bei einer Insertgröße < 3 kb wurde ein Vektor-Insert Verhältnis von 1:2 empfohlen

² die verwendeten Volumina wurden mit Hilfe des NEBuilder® *protocol Calculator* berechnet

Darauf folgte ein Verdau des Ansatzes mit dem Restriktionsenzym DpnI. Dies diente dazu die methylierte *Template*-DNA zu beseitigen. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 18 beschrieben und wurde für 15 min bei 37°C inkubiert.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für den DpnI-Verdau

Komponente	Menge
Assemblierungsansatz (aus Tabelle 17)	20 µl
DpnI	1 µl
rCutSmart™ Puffer	5 µl
H ₂ O	24 µl

Abschließend wurde das generierte Plasmid mittels Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit aufgereinigt, in *E. coli* transformiert, vervielfältigt und mittels Monarch® Plasmid Miniprep Kit (Tab. 4) isoliert. Die korrekte Assemblierung wurde mittels Sequenzierung (Kapitel 2.1.9.1) überprüft.

2.4.10 Transformation in chemisch kompetente *E. coli* Stämme

Die generierten pG106- und pASK-Plasmid-Derivate wurden mittels Hitzeschock in kompetente *E. coli* NEB®10 β bzw. *E. coli* NEB®5 α Zellen übertragen. Diese Stämme wurden durch Modifikationen im Genotyp, wie der Deletion der *endA1*- und *recA1*-Nukleasen, auf eine hohe Plasmidstabilität optimiert. Der Transfer des Plasmids in die Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurden 50 μ l der Zellen auf Eis angetaut, mit 2-3 μ l der in Kapitel 2.4.7 bis 2.4.9 generierten Plasmide versetzt und der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Darauf folgte für 30 s ein Hitzeschock bei 42°C mit anschließender Abkühlung der Zellen für 5 min auf Eis. Zur Regeneration wurden die Zellen mit 950 μ l SOC-Medium (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) versetzt und für 1 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren von 100 μ l der regenerierten Zellen auf entsprechenden Selektiv-Agar-Platten (LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum). Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden möglich gewachsene Kolonien mittels Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Transformation überprüft.

2.4.11 Transformation in *E. coli* β 2155 mittels Elektroporation

Um einen späteren Transfer der generierten Plasmide mittels biparentaler Konjugation in *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* durchführen zu können, wurden die erzeugten pMM656-Derivate in den *E. coli* Stamm β 2155 übertragen. Da es sich hierbei nicht um natürlich kompetente Zellen handelt, erfolgte der Transfer mittels Elektroporation.

Hierfür wurden die Zellen über Nacht in 5 ml LB-Medium mit 0,3 mM DAP bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Am folgenden Tag wurden 4 ml der Übernachtskultur durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 5 min geerntet. Alle darauffolgenden Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellen wurden 2-mal aufeinanderfolgend in 1 ml HEPES-Puffer (1mM, pH7) resuspendiert und erneut bei 8000 rpm während 3 min zentrifugiert. Dies diente als Waschschrte zur Entfernung von Medienbestandteilen aus dem Zell-Pellet. Anschließend wurde das generierte Pellet in 1 ml Glycerin (10% v/v) erneut resuspendiert, zentrifugiert und abschließend in 50 μ l Glycerin (10% v/v) aufgenommen.

Als nächstes wurde die Zellsuspension mit 2 µl der in Kapitel 2.4.9 generierten Plasmide versetzt und das Zell-DNA-Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporations-Küvette (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Die Elektroporation erfolgte in einem MicroPulsers (BioRad, München, Deutschland). Der Elektropuls wurde für 4-5 ms bei einer Pulskontrolle von 200 Ω und einer Spannung von 2,2 kV durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen zur Regeneration in 1 ml SOC-Medium (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) aufgenommen und in einem 50 ml Falcon-Tube für 3 h bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren von 100 µl der regenerierten Zellen auf entsprechenden Selektiv-Agar-Platten (LB-Agar mit geeignetem Antibiotikum). Nach einer Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C wurden möglich gewachsene Kolonie mittels Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Transformation überprüft.

2.4.12 Transformation von Plasmid-DNA in *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens*

Der Transfer von Plasmid-DNA in Spezies der Familie Bacteroidaceae erfolgte mittels Elektroporation (EP) (pG106-Derivate) oder biparentaler Konjugation (pMM656-Derivate).

Für die Übertragung von Plasmid-DNA mittels Elektroporation wurde eine 50 ml Kultur des gewünschten Organismus über Nacht in BHI-Medium kultiviert. Am Folgetag wurde die gesamte Kultur unter Verwendung eines anaeroben Zentrifugenbechers mit Gummi-Dichtung und Schraubverschluss bei 8000 rpm und 4°C für 20 min zentrifugiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Zur Eliminierung von Medienbestandteilen wurde das Zell-Pellet in 5 ml sterilem, anaeroben EP-Puffer (10 % Glycerol + 1 mM MgCl₂) resuspendiert und erneut bei 8000 rpm für 4 min zentrifugiert. Nach zweimaligem waschen wurden die Zellen abschließend in 500 µl EP-Puffer aufgenommen.

Als nächstes wurden 50 µl der Zellsuspension mit 5 µl der zu übertragenden Plasmid-DNA vermengt. Das Gemisch wurde dann in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld, Deutschland) mit einem Elektrodenabstand von 1 mm überführt. Zur Gewährleistung der anaeroben Bedingungen außerhalb der anaeroben Kammer wurde die Elektroporations-Küvette mit einem Gummistopfen luftdicht verschlossen. Die Elektroporation erfolgte in einem MicroPulsers (BioRad, München, Deutschland). Der

Elektropuls wurde für 6 ms bei einer Spannung von 2,5 kV durchgeführt. Auf den Elektroimpuls folgte unmittelbar die Aufnahme der Zellen in 1 ml vorgewärmten BHI-Medium. Dieses wurde mit Hilfe einer Kanüle durch den Gummistopfen in die EP-Küvette eingeführt und nach der Resuspension mit dem Zell-DNA-Gemisch in eine 2 ml Serum-Flasche überführt. Abschließend wurden die Zellen zur Regeneration über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Selektion von Plasmid-tragenden Klonen wurden nach der Regeneration 50 µl der Zellsuspension auf BHI-Agarplatten mit 100 µg/ml Erythromycin und 200 µg/ml Gentamycin ausplattiert. Die Kultivierung erfolgte während 48-72 h bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen.

Der Transfer von pMM656-Derivaten in Spezies der Familie Bacteroidaceae erfolgte mittels biparentaler Konjugation unter der Verwendung von *E. coli* β 2155 als Donor-Stamm. Dieser Stamm ermöglicht eine Konjugation ohne zusätzlichen Helferstamm da er eine genomisch integrierte Konjugationsmaschinerie des Plasmids RP4 enthält. Zur Durchführung der Konjugation wurden als erstes sowohl der Donor- als auch der Rezipienten-Stamm (*P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus* oder *B. xylanisolvens*) bis in die exponentielle Phase (OD₆₀₀ 0,4-0,6) kultiviert. In einem nächsten Schritt wurden beide Kulturen in einem Rezipient- und Donor-Verhältnis von 1:10 (v/v) gemischt und 2 min bei 8000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 200 µl BHI-Medium resuspendiert und in die Mitte einer anaeroben BHI-Agarplatte (+ 0,3 mM DAP für *E. coli* β 2155) pipettiert. Darauf folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 2 ml BHI-Medium von der Agarplatte abgelöst und 50 µl der Zellsuspension auf selektiv-Platten ausplattiert. Zur Selektion von Plasmid-tragenden Zellen wurden BHI-Agar Platten mit 10 µg/ml Tetrazyklin verwendet. Zusätzlich wurde den Platten zur Eliminierung der *E. coli* Zellen 200 µg/ml Gentamycin zugefügt. Da *E. coli* β 2155 DAP abhängig ist, führt das Fehlen von DAP in den Selektionsplatten zu einer zusätzlichen Selektion von Bacteroidaceae. Zur Selektion wurden die Zellen unter anaeroben Bedingungen für 48-72 h bei 37 °C inkubiert. Möglich gewachsene Kolonie wurden abschließend mittels Kolonie-PCR auf eine erfolgreiche Transformation überprüft.

2.4.13 Markerlose Deletion von Genen in *P. vulgatus*

Die markerlose Deletion in dieser Arbeit wurde nach Neff *et al.* (2023) durchgeführt. Diese Deletion beruht auf zwei aufeinander folgenden homologen Rekombinationen zwischen einem Vektor und der genomischen DNA von *P. vulgatus*. Bei den homologen Bereichen handelt es sich hierbei um jeweils 1000 Bp lange Bereiche, welche sich *up*- und *down*-stream von dem Zielgen befinden. Während der ersten homologen Rekombination wird das Plasmid so in das Genom des Organismus integriert. Während der zweiten Rekombination verlässt das Plasmid den Organismus wieder, wodurch entweder das Zielgen im Genom verbleibt (Revertante) oder mit dem Vektor die genomische DNA verlässt (Deletionsmutante). Die Selektion der ersten Homologen Rekombinante erfolgt über eine auf dem Plasmid kodierte Erythromycinresistenzkassette (*ermG*). Die Selektion der zweiten homologen Rekombinanten basiert auf dem *sacB* system (Neff *et al.*, 2023). *SacB* steht hierbei für die ursprünglich aus *B. subtilis* stammende Levansucrase (EC 2.4.1.10). Diese Enzymklasse katalysiert durch die Hydrolyse von Saccharose die Synthese des komplexen Polysaccharids Levan. Da *P. vulgatus* nicht in der Lage ist Levan zu verstoffwechseln, hat eine intrazelluläre Akkumulation des Polysaccharids einen letalen Effekt auf den Organismus. Dies ermöglicht die Nutzung von *sacB* in Gegenwart von Saccharose als Substrat, als Gegenselektionsmarker (Neff *et al.*, 2023).

Als Ausgangsvektor der in dieser Arbeit erstellten Deletions-Vektoren diente das Plasmid pMM656_*sacB* (Neff *et al.*, 2023). Das Plasmidrückgrat wurde jeweils mit den Primern pMM656_KO_BB_fw/rev (Tab. 7) amplifiziert. Zusätzlich wurde mit Hilfe genspezifischer Primer jeweils 100 BP up- und downstream des Zielgens aus der genomischen DNA von *P. vulgatus* amplifiziert. Darauf folgte die Assemblierung der drei Fragmente mittels NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix (Kapitel 2.4.9). Das fertige Konstrukt wurde anschließend über Elektroporation (Kapitel 2.4.11) in *E. coli* β 2155 transformiert. Zur Selektion wurden LB-Agarplatten mit 100 μ g/ml Carbenicillin verwendet. Unter Verwendung der Primer scr-pmm656_up_fw/rev, welche im Plasmidrückgrat binden und die *up*- und *down-stream* Region flankieren, wurde dann mittels Kolonie PCR und Sequenzierung der korrekte Zusammenbau des Vektors überprüft. Nach diesem Schritt erfolgte der Transfer des Plasmids über anaerobe, biparentale Konjugation (Kapitel 2.4.12), in *P. vulgatus*.

Die Selektion erfolgte auf BHI-Agar-Platten mit 100 μ g/ml Erythromycin. Der Nachweis der ersten homologen Rekombination erfolgte über Kolonie-PCR. Hierfür wurden die Primer

pMM656sacB seq_fw/rev verwendet, welche das *sacB* Gen auf dem Vektor flankieren und ein Fragment von 1965 BP amplifizieren. Um eine erneute homologe Rekombination hervorzurufen, wurde *P. vulgatus* bis zur exponentiellen Phase ohne Selektionsdruck auf BHI-Medium kultiviert.

Durch die anschließende Gegenselektion auf saccharosehaltigen Agarplatten sollten nur die Zellen isoliert werden, welche durch eine erfolgreiche zweite homologe Rekombination das für die Levansucrase kodierende Gen *sacB* und somit das Plasmid nicht mehr im Genom integriert hatten. Da während der zweiten homologen Rekombination sowohl Deletionsmutanten als auch Revertanten entstehen können, wurde die Deletion des Zielgens mittels PCR und Sequenzierung nachgewiesen. Verwendet wurden hierfür jeweils spezifische Primer, welche up- und down-stream des Zielgens im Genom von *P. vulgatus* binden.

2.4.14 Überexpression von Genen in *P. vulgatus*

Die Überexpression der Gene der Transketolase und der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase in *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310$ $\Delta 2880$ $\Delta 2499$ wurde nach Lück und Deppenmeier (2022) durchgeführt. Grundlage hierfür bildete der Vektor pG106_p2499_tkt (Lück und Deppenmeier, 2020) auf welchem der Promotor der LDH (p2499) für die Expression des dahinter klonierten Gens sorgt. Für die Überexpression von G6PDH wurde das *tkt* Gen auf dem Plasmid gegen *g6pdh* aus *P. vulgatus* ausgetauscht und somit das Plasmid pG106_p2499_g6pdh (Tab. 8) generiert. Für die parallele Überexpression beider Gene wurde *g6pdh* mit dem davor gelegenen p2499 zusätzlich in pG106_p2499_tkt (Tab. 8) kloniert, so dass die Expression beider Gene jeweils von dem natürlichen LDH Promotor gewährleistet wurde. Nach dem Assembly der einzelnen Fragmente mittels NEB® Assembly Kit (Tab. 4) wurden die Plasmide zur Vervielfältigung jeweils in kompetente *E. coli* 10 β Zellen eingebracht (Kapitel 2.4.11). Nach einer anschließenden Plasmidaufreinigung unter Verwendung des Monarch® Plasmid Miniprep Kit wurde der Vektor über anaerobe Elektroporation in *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310$ $\Delta 2880$ $\Delta 2499$ transferiert (Kapitel 2.4.12). Nach 24 h Regeneration in 2 ml BHI-Medium bei 37°C unter anaeroben Bedingungen wurden die Zellen zur Selektion Klonen welche das Plasmid aufgenommen haben auf BHI-Agarplatten mit Erythromycin (100 μ g/ml) und Gentamycin (200 μ g/ml) ausgestrichen. Unter Verwendung der Primer

pG106_screening_fw/rev (Tab. 7), welche in dem Plasmidrückgrat binden und die Gensequenz von *bvu_2318* (*tkl*) bzw. *g6pdh* (*bvu_2796*) mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz des Gens *bvu_2499* (p2499) flankieren, wurde dann mittels Kolonie PCR der Transfer von pG106_p2499_tkl in *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310 \Delta 2880 \Delta 2499$ überprüft.

Zum Nachweis des Transfers von pG106_tkl_g6pdh wurden die Primerpaare scr_tkl_fw und scr_tkl_rev sowie scr_g6pdh_fw und scr_g6pdh_rev (Tab. 7) verwendet. Diese binden jeweils in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz der TKT (*bvu_2318*) beziehungsweise der G6PDH (*bvu_2796*) mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz des Gens *bvu_2499*.

Die Untersuchung der Kopienzahl des *shuttle* Vektors sowie die Untersuchung der Auswirkung der Überexpression auf Transkriptebene wurde erfolgte durch eine qPCR bzw. RT-qPCR (Kapitel 2.4.16). Die Auswirkung der Überexpression auf die Bildung von Stoffwechselendprodukten wurde mittels HPLC (Kapitel 2.6.1) analysiert.

2.4.15 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA aus *P. vulgatus* wurde mit Hilfe des Monarch® Total RNA Miniprep Kits (Tab. 4) durchgeführt. Hierfür wurden 2 ml einer exponentiell wachsenden Kultur zentrifugiert (13.000 rpm, 1 min) und das Zellpellet für 5 min in 500 µl Pop-Culture® Reagenz (Millipore, Darmstadt, Deutschland) mit Lysozym (1 mg/ml) bei RT inkubiert. Die weitere Isolierung erfolgte nach Herstellerangaben.

Um verbleibende DNA zu detektieren wurden 200 ng der aufgereinigten Nukleinsäure in einer PCR mit den Primern, welche ebenfalls für die folgende RT-qPCR verwendet wurden, eingesetzt. Sofern in der anschließenden Agarose-Gelelektrophorese kein Amplifikations-Produkt detektiert wurde, konnte eine Kontamination durch verbleibende DNA ausgeschlossen werden. War in der Probe noch DNA vorhanden, so wurde diese durch einen Verdau mit DNaseI (Thermo Scientific™, Schwerte, Deutschland) entfernt, und anschließend die Kontroll-PCR wiederholt.

2.4.16 Quantitative PCR (qPCR) und quantitative Reverse-Transkriptions-PCR (RT-qPCR)

Die quantitative PCR (qPCR), auch Echtzeit-PCR genannt, ermöglicht es die relative Menge an DNA eines Zielgens in einer Probe zu bestimmen. Wird die Methode zur Bestimmung einer relativen Menge an mRNA genutzt, so spricht man von einer quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR). Zur Quantifizierung der relativen Menge eines Zielgens wird hier die Menge an mRNA mit jener eines konstitutiv exprimierten Referenzgens verglichen. Da die Transkriptionsmenge eines Gens oft im Zusammenhang mit dessen Relevanz steht, ermöglicht diese Methode eine Aussage über die Bedeutung verschiedener Zielgene zu treffen. Außerdem dient sie zur Überprüfung von Überexpressionsmechanismen. Während der RT-qPCR wird zunächst die isolierte Gesamt-RNA durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Anschließend wird die generierte cDNA mit Hilfe von Gen-spezifischen Primern in einer PCR zu etwa 200 BP großen Fragmenten amplifiziert.

Ein in dem PCR-Ansatz befindlicher Fluoreszenzfarbstoff wie beispielsweise SYBR Green, welcher in der doppelsträngigen DNA (ds-DNA) interkaliert ermöglicht die Detektion der amplifizierten Fragmente. Hierbei korreliert das messbare Fluoreszenzsignal direkt mit der Menge an enthaltener dsDNA, die in einer PCR mit jedem Zyklus verdoppelt wird und somit über mehrere Zyklen exponentiell zunimmt. Die Zykluszahl, bei welcher das Fluoreszenzsignal einen in der linearen Phase der exponentiellen Amplifikationskurve festgelegten Schwellenwert (*threshold line*) überschreitet, wird als Ct-Wert bezeichnet. Der Ct-Wert ist hierbei umgekehrt proportional zur anfänglichen mRNA-Menge in der Probe. Ist der Ct-Wert gering so bedeutet dies, dass bereits zu Beginn der reversen Transkriptase eine hohe Menge an mRNA vorlag. Je höher der Ct-Wert, umso geringer war die Ausgangs-Konzentration an mRNA. Setzt man die Ct-Werte des Zielgens mit denen des Referenzgens ins Verhältnis, so kann man die relative Transkript-Menge des Zielgens berechnen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der qPCR zur Bestimmung der Kopienzahl des *tkl*-und des *g6pdh*-Gens in den Überexpressions-Stämmen von *P. vulgaris* genutzt. Hierfür wurden die entsprechenden Stämme über Nacht in BHI-Medium kultiviert. In einem nächsten Schritt wurde jeder Kultur auf eine OD600 = 0,5 verdünnt und 1 ml der entsprechenden Suspension während 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 1x PBS

(8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,4 g Na₂HPO₄, 0,27 g KH₂PO₄ pro 1 l H₂O) gewaschen und anschließend in 1 ml nukleasefreiem Wasser resuspendiert. Zum Zellaufschluss wurde der Ansatz für 10 min bei 100 °C aufgeköcht. Das Zelllysate wurde verdünnt und mit dem Luna® Universal qPCR Master Mix (Tab. 4) versetzt. Die weitere Anwendung erfolgte nach Herstellerangaben.

Die RT-qPCR wurde in dieser Arbeit zur Analyse des PPW von *P. vulgatus* verwendet. Außerdem wurde hiermit die Überexpression des *tkt*- und des *g6pdh*-Gens über den *shuttle* Vektor pG106 nachgewiesen und die Auswirkung des Rhamnoseinduzierbaren Promotors auf die Transkription von *bvu_3787* untersucht. Zusätzlich wurde die RT-qPCR zur Untersuchung weiterer Gene in *P. vulgatus* genutzt. Für die Durchführung der RT-qPCR wurde zunächst die Gesamt-RNA der zu untersuchenden Organismen wie in Kapitel 2.4.15 beschrieben isoliert. Anschließend wurde diese nach Herstellerangaben in dem Luna® Universal One-Step RT-qPCR Kit (Tab. 4) verwendet.

Für die experimentelle Durchführung der (RT)-qPCR wurde der CFX Connect™ RT-PCR-Cycler von BioRad (München, Deutschland) genutzt. Die verwendeten PCR-Programme sind in Tabelle 19 aufgeführt.

Tabelle 19: Reaktionsbedingungen für die qPCR und RT-qPCR

PCR-Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Reverse Transkription ¹	55°C	10 min	1
Initiale Denaturierung	95°C	60 s	1
Denaturierung	95°C	15 s	35x
Hybridisierung und Elongation	60°C	30 s	
Schmelzkurve	60-95°C	Jeweils 5 s	1

¹ nur bei der RT-qPCR

Die Erstellung der Schmelzkurven der einzelnen Amplifikate am Ende des Programmes dient zur Bestimmung der Spezifität der amplifizierten Fragmente. Dies beruht auf den unterschiedlichen Schmelzkurvenverläufen der einzelnen Amplifikate. Durch eine kontinuierliche Erhöhung der Temperatur, wurde somit für jedes Fragment die Fluoreszenz gemessen und die Schmelzkurve erstellt.

Der zur Auswertung erforderliche Ct-Wert wurde durch die Software des Thermo-Cyclers automatisch ermittelt. Als Referenzwert wurde der Ct-Wert des Referenzgens *l23* verwendet.

Das Gen des ribosomalen Proteins L23 kann als Referenzgen verwendet werden da es während des Wachstums von *P. vulgatus* konstitutiv exprimiert wird. Die Ct-Werte des Ziel- und Referenz-Gens wurden entsprechend der Gleichungen 1 bis 4 miteinander verrechnet.

Gleichungen zur Berechnung der relativen Transkript-Menge eines Zielgens:

- 1) $\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}}$
- 2) N-fache expression Zielgen zu Referenzgen (*fold change*) = $2^{-\Delta Ct}$
- 3) $\Delta\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen(Mutante)}} - Ct_{\text{Zielgen (WT)}}$
- 4) N-fache Expression Zielgen in Mutante zu Zielgen in WT (*fold change*) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

ΔCt (1) stellt hierbei die Differenz des Ct-Wertes des Zielgens zum Ct-Wert des Referenzgens dar, während $2^{-\Delta Ct}$ (2) das relative Verhältnis zur Transkriptmenge des Referenzgens angibt. Der $\Delta\Delta Ct$ (3) erlaubt zusätzlich die Berechnung der Differenz zwischen den Ct-Werten des Zielgens im WT-Stamm und im genetisch modifizierten Stamm (Mutante). Auch hier kann die relative Transkript-Menge über die Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (4) berechnet werden. Ein Ansatz ohne reverse Transkriptase diente während der RT-qPCR als Negativ-Kontrolle zum Nachweis, dass es sich in der untersuchten Probe nur um RNA handelte.

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Überproduktion rekombinanter Proteine in *E. coli*

Die heterologe Produktion rekombinanter Proteine erfolgte in *E. coli* DH5 α - Zellen, welche das generierte Plasmid pASK5_*bvu*_3358 trugen. Die entsprechenden Zellen wurden über Nacht in LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Darauf folgte die Inokulation einer Hauptkultur in 100 ml MI-Medium mit 1 % der Vorkultur. Die Kultur wurde bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 - 1 erfolgte die Induktion der Überproduktion durch die Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT; 200 ng/ml). Dabei handelt es sich um ein nicht bakterizides Derivat von Tetracyclin, welches eine aktivierende Wirkung auf den Promotor hat. In der Abwesenheit von AHT inhibiert der tet-Repressor (tetR) des pASK-IBA5 Vektors die Expression des klonierten Gens. Die Zugabe von AHT führt zu einer

Konformationsänderung des tetR, welcher sich daraufhin vom Promotor löst und somit die Transkription des Ziel-Gens ermöglicht. Die Produktion von *bvu_3358* erfolgte über Nacht bei 18°C und 100 rpm. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 20 min bei 4°C und 10000 rpm pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 10 ml Puffer W (Tab. 20) resuspendiert und die Zellen mittels Ultraschall aufgeschlossen.

Tabelle 20: Zusammensetzung Puffer W

Substanz	Konzentration
Tris/HCl pH8	100 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM

2.5.2 Zellaufschluss mittels Ultraschall

Die für die Überproduktion verwendeten *E. coli* Zellen wurden mit dem Ultraschall-Gerät (Sonoplus Sonicator, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) bei 4°C aufgeschlossen. Hierfür wurden die in Kapitel 2.5.1 in Puffer W resuspendierten Zellen für 2 min/ml bei halbmaximaler Leistung mit gepulstem Ultraschall behandelt. Zur Entfernung der Zelltrümmer wurden diese anschließend bei 15.000 rpm für 20 Minuten bei 4 °C pelletiert. Das erhaltene Zelllysate wurde bis zur späteren Proteinaufreinigung bei 4°C gelagert.

2.5.3 Proteinaufreinigung mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte über eine Strep-Tactin-Affinitätschromatographie unter Nutzung einer Strep-Tactin-Sepharose-Säule (Strep-Tactin-®XT Superflow®; IBA Lifesciences, Göttingen, Deutschland; Säulenvolumen (*Column Volume*, CV) 1 ml). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Interaktion zwischen dem künstlichen Oligopeptid „Strep-tag II“ (Aminosäuresequenz: WSHPQFEK) und einem Strep-Tactin-Säulenmaterial (immobilisiertes Strep-Tactin). Die Aufreinigung erfolgte bei 4°C und nach Herstellerangaben. Hierfür wurde die Säule erst mit 2 CV Puffer W äquilibriert und anschließend mit dem in Kapitel 2.5.2 vorbereitete Zelllysate beladen. Zur Eliminierung unspezifischer Proteine, wurde die Säule in einem nächsten Schritt 5 x mit 1 CV Puffer W

gewaschen. Als nächstes erfolgte die Elution des Fusionsproteins schrittweise in einzelne Elutionsfraktionen durch die Zugabe von 6 x 0,5 ml CV BXT-Puffer (Puffer W mit 50 mM Biotin). Abschließend wurden die Elutionsfraktionen, nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen, 1:1 (v/v) mit Glycerin (100 %) versetzt und für nachfolgende Experimente bei -20 °C gelagert.

2.5.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in dieser Arbeit nach einer modifizierten Bradford-Methode (Bradford, 1976) unter Verwendung eines ROTI®-Quant Konzentrates. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Veränderung des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250 vom kationischen in einen anionischen Zustand nach der Bindung an basische Proteine in einem sauren Milieu. Durch diesen Zustandswechsel kommt es zu einer Absorptionsverschiebung von 465 nm nach 595 nm. Die Absorptionsintensität ist dabei proportional zur Proteinkonzentration. Zur Protein-Quantifizierung wurden 980 µl des verdünnten 5x Konzentrats mit 20 µl der in Kapitel 2.5.3 erhaltenen Elutionsfraktion versetzt. Die Probe wurde gemischt und für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Absorption der Probe bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Als Leerwert für die Messung der Absorption bei 595 nm wurde BXT - Puffer verwendet. Zur Bestimmung des Proteingehaltes, wurde der gemessene Wert mit Hilfe Kalibriergerade berechnet. Diese wurde zuvor aus unterschiedlichen Konzentrationen (0-1 mg/ml) von Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen erstellt.

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

Nach der Proteinaufreinigung wurde die Reinheit von BVU_3358 mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) untersucht. Diese Methode erlaubt die Auftrennung danaturierter Proteine in einer Gelmatrix und einem elektrischen Feld nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970).

Zur Vorbereitung wurden 10 µg des aufgereinigten Proteins zur Denaturierung mit 4x RotiR-Load (Carl Roth Karlsruhe, Deutschland) zu einer 1x-Konzentration gemischt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Neben der Denaturierung und Linearisierung führt das ionische Detergenz

Natriumdodecylsulfat (SDS = sodium dodecyl sulfate) zu einer Überlagerung der Eigenladung der Proteine. Die daraus resultierende negative Ladung aller Proteine ist proportional zu deren Größe. Nach der Probenvorbereitung wurden diese auf ein vorgefertigtes 12 %iges Mini-PROTEANR TGX Stain-Free™ Protein Gel (10 Vertiefungen, 30 µl, Bio-Rad Laboratories, Inc.) geladen.

Hierbei handelt es sich um ein diskontinuierliches Gel, welches sich aus einem Sammel- und einem Trenn-Gel zusammensetzt. Die Porengröße der einzelnen Gele werden durch die enthaltene Acrylamid/Bisacrylamid Konzentration bestimmt. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern die negativ geladenen Proteine Richtung Anode. Das Sammelgel (pH 6,8) dient zur Konzentrierung der Proteine vor dem Übergang in das Trenngel (pH 8). Dies wird durch ein Spannungsfeld zwischen dem im Laufmittel enthaltenen Leit-Ion (Chlorid) und Folge-Ion (Glycin) ermöglicht. Die Proteine laufen in diesem Spannungsfeld unabhängig von der Größe mit derselben Geschwindigkeit. Während des Übergangs in das Trenngel und somit in ein basisches Milieu, verändert das Glycin seine Eigenschaften eines Zwitterions in ein negativ geladenes Molekül. Aufgrund seiner geringen Größe läuft es nun den beladenen Proteinen voraus, wodurch die zuvor gegebenen Bedingungen des Spannungsfeldes entfallen. Die Proteine werden nun aufgrund der Porengröße des Acrylamid/Bisacrylamid-Gels nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dabei ist die Laufgeschwindigkeit umgekehrt proportional zum Molekulargewicht. Die Proteine wurden für 30 min bei 250 V in 1x TGS-Puffer (Bio- Rad Laboratories, Inc.) in einer vertikalen Gelkammer getrennt. Durch eine UV-induzierte und fluoreszierende Reaktion der in den verwendeten TGX Stain-Free™ Protein-Gele enthalten Trihalogen- Verbindungen mit Tryptophanresten von Proteinen ermöglicht eine färbungsfreie Detektion der Proteine. Zur Visualisierung wurde das ChemiDoc™ Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Inc.) bei einer Aktivierungszeit von 45 s verwendet. Zur Bestimmung der Proteingöße wurde der Precision Plus Protein™ Unstained Standard (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA) verwendet.

2.5.6 Nanoluc-Luciferase Assay

Um die Auswirkung der Deletion der Gene des Rhamnoseoperons aus *P. vulgatus* auf die Funktionalität des Rhamnose-induzierbaren Promotors $P_{RhaKIPAO}$ auf dem Plasmid pMM656

untersuchen zu können, wurde das Vektor kodierte Luciferase-Reportersystem verwendet. Außerdem wurde das System zur Untersuchung der Funktionalität von pMM656_TetQ in *B. xylanisolvens* genutzt.

Das Prinzip beruht auf der Expression des *nanoluc* Gens durch die rhamnose-abhängige Induktion des vorgeschalteten Promotors PRhaKIPAO. Die so produzierte Nano-Luc[®] Luciferase katalysiert in der Gegenwart von Sauerstoff die Oxidation des Substrates Furimazin zu Furimamid, wobei eine Biolumineszenz (E_{max} = 460 nm) entsteht. Die Intensität ist hierbei proportional zur Aktivität der Nano-Luc[®] Luciferase. Die Durchführung erfolgte unter Nutzung des Nano-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega, Walldorf, Deutschland). Zur Vorbereitung wurden die zu untersuchenden Stämme in einer 48 Well Platte in PY-G-Medium mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen (0 - 4 mM) unter anaeroben Bedingungen bei 37°C in einem Plattenlesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) kultiviert. Hierbei induzierte die Rhamnose den Promotor PRhaKIPAO, was zu einer Expression des dahintergelegenen *nanoluc* Gen führte.

Nach Erreichen der stationären Phase wurden 200 µl der Zellkultur mit Hilfe von 20 µl PopCulture-Reagenz (EMD Millipore, Darmstadt, Deutschland) und Lysozym (160 U) für 15 min bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurde der NanoLuc[®]-Luciferase Assay nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden 10 µl des Zelllysats mit 10 µl des Nanolucureagenz und dem Substrat Furimazin in einer schwarzen 96-Wellplatte vermischt. Die oben beschrieben entstehende Biolumineszenz hat eine Halbwertszeit von 2 h und wurde mit einer Integrationszeit von 1 sec in einem Infinite 200 PRO NanoQuant Mikroplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) unter aeroben Bedingungen gemessen. Die entsprechenden relativen Lichteinheiten (RLU) wurden auf OD1 normalisiert.

2.5.7 Ethanol-Fällung von Xylanen

Um sicher zu gehen, dass die verwendeten Buche-, Birke-, und Hafer-Xylane keine Mono- oder Di-Saccharide mehr enthalten, welche das Wachstum der Bacteroidaceae auf Xylan beeinflussen und somit die Untersuchungen verfälschen könnten, wurden die Xylane sowie das Pektin mittels Ethanol aufgereinigt.

Hierfür wurden als erstes 10 ml einer 10 %-igen Lösung der Xylane in dH₂O hergestellt. Diese wurde dann auf 50 ml mit Ethanol (100 %) aufgefüllt und gevortext. Durch die Zugabe von Ethanol, wird den langen Polymeren die Hydrathülle entzogen und diese fallen aus. Die kurzkettigen Oligosachharide hingegen bleiben in der wässrigen Phase gelöst. Nach einer Zentrifugation der Probe für 10 min bei 4000 rpm konnten die unerwünschten kurzkettigen Zucker verworfen werden. Das Xylan-Pellet wurde anschließend wieder in dH₂O gelöst und der Vorgang zwei weitere Male wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Pellet in 20 ml dH₂O resuspendiert und die Lösung bei -70°C eingefroren. Abschließend wurde die Lösung mit Hilfe einer Gefriertrocknung (Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) lyophilisiert. Danach wurde das aufgereinigte Xylan für die Verwendung in dH₂O gelöst und zum Sterilisieren bei 121°C während 21 min autoklaviert.

2.6 Analytische Methoden

2.6.1 Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Bei der Hochflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelt es sich um ein chromatographisches Verfahren, welches zur Auftrennung und Quantifizierung von Stoffgemischen genutzt wird. Hierbei werden die zu untersuchenden Proben in einem Laufmittel (mobile Phase) gelöst und somit über eine Trennsäule (stationären Phase) geführt. Die Auftrennung der einzelnen Stoffe in der Probe beruht auf deren unterschiedlichen Wechselwirkungen mit der stationären bzw. mobilen Phase. Dies führt zu unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten der Stoffe durch das Säulenmaterial und folglich zu unterschiedlichen Elutionszeiten der einzelnen Komponenten.

Durch die Nutzung von Standard-Substanzen können die unbekannten Stoffe über deren Elutionszeit identifiziert werden. Durch den Vergleich der Flächen der Detektorsignale von Standard-Substanzen mit bekannten Konzentrationen und der Flächen der zu untersuchenden Proben, können letztere zusätzlich quantifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde die Methode der HPLC zur Untersuchung der Stoffwechsel-Endprodukte von *P. vulgatus* und *B. xylanisolvens* genutzt. Hierfür wurden Kulturen in DMMX-Medium zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet und die Kulturüberstände 1:3 mit 5 mM H₂SO₄ verdünnt. Die Analyse erfolgte mit Hilfe einer Aminex HPX-87H 300 mm x

7,8 mm Säule (Biorad, München, Deutschland) und 5 mM H₂SO₄ (mobile Phase) bei 65 °C und einer Flussrate von 1,2 ml/min. Bei der Bio-Rad Aminex HPX-87H Säule handelt es sich um einen Kationenaustauscher, bei dem die stationäre Phase aus negativ geladenem Material besteht. Die Bindung und somit die Dauer bis zur durch Verdrängung der in der Probe gelösten Substanzen durch das Laufmittel hängt hierbei von der Stärke deren positiven Ladung ab. Grundsätzlich ist diese Säule für die Analyse von Mono- bis Disacchariden und organische Säuren geeignet. Die Detektion, sowie Quantifizierung der Substanzen erfolgte über den Brechungsindex-Detektor (RI). Wie zuvor erwähnt erfolgte die Quantifizierung von Substratverbrauch und Produktbildung in *P. vulgatus* durch die Verwendung von Standardsubstanzen.

Das System, welches zur Messung der kurzkettigen Fettsäuren sowie der als Substrat verwendeten Monosaccharide genutzt wurde, setzte sich aus folgenden Elementen zusammen:

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

2.6.2 Quantifizierung von Wasserstoff mittels Gaschromatographie

Bei der Gaschromatographie (GC) handelt es sich um eine chromatographische Methode zur Auftrennung und Analyse flüchtiger Verbindungen. Ähnlich wie bei der HPLC beruht das System auf der Interaktion der Gaskomponenten mit einer stationären (Säule) und einer mobilen Phase (Trägergas). Nach der Injektion wird die Probe in einem Ofen erhitzt und anschließend mit Hilfe des Trägergases durch die Chromatographiesäule geleitet. Je nach Stärke der Bindung zwischen den Probenkomponenten und der stationären bzw. mobilen Phase wird die Retentionszeit bestimmt. Diese wird beim Austreten der Analyten von der Säule mit Hilfe eines Detektors erfasst. Durch den Vergleich der Retentionszeit und der Signalstärke

mit Standardsubstanzen können die einzelnen Komponenten einer Probe identifiziert und quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der Gaschromatographie zur Quantifizierung des von *P. vulgatus* gebildeten Wasserstoffs (H_2) genutzt. Hierfür wurde die gebildete Gasphase mehrerer Kulturen innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase aufgefangen und das Volumen bestimmt. Anschließend wurden 100 μ l der Probe in einen Gaschromatographen (Shimadzu GC-14A; Shimadzu, Duisburg, Deutschland) injiziert. Die Injektortemperatur wurden dabei auf 120°C und die Detektortemperatur auf 110°C eingestellt. Die Säulentemperatur betrug 40°C. Als Trägergas (mobile Phase) wurde Argon verwendet. Der Wasserstoffanteil (v/v) der injizierten Probe wurde über den Vergleich der Detektorsignale mit einer Eichgerade aus unterschiedlichen H_2 -Volumina (100 % H_2 ; 10- 100 μ l) berechnet. Über das Gesamtvolumen der produzierten Gasmenge und unter Verwendung der Zustandsgleichung für ideale Gase ($p \cdot v = n \cdot R \cdot T$) konnte die Konzentration des durch *P. vulgatus* gebildeten Wasserstoffs bestimmt werden.

2.6.3 Kolorimetrische Quantifizierung von Pyrophosphat

Die Untersuchung der Enzymaktivität der Pyruvat:Orthophosphat-Dikinase (BVU_3358) aus *P. vulgatus* erfolgte über die Quantifizierung von Pyrophosphat (PPi). Diese Methode wurde modifiziert nach Putnins und Yamada (1975) durchgeführt. Der Nachweis von PPi beruht hierbei auf der Reaktion von PPi mit Molybdat in starker Schwefelsäure zu 12-molybdophosphorsäure. Diese führt anschließend unter reduzierenden Bedingungen zur Bildung eines blauen Molybdänkomplexes.

Die Durchführung erfolgte durch die Zugabe von 380 μ l des Probenansatzes (Kapitel 2.5.3) zu 380 μ l Trichloressigsäure (TCA; 12% [w/v]). Zusätzlich wurden 100 μ l Ammonium-tetramolybdat (2,5 % [w/v] in 2,5 M H_2SO_4), 100 μ l 0,5 M β -Mercaptoethanol und 40 μ l Eikonogen-Reagenz (Tab. 21) hinzugegeben. Nach einer Inkubation der Proben von 15 min bei 37°C wurde die Absorption bei 580 nm gemessen. Mit Hilfe einer Standardkurven konnten die PPi-Konzentrationen bestimmt werden.

Tabelle 21: Zusammensetzung des Eikonogen Reagenz

Substanz	Menge
H ₂ O vorlegen	80 ml
Na ₂ SO ₃	0,25 g
K ₂ S ₂ O ₅	14,65 g
1-Amino-2-naphtol-4-sulfonsäure	0,25 g
→ Bei 80°C lösen	
→ Auf RT abkühlen lassen	
H ₂ O	ad 100 ml

2.6.4 Bestimmung der Pyruvat:Orthophosphat-Dikinase Aktivität aus *P. vulgaris*

In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktionalität und Aktivität der Pyruvat:Orthophosphat-Dikinase (PPDK; BVU_3358) aus *P. vulgaris* sowohl in Bezug auf die Bildung von Pyruvat als auch auf die Bildung von Phosphoenolpyruvat (PEP) untersucht.

Unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser (H₂O), katalysiert die PPDK die Reaktion von Pyruvat zu PEP. Hierbei werden Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PPi) freigesetzt (Evans und Wood, 1968). In der Rückreaktion wird unter Verbrauch von PPi und AMP, PEP zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Magnesium (Mg²⁺) dient in der Reaktion als Cofaktor (Evans und Wood, 1968). Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in Tabelle 22 (Bildung von Pyruvat) und Tabelle 23 (Bildung von PEP) aufgeführt. In beiden Reaktionsansätzen wurden 50 µg Enzym eingesetzt.

Tabelle 22: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Bestimmung der Enzymaktivität der heterolog produzierten PPDK (BVU_3358) unter Bildung von Pyruvat

Substanz	Konzentration
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
AMP	1 mM
PPi	0,5 mM
MgCl ₂	3 mM

PEP	1 mM
PPDK (BVU_3358)	50 µg
H2O	Ad 500 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die Bestimmung der Enzymaktivität der heterolog produzierten PPDK (BVU_3358) unter Bildung von Phosphoenolpyruvat

Substanz	Konzentration
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
ATP	1 mM
MgCl ₂	3 mM
Pyruvat	1 mM
PPDK (BVU_3358)	50 µg
H2O	Ad 500 µl

Die Proben wurden bei 37°C inkubiert und in die Reaktion in regelmäßigen Zeitabständen durch eine 1:1 Mischung mit Trichloressigsäure (Kapitel 2.6.3) abgestoppt. Die Berechnung der Aktivität von BVU_3358 erfolgte über die diskontinuierliche Bestimmung von freigesetztem (Bildung von PEP) bzw. verbrauchtem (Bildung von Pyruvat) PPi. Die daraus erhaltene Absorptionsänderung pro Minute ($\Delta E/\text{min}$) wurde in folgender Gleichung zur Aktivitäts-Berechnung verwendet:

- $$\text{Volumenaktivität [U/ml]} = \frac{\Delta E}{\epsilon \cdot d} * \frac{\text{Testvolumen}}{\text{Enzymvolumen}}$$

Wobei ϵ der Extinktionskoeffizient des PPi Molybdat-Komplexes ($4,95 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) und d die Schichtdicke der Küvette (1 cm) ist.

- $$\text{Spezifische Aktivität [U/mg]} = \frac{\text{Volumenaktivität}}{c(\text{Enzym})}$$

Wobei c die eingesetzte Enzymkonzentration (mg/ml) ist.

2.6.5 Kolorimetrische Quantifizierung von Nitrit

Die Quantifizierung von Nitrit (NO_2^-) erfolgte in dieser Arbeit kolorimetrisch unter Verwendung des Lunges Reagenz, bestehend aus den Lösungen Lunge I und Lunge II. Die Methode basiert auf der Reaktion von Nitrit mit Sulfanilsäure (Lunge I) zu einem Diazonium-Ion. Dieses reagiert

in einem nächsten Schritt mit 1-Naphtylamin. Hierbei entsteht eine rote Azo-Verbindung, welche eine Absorption bei 540 nm zeigt (Zimmermann & Lengerken, 1979). Die Zusammensetzung der Lösungen Lunge I und Lunge II sind in Tabelle 24 und Tabelle 25 aufgeführt.

Tabelle 24: Zusammensetzung Lunge I

Substanz	Menge
Sulfanilsäure	1 g
Eisessig	30 ml
dH ₂ O	ad 100 ml

Tabelle 25: Zusammensetzung Lunge II

Substanz	Menge
1-Naphtylamin	1 g
dH ₂ O	ad 50 ml

Für die Durchführung wurden 50 µl einer Probe (aus Kapitel 2.3.7) in eine 96 Well-Platte transferiert und mit jeweils 50 µl der Lunge I- und Lunge II- Lösung versetzt. Darauf folgte eine Inkubation der Proben für 10 min bei Raumtemperatur. Die Absorption wurde anschließend bei 540 nm unter Verwendung eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer zuvor angelegten Standardkurve mit unterschiedlichen Nitrit-Konzentrationen.

3. Ergebnisse

Aufgrund der stetig wachsenden Weltbevölkerung und zunehmenden Knappheit von Ressourcen werden fossile Rohstoffe ein immer wertvolleres Produkt mit steigenden Preisen. Langfristig gesehen ist daher ein Umstieg der petrochemisch basierten Herstellungsprozesse von Plattformchemikalien zu biotechnologischen Herstellungsmethoden unverzichtbar (Nghiem *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018). Eine der am meisten produzierten Plattformchemikalien weltweit ist Succinat. Das Anwendungsgebiet dieser Verbindung erstreckt sich von der Chemie- und Pharmaindustrie zur Herstellung von Detergenzien, dem Kunststoff Polybutylen-Succinat und Kosmetika bis hin zur Lebensmittelindustrie, wo die Verbindung als Lebensmittelzusatzstoff verwendet wird (Nghiem *et al.*, 2017; Saxena *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020). Neben der petrochemischen Synthese entsteht Succinat auch als natürliches Produkt im Stoffwechsel vieler anaerober Bakterien. Dementsprechend birgt die biotechnologische Herstellung von Succinat großes Potenzial (Liu *et al.*, 2022; Mitrea *et al.*, 2024).

Escherichia coli, *Basfia succiniciproducens* und *Corynebacterium glutamicum* sind Beispielorganismen, für die bereits genetische Systeme etabliert wurden, und welche sich als vielversprechende Succinat-Produzenten bewährt haben (Thakker *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014; D’ambrosio *et al.*, 2021). Einige davon wie beispielsweise *Basfia succiniciproducens* haben auch bereits erste Anwendungen in der Industrie gefunden, allerdings führen die hohen Betriebskosten dazu, dass die petrochemische Herstellung bisher unverzichtbar bleibt (D’ambrosio *et al.*, 2021). Kürzlich hat zusätzlich das Interesse an Spezies der Familie Bacteroidaceae für biotechnologische Anwendungen zugenommen (Isar *et al.*, 2006; Döring & Basen, 2024). Vertreter dieser Familie spielen nicht nur aufgrund einer hohen Abundanz in der menschlichen Darmmikrobiota eine wichtige Rolle, sondern sind auch für die Metabolisierung von pflanzlichen Polysacchariden, wie beispielsweise Hemicellulosen und Pektinen, bekannt (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012). Zusätzlich nahm die Entwicklung von neuen genetischen Werkzeugen für die Anwendung in Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* in den letzten Jahren zu (Mimee *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 2020; Lück & Deppenmeier, 2022; Neff *et al.*, 2023). Die Übertragung dieser Systeme auf *P. vulgatus* hat erst

kürzlich die Reduktion von unerwünschten Nebenprodukten sowie eine Steigerung der Succinat-Produktion ermöglicht (Lück, 2023).

Ein Ziel dieser Arbeit war die weitere Optimierung der Succinat-Produktion in *P. vulgatus* mit Hinblick auf die Generierung eines Homosuccinat-Produzenten. Aufbauend auf den bisherigen Ergebnissen sollten die neu etablierten genetischen Systeme für *P. vulgatus* genutzt werden, um weitere Stoffwechselelemente in Richtung der Succinat-Produktion zu lenken. Zusätzlich sollten weitere Vertreter der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* identifiziert werden, die sich für die in *P. vulgatus* etablierten Systeme eignen. Darauf aufbauend sollte ebenfalls deren Eignung für die biotechnologische Succinat-Produktion überprüft werden.

3.1 Optimierung der Succinat-Produktion in *P. vulgatus*

3.1.1 Deletion des für die Pyruvat-Kinase kodierenden Gens *bvu_0876*

Die effiziente Produktion von Plattformchemikalen, wie beispielsweise Succinat, durch Mikroorganismen, geht in der Biotechnologie oft mit genetischen Modifikationen des Stoffwechsels der entsprechenden Organismen einher. Diese genetischen Veränderungen umfassen zum Einen die Überexpression von Genen, um so die Produktausbeute zu optimieren, und zum Anderen das Ausschalten der Stoffwechselwege unerwünschter Nebenprodukte durch die Deletion entsprechender Gene. In vorherigen Studien wurden in *P. vulgatus* bereits die Gene der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MM-CoA-Mutase, *bvu_0309-0310*), der D-Lactat-Dehydrogenase (LDH, *bvu_2499*) und der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL, *bvu_2880*) deletiert (Lück, 2023). Diese Arbeit resultierte im Stamm *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310 \Delta 2499 \Delta 2880$ (*P. vulgatus* 3xKO), welcher ausschließlich Succinat und Acetat als Stoffwechselendprodukte bildet. Zusätzlich zur Eliminierung der unerwünschten Nebenprodukte von Propionat, Lactat und Formiat, erhöhten die genannten Deletionen die Succinat-Ausbeute (Lück, 2023).

Daran angeknüpft wurde in dieser Arbeit versucht, ausgehend von *P. vulgatus* 3xKO, die Produktion von Acetat als letztes Konkurrenzprodukt von Succinat, auszuschalten.

Die Unterbindung der Acetatbildung im Stoffwechsel von *P. vulgatus* bietet mehrere Angriffsmöglichkeiten. In dieser Arbeit wurde zunächst versucht zu Beginn des fermentativen

Astes die Transphosphorylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) zu Pyruvat (Pyr) und ATP zu verhindern. Hierfür wurde das für die Pyruvatkinase kodierende Gen *bvu_0876* als Deletionsziel gewählt. Durch diese Deletion sollte sämtliches durch die Glykolyse gebildete Pyruvat vollständig in die anaerobe Respiration zur Bildung von Succinat geleitet werden.

Hierfür wurde das von Neff *et al.* (2023) etablierte markerlose Deletionssystem für *P. vulgaris* verwendet. Dieses System basiert auf zwei aufeinanderfolgenden homologen Rekombinationen, welche zwischen dem Plasmid und der genomischen DNA stattfinden. Die anschließende Gegenselektion basiert auf der Nutzung von Saccharose und der ursprünglich aus *B. subtilis* stammenden Levansucrase SacB (EC 2.4.1.10) (Kapitel 2.4.1.3 aus Material und Methoden) (Neff *et al.*, 2023).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur markerlose Deletion von *bvu_0876* das Plasmid pMM656_Δ0876 generiert (Abb. 3 A). Grundlage für dessen Konstruktion bildete das Plasmid pMM656_ΔsacB (Neff *et al.*, 2023).

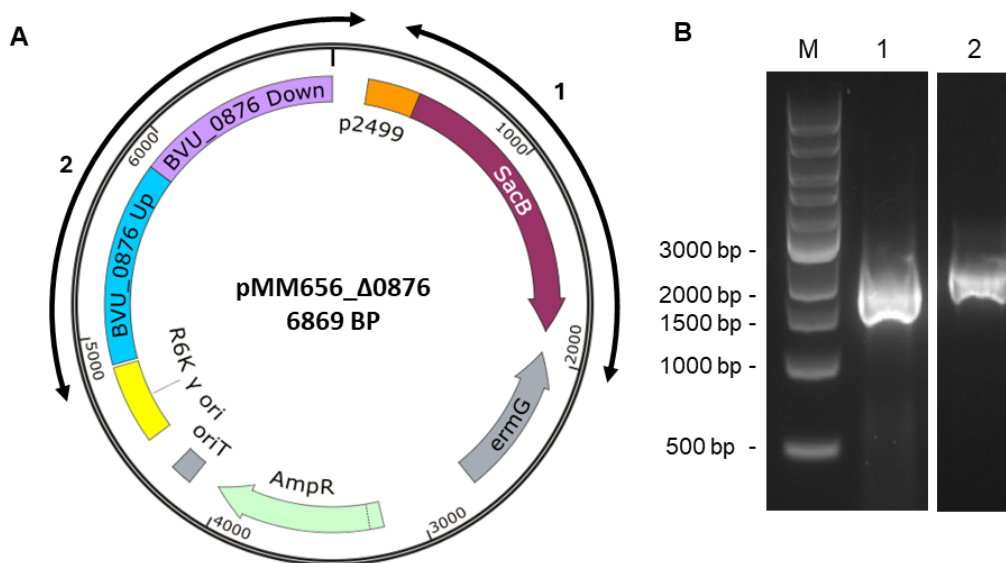


Abbildung 3: Konstruktion des Plasmids pmm656_Δ0876. (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_Δ0876 zur Deletion des Gens *bvu_0876* in *P. vulgaris* 3xKO. Auf dem Plasmid befinden sich die jeweils 1000 bp lange up- und downstream-Region von *bvu_0876* für die homologe Rekombination. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid der Promotor des Gens *bvu_2499* (p2499). Dieser initiiert die Transkription des *sacB*-Gens, welches als Gegenselektionsmarker dient. Die Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR) dient der Selektion von *E. coli* und die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermG*) der Selektion von *Bacteroides*-Spezies. OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der korrekten Assemblierung der up- und downstream-Region von *bvu_0876* in pMM656_ΔsacB. Die verwendeten Primerpaare pMM656sacB seq_fw/rev sowie scr-pmm656_up_fw/rev binden jeweils in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz von *sacB* (Spur 1) beziehungsweise die up-down-Sequenz von *bvu_0876* (Spur 2). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Die genaue Durchführung der Klonierung und Deletion ist in den Kapiteln 2.4.9 und 2.4.13 in Material und Methoden beschrieben. Als homologe Bereiche für die Rekombination wurden 1000 bp *upstream* (*up*) und 1000 bp *downstream* (*down*) von *bvu_0876* gewählt. Diese wurden aus *P. vulgatus* unter Nutzung der Primerpaare *up_3787_fw/rev* (*up*-Sequenz) sowie *down_3787_fw/rev* (*down*-Sequenz) (Tab.7) amplifiziert.

Nach der Generierung und Transformation des Konstruktes in *E. coli* β 2155, wurde die korrekte Assemblierung von *pMM656_Δ0876* mittels Kolonie-PCR (Abb. 3 B) und Sequenzierung überprüft. Zum Einen wurde mit dem Primerpaar *pMM656sacB seq_fw/rev* (Tab. 7) das *sacB*-Gen (1965 bp, Spur 1) nachgewiesen und zum anderen erfolgte der Nachweis der richtigen Assemblierung der *up*- und *downstream*-Region von *bvu_0876* in den Vektor (2490 bp, Spur 2) über die im Plasmidrückgrat bindenden Oligonukleotide *scr-pmm656_up_fw/rev* (Tab. 7). In einem nächsten Schritt wurde der Vektor *pMM656_Δ0876* über biparentale Konjugation aus dem Donor Stamm *E. coli* β 2155 in *P. vulgatus* 3xKO transferiert. Im Anschluss wurde mittels Kolonie-PCR die genomische Integration des Plasmids über den Nachweis des Gens *sacB* in *P. vulgatus* 3xKO überprüft und somit die erste homologe Rekombination bestätigt (Abb. 4). Hierfür wurden die Primer *pMM656sacB_seq_fw/rev* (Tab. 7) genutzt, welche den Erwartungen entsprechende ein 1965 bp großes Fragment erzeugten (Abb. 4, Spur 1). Da sich das Plasmid nicht im Wildtyp-Stamm befand, konnte dementsprechend kein Fragment amplifiziert werden (Abb. 4, Spur 2).

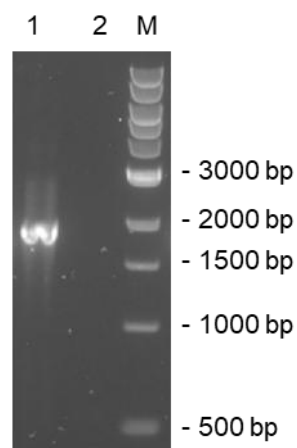


Abbildung 4: Kolonie-PCR zum Nachweis der ersten homologen Rekombination von *pMM656_Δ0876* in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO. Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis von *sacB* in der ersten homologen Rekombinanten (Spur 1) und in *P. vulgatus* 3xKO (Spur 2). Die verwendeten Primer *pMM656sacB seq_fw/rev* binden in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz von *sacB*. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Im Anschluss an die Integration des Plasmids pMM656_Δ0876 in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO erfolgte die Initialisierung der zweiten homologe Rekombination. Da es sich bei den Kolonien auf den saccharosehaltigen Platten sowohl um Deletionsmutanten als auch Revertanten handeln könnte, wurde die Deletion von *bvu_0876* mittels PCR (Abb. 5) nachgewiesen. Zusätzlich wurde mittels Sequenzierung (Abb.5) überprüft, ob die Deletion basengenau erfolgt war.

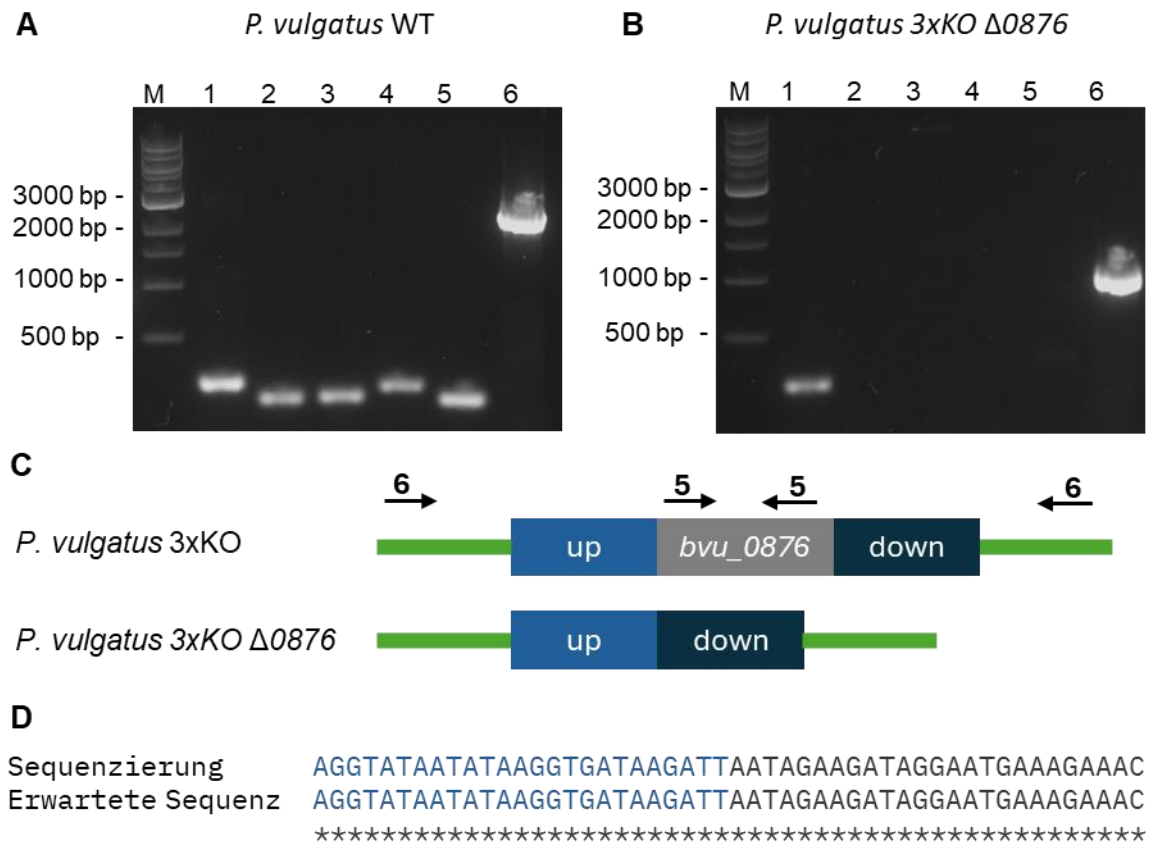


Abbildung 5: Kolonie-PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Deletion von *bvu_0876* (Pyruvat-Kinase) in *P. vulgatus* 3xKO. (A) und (B) Agarosegel zum Nachweis von *bvu_0876* (Spur 5 und 6) in *P. vulgatus* WT (A) und Kolonien nach der zweiten homologen Rekombination in *P. vulgatus* 3xKO (B). Die verwendeten Primer 16S_Bac fw/rev binden innerhalb der 16S RNA von *Bacteroides*-Spezies (Spur 1). Die Primer qPCR_bvu0309 fw/rev (Spur 2), qPCR_LDH fw/rev (Spur 3) sowie qPCR_bvu2880 fw/rev (Spur 4) binden innerhalb der Gene der MM-CoA-Mutase, der LDH und der PFL. Die in Spur 5 verwendeten Primer qPCR_BVU0876_for/rev binden innerhalb des Gens *bvu_0876*. Die Primer scr_KO_BVU0876_for/rev (Spur 6) flankieren den Deletionsbereich. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (C) Schematische Darstellung der chromosomalen DNA in *P. vulgatus* 3xKO und in *P. vulgatus* 3xKO Δ0876 sowie der Bindungsbereiche der Primer. (D) Sequenzierung des Deletionsbereiches zur Bestätigung der Deletion des Gens *bvu_0876* in der chromosomalen DNA von *P. vulgatus* 3xKO Δ0876.

Mittels 16S-spezifischer primer wurde nachgewiesen, dass es sich bei den untersuchten Kolonien um *P. vulgatus* handelte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass es sich bei dem verwendeten Stamm um *P. vulgatus* 3xKO handelte, da die Gene der MMCM, PFL und LDH nicht mehr vorhanden waren (Abb. 5 B, Spur 1-3). Die verwendeten Primer qPCR_BVU0876_for/rev (Tab.7) binden innerhalb des Gens *bvu_0876* (Abb. 5 C,6) und bildeten in *P. vulgatus* 3xKO ein Fragment von 178 bp (Abb. 5 A, Spur 5). Erwartungsgemäß konnte dieses Fragment in der Deletionsmutante nicht amplifiziert werden (Abb. 5 B). Die Primer scr_KO_BVU0876_fw/rev (Tab.7) flankierten den Deletionsbereich (Abb. 5 C,6). Während das so erzeugte Fragment in *P. vulgatus* WT eine Größe von 2582 bp (Abb. 5 A, Spur 6) hatte war das Fragment aus *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876 mit 1118 bp (Abb. 5 B, Spur 6) deutlich kleiner. Somit wurde die Deletion von *bvu_0876* nachgewiesen. Eine darauffolgende Sequenzierung (Abb. 5, D) unter Verwendung der Primer scr_KO_BVU0876_fw/rev (Abb. 5 C, 6) bestätigte die markerlose Deletion von *bvu_0876* aus dem Genom von *P. vulgatus* 3xKO und somit die Generierung von *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876.

3.1.1.1 Phänotypanalyse von *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876

Nachdem der erwünschte Genotyp generiert wurde, sollte der Phänotyp von *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876 näher untersucht werden. Da das Ziel der Deletion von *bvu_0876* die Unterbindung der Acetat-Produktion war, wurde erwartet, dass der neue Stamm dieses Endprodukt nicht mehr bilden konnte. Daraus resultierend war eine mögliche Erhöhung des Succinat-Ertrags zu erwarten. Um diese Erwartungen zu überprüfen, wurden in einem nächsten Schritt die Bildung der Stoffwechselendprodukte von *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876 mittels HPLC untersucht (Abb. 6 A). Gegen die Erwartungen wurde Acetat weiterhin im Überstand der Kultur detektiert (Abb. 6 A). Um festzustellen, ob die Deletion irgendeine Auswirkung auf die Acetat-Produktion hatte, wurden zusätzlich die Stoffwechselendprodukte von *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876 und *P. vulgatus* 3xKO verglichen (Abb. 6 B). Hierfür wurden jeweils 7 Kulturen auf minimal Medium mit 18 mM Xylose (DMMX) kultiviert und die Überstände mittels HPLC analysiert. Doch auch hier konnten keine Unterschiede detektiert werden. Mit $11,9 \pm 2,2$ mmol/g TG produzierte die Deletionsmutante vergleichbare Mengen Acetat wie *P. vulgatus* 3xKO ($11,2 \pm 2,7$ mmol/g TG). Auch hinsichtlich der Succinat-Produktion konnte

zwischen *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ ($8,4 \pm 2,3$ mmol/g TG) und dem Ausgangsstamm ($8,6 \pm 1,3$ mmol/g TG) keine Veränderung festgestellt werden (Abb. 6 B).

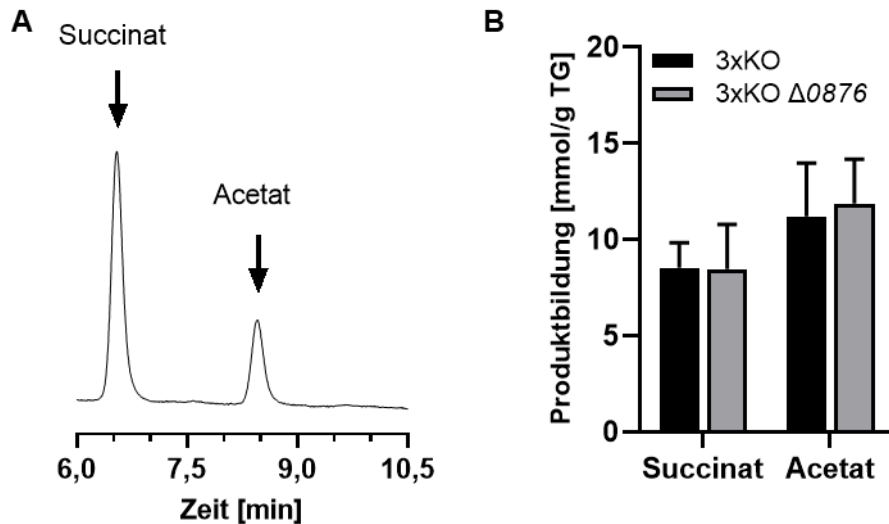


Abbildung 6: Stoffwechselendproduktbildung in *P. vulgatus* 3xKO und *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$. (A) HPLC-Chromatogramm der Stoffwechselendprodukte in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$. (B) Vergleich der Endprodukte zwischen *P. vulgatus* 3xKO und *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$. Jeweils 7 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen verrechnet. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Da die Ergebnisse keine Abweichungen in der Acetatproduktion von *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ zum Ausgangsstamm zeigten musste davon ausgegangen werden, dass entweder die Pyruvatkinase in *P. vulgatus* nicht hauptverantwortlich in der Umwandlung von PEP zu Pyruvat ist oder in dem Organismus ein weiteres Enzym produziert wird, welches bei Fehlen der Pyruvatkinase deren Aufgabe übernehmen kann.

3.1.1.2 Heterologe Produktion der Pyruvat:Ortophosphat-Dikinase (BVU_3358) in *E. coli*

Da die Deletion des für die Pyruvat-Kinase kodierenden Gens keinen Effekt auf die Acetat-Produktion zeigte, wurde angenommen, dass ein anderes Enzym in *P. vulgatus* in der Lage ist, PEP zu Pyruvat umzusetzen. Ein Enzym, was diese Aufgabe in *P. vulgatus* übernehmen könnte, wäre die Pyruvat:Ortophosphat-Dikinase (PPDK, BVU_3358). Dieses Enzym spielt typischerweise in der Glukoneogenese eine wichtige Rolle, indem es Pyruvat zu PEP

umwandelt. Allerdings wurde auch die umgekehrte Richtung von PEP zu Pyruvat unter Bildung von ATP bereits in mehreren Organismen beschrieben (Varela-Gómez *et al.*, 2004; Taillefer *et al.*, 2015; Olson *et al.*, 2017). Daran angeknüpft wurde in dieser Arbeit untersucht, ob dieses Enzym in *P. vulgatus* die Aufgabe der Pyruvatkinase übernehmen könnte. Dazu wurde zunächst mittels Transkriptanalyse untersucht, ob das entsprechende Gen *bvu_3358* in *P. vulgatus* zusätzlich zu *bvu_0876* exprimiert wird.

Hierfür wurde *P. vulgatus* 3xKO in DMMX-Medium kultiviert, die RNA der Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase extrahiert und mittels RT-qPCR analysiert. Als Referenzgen diente das für das ribosomale Protein L23 kodierende Gen (*l23*).

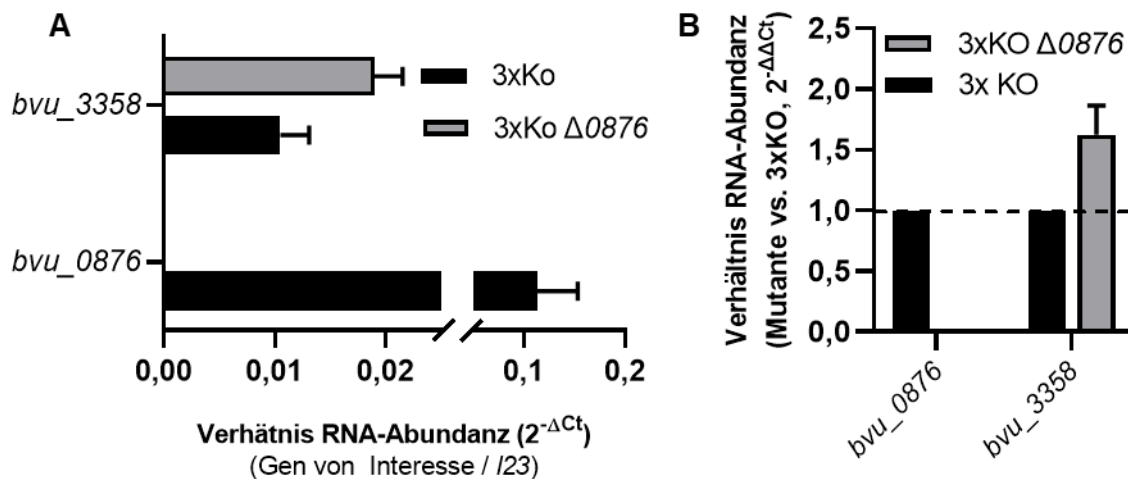


Abbildung 7: Transkriptanalyse der Gene der Pyruvat-Kinase und Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase in *P. vulgatus* 3xKO und in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$. (A) Dargestellt ist die relative Transkriptmenge der Gene *bvu_0876* und *bvu_3358* im Vergleich zum Referenzgen *l23* in *P. vulgatus* 3xKO (Schwarz) und *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ (grau). Zur Auswertung wurde der ΔCT -Wert zwischen den jeweiligen Genen von Interesse und dem Referenzgen *l23* berechnet und anschließend mit der Formel $2^{-\Delta CT}$ das Verhältnis der mRNA-Abundanz ermittelt. (B) Gezeigt ist die mRNA-Abundanz von *bvu_0876* und *bvu_3358* in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ normiert auf die von *P. vulgatus* 3xKO (1, schwarze Linie). Zur Berechnung wurde ausgehend vom ΔCT -Wert der $\Delta\Delta CT$ -Wert bestimmt und darauf die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ angewendet. Die dargestellten Experimente wurden jeweils in drei technischen Replikaten aus RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Im Wildtyp-Stamm lag die Transkriptabundanz von *bvu_0876* im Vergleich zum Referenzgen *l23* bei $0,11 \pm 0,04$ (Abb. 7, A). Die Abundanz von *bvu_3358* im Vergleich zu *l23* betrug hingegen nur $0,01 \pm 0,003$ (Abb. 7, A). Diese Ergebnisse der Transkriptanalyse bestätigten, dass *bvu_3358* auch in *P. vulgatus* exprimiert wird, wenn auch in einer geringeren Menge als

bvu_0876 (Abb. 7, A). Diese Erkenntnis erhöhte die Wahrscheinlichkeit, dass das Enzym tatsächlich die Pyruvatkinase ersetzen könnte.

Im Zuge dieser Untersuchungen, wurde die Transkript-Abundanz beider Gene auch in der neu generierten Deletionsmutante *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ analysiert. Erwartungsgemäß konnte in dieser Mutante kein Transkript von *bvu_0876* detektiert werden (Abb. 7, A). Allerdings war auffällig, dass die Transkript-Abundanz von *bvu_3358* in diesem Stamm mit $0,02 \pm 0,03$ im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO, welcher noch über ein PPDK-Gen verfügte, erhöht war (Abb. 5, A). Um dies zu verdeutlichen, wurde die Transkript-Abundanz von *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ auf die von *P. vulgatus* 3xKO normiert (Abb. 7, B). Letztere ist als gestrichelte Linie bei 1 dargestellt. Aus diesen Daten ging hervor, dass bei fehlender Expression von *bvu_0876*, die mRNA-Abundanz von *bvu_3358* $1,6 \pm 0,2$ -mal so hoch ist, als bei vorhandenem *bvu_0876* (Abb. 7, B). Zusammenfassend zeigten die Daten der Transkriptanalyse, dass die PPDK in *P. vulgatus* auch unter normalen Bedingungen mit Xylose als Substrat exprimiert wird. In Folgeexperimenten sollte nun überprüft werden, ob BVU_3358 die Umwandlung von PEP zu Pyruvat katalysieren kann.

Um die PPDK aus *P. vulgatus* genauer untersuchen zu können und festzustellen, ob das Enzym tatsächlich die Reaktion in beide Richtungen katalysieren kann, erfolgte eine heterologe Produktion und Aufreinigung des Enzyms. Hierfür wurde das Gen *bvu_3358* in den Überexpressionsvektor pASK_IBA_5 (pASK5) kloniert und in *E. coli* DH5 α eingebracht. Anschließend erfolgte eine heterologe Produktion und affinitätschromatographische Aufreinigung von BVU_3358. Für die Klonierung wurde das Gen *bvu_3358* unter Verwendung der Primer pASK5_bvu3358_fw und pASK5_bvu3358 (Tab.7) aus dem Genom von *P. vulgatus* amplifiziert. Über das Primer-Design wurde vor und nach der amplifizierten Nukleotidsequenz eine *Bsal*-Schnittstelle eingebaut. Darauf folgten ein Verdau des Amplifikats und des Vektors durch *Bsal* und eine anschließende Ligation. Das so generierte Plasmid pask5_bvu_3358 (Abb. 8, A) wurde mittels Hitzeschock in *E. coli* DH5 α transferiert. Unter Verwendung der Primer pASK_fw /rev in einer Kolonie-PCR konnte erwartungsgemäß ein 2943 bp großes Fragment amplifiziert und somit die korrekte Klonierung und der Transfer des Plasmids nachgewiesen werden (Abb. 8, B).

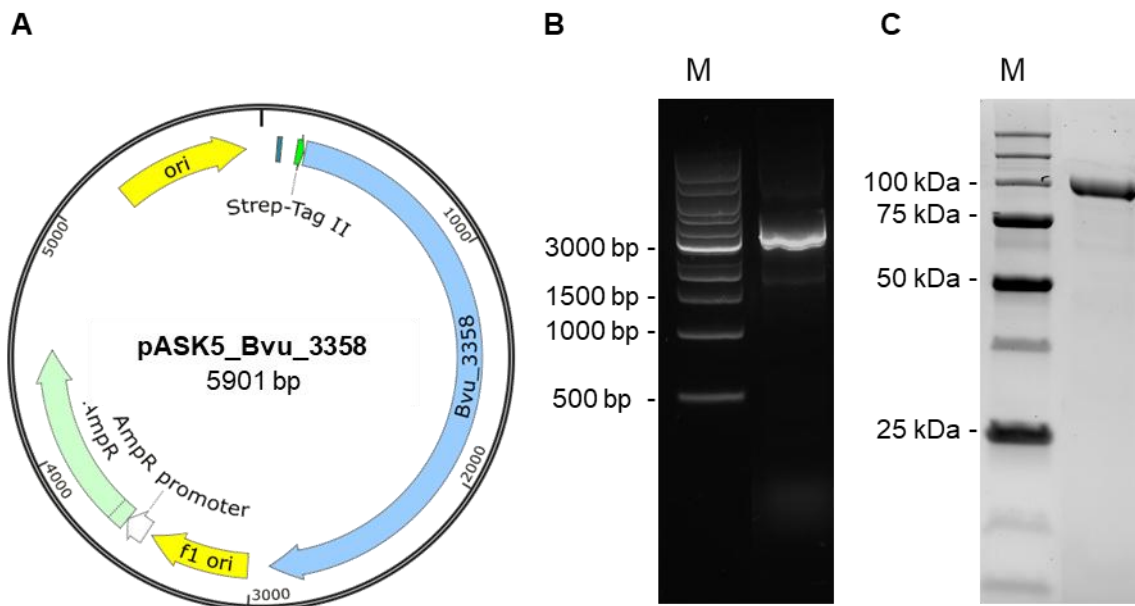


Abbildung 8: Plasmidkarte des Konstruktes pASK5_bvu_3358, Nachweis des Konstruktes in *E. coli* DH5α und SDS-Page Analyse von bv_u_3358. (A) Plasmidkarte des erstellten Vektors pASK5_bvu_3358 für die heterologe Überproduktion von bv_u_3358 in *E. coli* DH5α. Die Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR) dient der Selektion in *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis des Konstruktes pASK5_bvu_3358 in *E. coli* DH5α. Die verwendeten Primer pASK_for und pASK_rev binden jeweils im Plasmidrückgrat und flankierten die Sequenz von bv_u_3358. M: 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (C) SDS-Page des aufgereinigten Proteins BVU_3358. M: Precision Plus Protein™ Unstained Protein Standards (Bio Rad, Temse, Belgien).

Als nächstes erfolgte die heterologe Produktion des Enzyms gefolgt von der Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie über den an BVU_3358 N-terminal fusionierten Strep-Tag. Mittels Proteinquantifizierung (Bradford, 1976) wurde eine Proteinausbeute von 4,5 mg/ml gemessen. Zusätzlich wurde die Reinheit der Elutionsfraktion mittels SDS-Page analysiert. Dabei wurde eine deutliche Bande bei 99 kDa detektiert, welche der berechneten Größe der PPKD entsprach (Abb. 8, C).

3.1.1.3 Charakterisierung der Pyruvat:Ortophosphat-Dikinase (BVU_3358)

Im Folgenden wurde die Funktionalität des Proteins BVU_3358 in einem Enzymassay untersucht. Das Enzym PPKD katalysiert unter Verbrauch von Adenosintriphosphat (ATP) die Reaktion von Pyruvat zu PEP, wobei Adenosinmonophosphat (AMP) und Pyrophosphat (PPi) freigesetzt werden (Evans & Wood, 1968) (Abb. 9). In der Rückreaktion wird unter Verbrauch

von P_{Pi} und AMP, PEP zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Als Cofaktor benötigt das Enzym Magnesium (Mg²⁺) (Evans & Wood, 1968).

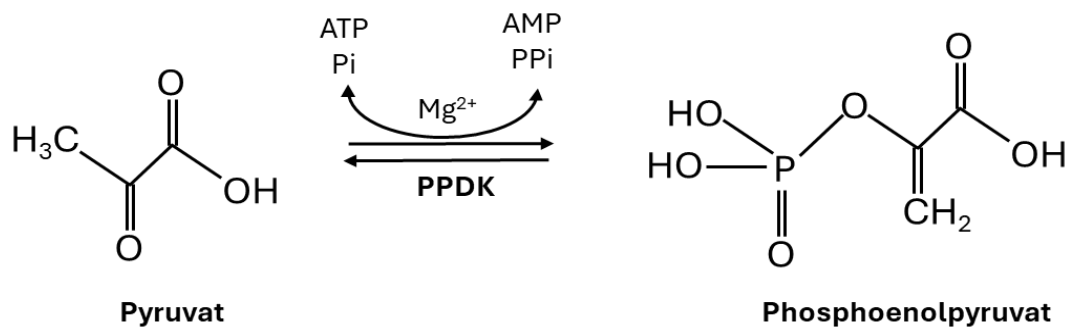


Abbildung 9: Reaktionsgleichung nach Evans und Wood (1968) der Umwandlung von Pyruvat zu PEP sowie die Rückwärtsreaktion durch die Katalyse der PPDK. ATP: Adenosin-Tri-Phosphat; AMP: Adenosin-Mono-Phosphat; P_i: Phosphat; P_{Pi}: Pyrophosphat; PPDK: Pyruvat:Orthophosphat-Dikinase.

Die Bildung beziehungsweise der Verbrauch von P_{Pi} kann nach einer modifizierten Methode von Putnins und Yamada (1975) in einem diskontinuierlichen kolorimetrischen Assay nachgewiesen werden. Dieser Nachweis basiert auf der Reaktion von P_{Pi} mit Molybdat zu einem blauen Molybdat-P_{Pi}-Komplex unter sauren Bedingungen, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 580 nm gemessen werden kann. Mit Hilfe einer Eichgeraden wurde über die Absorption die Freisetzung von P_{Pi} und somit die Entstehung von PEP (Abb. 10 A) oder der Verbrauch von P_{Pi} und somit die Entstehung von Pyruvat (Abb. 10 B) quantitativ gemessen. Die Reaktion erfolgte bei 37°C in 1 M Tris/HCl Puffer und unter dem Einsatz von 50 µg Protein. Anhand der Freisetzung von P_{Pi} ausgehend von Pyruvat (Abb. 10 A) wurde gezeigt, dass die PPDK von *P. vulgatus* in der Lage ist Pyruvat in PEP umzusetzen. Zusätzlich konnte bestätigt werden, dass die entgegengesetzte Reaktion von PEP zu Pyruvat unter dem Verbrauch von P_{Pi} ebenfalls von BVU_3358 katalysiert wird (Abb. 10 B). Bei der Reaktion von PEP zu Pyruvat konnte bereits nach einer Inkubationszeit von 4 min eine Abnahme an P_{Pi} gemessen werden. Nach einer Reaktionszeit von 30 min kam die Reaktion zum Erliegen, und es konnte kein P_{Pi} mehr nachgewiesen werden, da die anfänglichen 0,5 mM P_{Pi} vollständig aufgebraucht waren (Abb. 10 B). In der Reaktion von Pyruvat zu PEP wurden nach 160 min Reaktionslaufzeit erst 0,03 mM P_{Pi} gebildet (Abb. 10 A). Mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten des P_{Pi}-Molybdatkomplexes (4,95 mM⁻¹ cm⁻¹) und der Absorptionsveränderung über die Zeit (ΔE/min) wurde erst die Volumen- und daraufhin die spezifische Aktivität von BVU_3358 in beiden

Reaktionsansätzen bestimmt. Die Berechnung erfolgte, wie in Kapitel 2.6.4 (Material und Methoden) beschrieben. Für die Umsetzung von Pyruvat zu PEP wurde für BVU_3358 eine spezifische Aktivität von 3,2 U/mg bestimmt. Für die Rückreaktion von PEP zu Pyruvat betrug die spezifische Aktivität 157,6 U/mg.

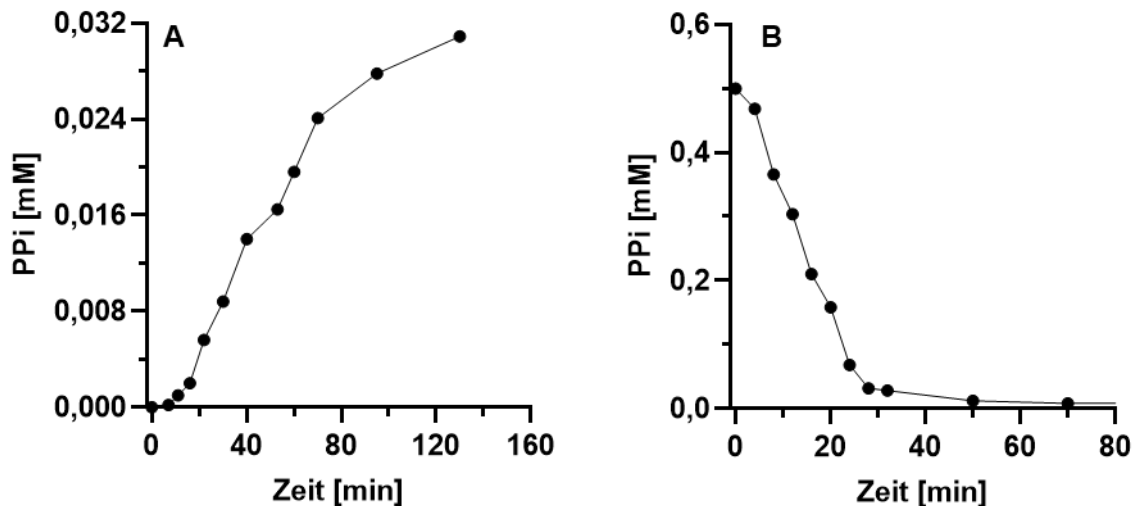


Abbildung 10: Nachweis von Pyrophosphat (PPI) zur Untersuchung der Aktivität von BVU_3358. (A) Freisetzung von PPI während der Umwandlung von Pyruvat zu PEP durch BVU_3358. (B) Verbrauch von PPI durch die von BVU_3358 katalysierte Umsetzung von PEP zu Pyruvat. Beide Reaktionsansätze enthielten 50 µg Protein, 1M Tris-HCL (pH 7,4) und wurden bei 37°C inkubiert. Jeweils 10 mM Pyruvat und ATP (A) beziehungsweise PEP und AMP (B) dienten als Substrat. In B wurden zusätzlich 0,5 mM PPI als Substrat eingesetzt. In regelmäßigen Abständen wurden Proben entnommen, die Reaktion abgestoppt und wie in Kapitel 2.6.3 beschrieben weiterverarbeitet. Nach der Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 580 nm wurden die entsprechenden Konzentrationen über eine Eichgerade berechnet.

Diese Ergebnisse ließen schlussfolgern, dass die PPDK aus *P. vulgaris* durchaus in der Lage ist die Funktion der Pyruvatkinase zu übernehmen und so die Bereitstellung von Pyruvat für den fermentativen Ast zu sichern. Anhand des auffälligen Unterschieds in den ermittelten spezifischen Aktivitäten kann angenommen werden, dass die Umsetzung von PEP zu Pyruvat der primären Reaktion der PPDK entspricht.

3.1.2 Weitere Ansätze zur Unterbindung der Acetat-Produktion in *P. vulgatus*

3.1.2.1 Deletionsversuch der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787)

Im vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass die Deletion des Gens für die Pyruvat-Kinase (*bvu_0876*) keinen Einfluss auf die Acetatproduktion von *P. vulgatus* 3xKO hatte. Daher wurde im weiteren Verlauf das nächste Gen im Stoffwechselweg, *bvu_3787*, genauer untersucht. Dieses Gen kodiert eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR). Die PFOR katalysiert die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und CO₂ unter Freisetzung von reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}). Die Deletion von *bvu_3787* sollte die entsprechende Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verhindern. Da in *P. vulgatus* 3xKO auch das Gen der Pyruvat:Formiat-Lyase (*pfl*) bereits deletiert wurde, sollte es somit keinen möglichen Weg zur Bildung von Acetat mehr geben. Zur Deletion von *bvu_3787* wurde der Vektor pMM656_Δ3787 (Abb. 11 A) generiert.

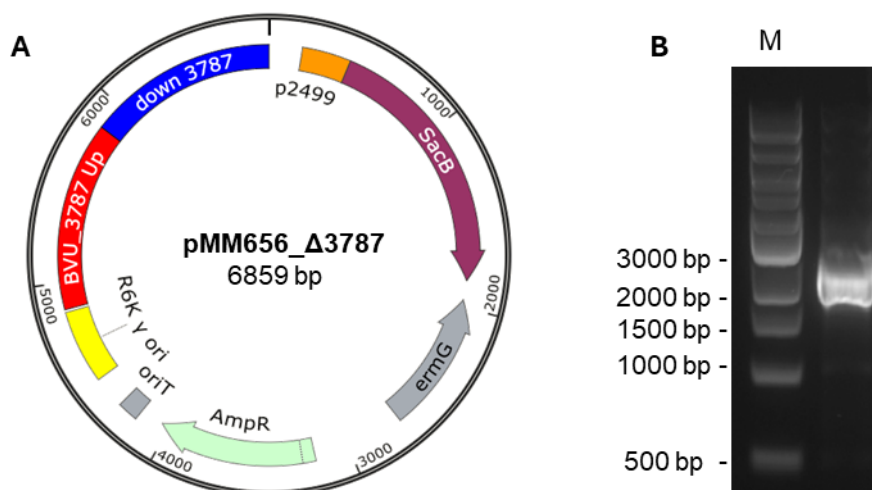


Abbildung 11: Konstruktion des Vektors pMM656_Δ3787. (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_Δ3787 zur Deletion des Gens *bvu_3787* in *P. vulgatus* 3xKO. Auf dem Plasmid befinden sich die jeweils 1000 bp lange up- und downstream-Region von *bvu_3787* für die homologe Rekombination. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid der Promotor des Gens *bvu_2499* (p2499). Dieser initiiert die Transkription des *sacB*-Gens, welches als Gegenselektionsmarker dient. Die Ampicillin-Resistenzkassette (*AmpR*) dient der Selektion von *E. coli* und die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermG*) der Selektion von *Bacteroides*-Spezies. *OriT* = *Origin of transfer*; *Ori* = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der korrekten Assemblierung der up- und downstream-Region von *bvu_3787* in pMM656_Δ3787. Die verwendeten Primerpaare scrpmm656_up_fw/down_rev binden jeweils in dem Plasmidrückgrat und flankieren die up-down Sequenz. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Hierfür wurde wie zuvor das Plasmidrückgrat von pMM656_sacB mit 1000 bp der *up*- und *downstream* flankierenden Region von *bvu_3787* assembliert. Die Amplifizierung der *up*- und *downstream*-Region erfolgte mit Hilfe der Primer up_3787_fw/rev sowie down_3787_fw/rev (Tab. 7). Die Durchführung der Deletion erfolgte, wie in Kapitel 2.4.13 beschrieben. Über eine Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer scr-pmm656_up_fw und scr-pmm656_down_rev welche jeweils im Plasmidrückgrat banden und die eingefügte Gensequenz der *up*- und *downstream*-Region flankieren, wurde in *E. coli* β 2155 erwartungsgemäß ein Fragment von 2490 bp amplifiziert (Abb. 11 B). Zusätzlich wurde dieses Fragment sequenziert und somit die korrekte Klonierung des Vektors pMM656_Δ3787 bestätigt.

Daraufhin erfolgte der Transfer des Plasmids über Konjugation vom Donor-Stamm *E. coli* β 2155 in *P. vulgatus* 3xKO. Mittels Kolonie-PCR wurde schließlich untersucht, ob eine erste homologe Rekombination stattgefunden hat. Die verwendeten Primer pMM656sacB seq_fw/rev (Tab. 7) ergaben ein 1965 bp großes Fragment (Abb. 12 A) womit die erste homologe Rekombination nachgewiesen wurde.

Als nächstes wurde die zweite homologe Rekombination initiiert und anschließend die auf den Saccharose-haltigen Platten gewachsenen Kolonie mittels PCR analysiert. Dabei dienten die Primerpaare pMM656sacB seq_fw/rev und seq_Δ3787_fw/rev (Tab. 7) dem Nachweis von *sacB* beziehungsweise dem Nachweis der Deletion. Letztere banden in der *up*- und *downstream* Region von *bvu_3787*.

Nach einer Deletion von *bvu_3787* wäre ein Fragment von 2193 bp zu erwarten gewesen. Die Nutzung der Sequenzierungsprimer ergaben jedoch unerwarteterweise ein Fragment von 5739 bp (Abb. 12 B, Spur 1), obwohl die zweite homologe Rekombination aufgrund des fehlenden Fragmentes für *sacB* (Spur 2) nachweislich stattgefunden hatte. Dementsprechend handelte es sich hierbei um eine Wild-Typ-Revertante. Da es sich bei allen Klonen nach der zweiten homologen Rekombination um Revertanten handelte, war anzunehmen, dass die Deletion von *bvu_3787* einen letalen Effekt hatte. Möglicherweise ist dies darauf zurückzuführen, dass durch das Fehlen der PFOR die Bildung von Acetyl-CoA nicht mehr gegeben ist.

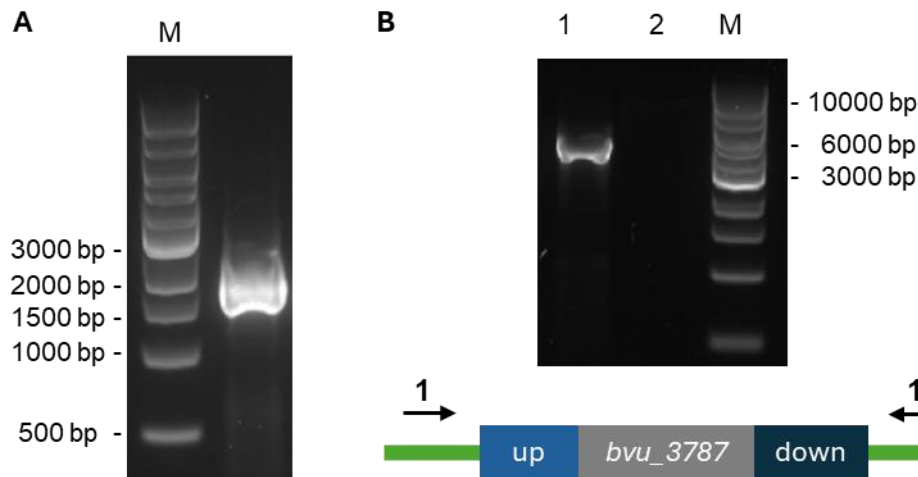


Abbildung 12: Nachweis der ersten (A) und zweiten (B) homologen Rekombination von pMM656_Δ3787 in *P. vulgatus* 3xKO. (A) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Integration von pMM656_Δ3787 in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO. Die verwendeten Primer pMM656sacB seq_fw/rev binden im Plasmidrückgrat und flankieren die für *sacB* kodierende Sequenz. (D) Kolonie-PCR zur Untersuchung der zweiten homologen Rekombinante. Die Primer seq_Δ3787_fw/rev binden stromauf- und abwärts der *up*- bzw. *downstream*-Region im Genom von *P. vulgatus* (Spur 1) und die Primer pMM656sacB seq_fw/rev binden im Plasmidrückgrat und flankieren die für *sacB* kodierende Sequenz (Spur 2). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Als zentrales Molekül im Stoffwechsel ist Acetyl-CoA unter anderem wichtig für die Generierung von ATP durch Substratkettenphosphorylierung (Schütze *et al.*, 2020), für die Bildung von Aminosäuren (Zhu *et al.*, 2022) sowie in der Fettsäurebiosynthese (Fujita *et al.*, 2007). Da in der vorliegenden Arbeit keine Deletion von *bvu_3787* möglich war, wurde angenommen, dass in *P. vulgatus* kein Enzym vorliegt, was die Acetyl-CoA Synthese an dieser Stelle übernehmen könnte und somit das Fehlen dieses essenziellen Zwischenproduktes eine letale Wirkung auf den Organismus hatte.

3.1.2.2 Deletionsversuch der Phospho-transacetylase (BVU_0523) und der Acetatkinase (BVU_0524)

Um das Problem der fehlenden Acetyl-CoA Synthese zu umgehen, wurden die Phospho-trans-Acetylase (PTA) und die Acetatkinase (ACK) für eine mögliche Deletion ausgewählt. Diese beiden Enzyme kommen erst nach der Bildung von Acetyl-CoA zum Einsatz und wandeln dieses erst in Acetyl-Phosphat und dann in Acetat um. Da sich die für die PTA und ACK kodierenden

Gene *bvu_0523* und *bvu_0524* innerhalb eines Operons befinden, bot es sich hier an das ganze Operon zu deletieren. Die Durchführung erfolgte analog zu den vorherigen Deletionen. Um die homologe Rekombination zu bewerkstelligen und eine Deletion des gesamten Operons zu erlauben wurden 1000 bp der *upstream*-Region von *bvu_0523* und 1000 bp der *downstream*-Region von *bvu_0524* auf das Plasmidrückgrat von pMM656_ *sacB* kloniert (Abb. 13 A).

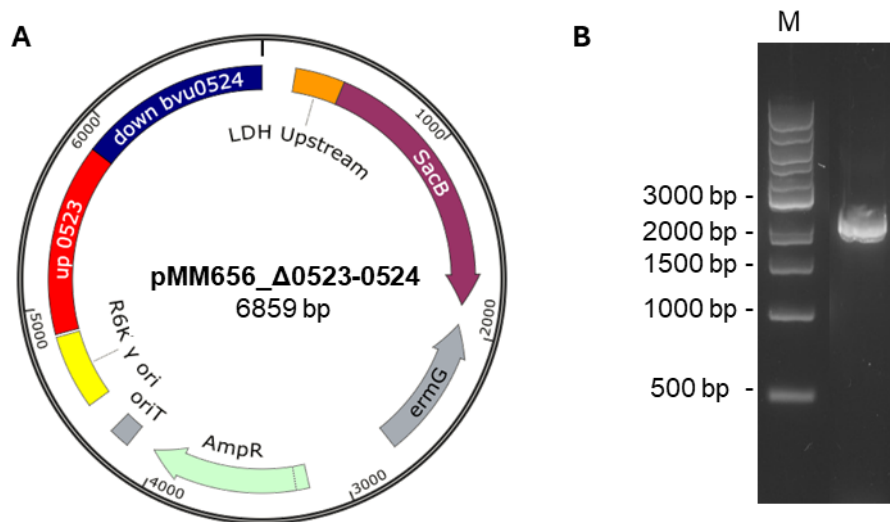


Abbildung 13: Konstruktion des Vektors pMM656_Δ0523-0524. (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_Δ0523-0524 zur Deletion der Gene *bvu_0523* und *bvu_0524* in *P. vulgatus* 3xKO. Auf dem Plasmid befinden sich 1000 bp der *upstream*-Region von *bvu_0523* sowie 1000 bp der *downstream*-Region von *bvu_0524* für die homologe Rekombination. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid der Promotor des Gens *bvu_2499* (p2499). Dieser initiiert die Transkription des *sacB*-Gens, welches als Gegenselektionsmarker dient. Die Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR) dient der Selektion von *E. coli* und die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermG*) der Selektion von *Bacteroides*-Spezies. OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der korrekten Assemblierung der *up*- und *downstream*-Region von *bvu_0523-0524* in pMM656_ *sacB*. Die verwendeten Primerpaare scr-pmm656_up_fw und scr-pmm656_down_rev binden jeweils in dem Plasmidrückgrat und flankieren die *up-down* Sequenz. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Zur Amplifikation der beiden Inserts wurden die Primerpaare *bvu_0523_up_fw/rev* und *bvu_0524_down_fw/rev* (Tab. 7) verwendet. Nach der Assemblierung wurde das erstellte Konstrukt pMM656_Δ0523-0524 (Abb. 13 A) mittels Elektroporation in *E. coli* β2155 transformiert und mit Hilfe einer Kolonie-PCR und Sequenzierung geprüft. Dies erfolgte unter Verwendung der Primer scr-pmm656_up_fw und scr-pmm656_down_rev (Tab. 7).

Erwartungsgemäß konnte ein Fragment mit einer Größe von 2490 bp nachgewiesen werden (Abb. 13 B). Wie zuvor erfolgte anschließend der Transfer des Plasmids über Konjugation in *P. vulgatus* 3xKO.

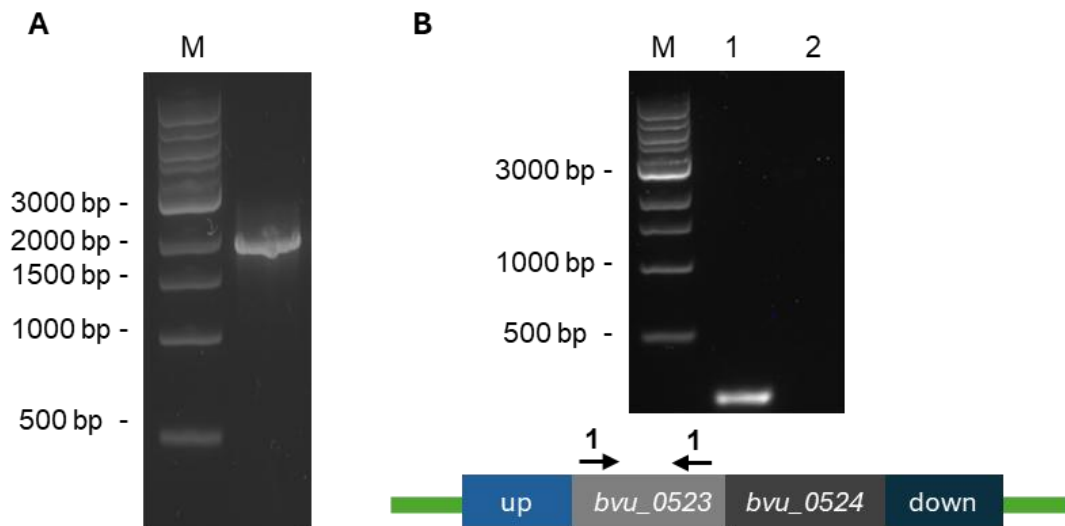


Abbildung 14: Nachweis der ersten (A) und zweiten (B) homologen Rekombination von pMM656_Δ0523-0524 in *P. vulgatus* 3xKO. (A) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Integration von pMM656_Δ3787 in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO. Die verwendeten Primer pMM656sacB seq_fw/rev binden im Plasmidrückgrat und flankieren die für *sacB* kodierende Sequenz. (B) Kolonie-PCR zur Untersuchung der zweiten homologen Rekombinanten. Die Primer qPCR_0523_fw/rev binden innerhalb der Nukleotidsequenz von *bvu_0523* (Spur 1) und die Primer pMM656sacB seq_rev binden im Plasmidrückgrat und flankieren die für *sacB* kodierende Sequenz (Spur 2). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Die Integration des Plasmids in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO nach der ersten homologen Rekombination konnte durch die Amplifikation von *sacB* (1965 bp) (Abb. 14 A) bestätigt werden. Nach der Initialisierung der zweiten homologen Rekombination ergab die PCR mit den Primern qPCR_0523_fw/rev (Tab. 7) unerwarteterweise ein Fragment einer Größe von 235 bp (Abb. 14 B, Spur 1). Dieses Ergebnis bestätigte, dass die Zielgene noch im Organismus vorhanden waren, obwohl die zweite homologe Rekombination stattgefunden hatte und das Plasmid aus dem Genom von *P. vulgatus* 3xKO entfernt worden war (Abb. 14 B, Spur 2). Folglich entstanden während der zweiten homologen Rekombination, wie bei der vorherigen Deletion von *bvu_3787*, nur Wildtyp-Revertanten.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.2, dass die Deletion der Gene *bvu_3787* und *bvu_0523-0524* im fermentativen Ast des Stoffwechselweges von *P. vulgatus* 3xKO nicht möglich war. Während der zweiten homologen Rekombination wurden jeweils nur Wildtyp-Revertanten gebildet. Dies deutete darauf hin, dass die Acetat-Produktion in *P. vulgatus* eine zentrale Rolle spielt und das Ausschalten des fermentativen Astes letale Folgen hat. Während Acetyl-CoA eine zentrale Rolle als Schlüsselmolekül für die Aminosäure- und Fettsäure-Synthese spielt (Fujita *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2022) scheint auch die Bildung von Acetat unverzichtbar zu sein. Möglicherweise ist dies auf die notwendige Energiegewinnung durch Substratkettenphosphorylierung während der Umsetzung von Acetyl-CoA zu Acetat zurückzuführen (Schütze *et al.*, 2020). In dem vorherigen Kapitel 3.1.1 wurde das Gen *bvu_0876* deletiert, jedoch ohne Auswirkung auf die Acetat-Synthese. Somit konnte die Synthese von Acetat als verbleibendem Nebenprodukt von Succinat in *P. vulgatus* 3xKo nicht eliminiert werden.

3.1.3 Regulation der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787)

Da das Ausschalten der Acetat-Synthese in dieser Arbeit nicht erfolgreich war, wurde im Folgenden versucht die Acetat-Produktion zu regulieren. Ziel war es diese auf ein Minimum zu reduzieren. Die Acetyl-CoA und Acetat-Produktion sollte für die Aufrechterhaltung aller Stoffwechselwege ausreichen, die Freisetzung von Acetat im Vergleich zu Succinat allerdings vernachlässigbar sein. Für die Regulation wurde das für die PFOR kodierende Gen *bvu_3787* ausgewählt. Dabei sollte die Transkription des Gens über einen Rhamnose induzierbaren Promotor reguliert werden. Hierfür wurde das System von Mimee *et al.* (2015) verwendet. Dieses System basiert auf dem Integrationsplasmid pMM656 und wurde erstmals in *B. thetaiotaomicron* angewendet (Mimee *et al.*, 2015). Auf dem Plasmid befindet sich das Reporter-Gen *nanoluc* welches als Luciferase-Reportersystem verwendet werden kann. Kontrolliert wird die Expression der Nanoluc-Luciferase über die aus *B. thetaiotaomicron* stammenden Promotor-RBS-Region ($P_{RhaKIPAO}$) des Rhamnulose-Kinase-Gens (*bt_3763*) (Mimee *et al.*, 2015). Der Integrationsvektor kodiert ein R6K-OriV und ein RP4-OriT welche eine Vervielfältigung des Plasmids in *E. coli* (Donorstamm) sowie den konjugativen Transfer in einen Akzeptorstamm (*P. vulgatus*) erlauben. Allerdings besitzt das Plasmid keinen OriV, der

von Spezies der Bacteroidota erkannt wird. Somit handelt es sich bei pMM656 um einen *suicide*-Vektor, welcher in *Bacteroides*-Spezies nicht repliziert werden kann und unter Selektionsdruck in das Genom eingebaut werden muss. Die Integration des Vektors in das bakterielle Genom erfolgt über eine sequenzspezifische Rekombination zwischen der auf dem Plasmid befindlichen *attN2-site* und einer korrespondierenden genomischen *attN-site* (Wang *et al.*, 2000). Diese befinden sich in *P. vulgatus* jeweils am 3'-Ende der beiden für die tRNA^{Ser} kodierenden Gene *bvu_2451* und *bvu_2094* (Lück & Deppenmeier, 2022). Die entsprechende Rekombination und somit Integration wird über eine auf dem Plasmid kodierte Integrase (IntN2; NBU2 Integrase) gewährleistet.

Eine vorherige Studie zeigte, dass dieses Konstrukt auch in *P. vulgatus* anwendbar ist. Die Expression der Nanoluc-Luciferase konnte über verschiedene Rhamnose-Konzentrationen beeinflusst werden und diente somit als Reportersystem zum Nachweis der Regulation des Promotors (Lück & Deppenmeier, 2022).

In der vorliegenden Arbeit sollte durch den Austausch des *nanoluc*-Gens mit *bvu_3787* die Expression des PFOR-Gens über das pMM656 System und die Rhamnose-Konzentration reguliert werden. Die Generierung dieses Stammes benötigte mehrere Schritte, die zur Veranschaulichung in Abbildung 15 schematisch dargestellt sind.

Schritt 1 zeigt den Ursprungszustand im Genom von *P. vulgatus* 3xKO mit der für die PFOR kodierenden Sequenz *bvu_3787* und deren *up*- und *downstream*-Region. Über die *attN* Site sollte der Integrationsvektor pMM656_RP_*bvu_3787*, mit Hilfe der darauf kodierten NBU2 Integrase, in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO integrieren (Abb. 15, 2). Auf dem Vektor kodiert sind das für die PFOR kodierende Gen *bvu_3787* unter Regulation des Rhamnose-induzierbaren-Promotors (RP). Nach dem Einbauen des Plasmids in das Genom sollte *bvu_3787* in doppelter Ausgabe vorliegen; einmal als genomisches Original und stromabwärts vom Rhamnose-Promotor als Teil von pMM656_RP_*bvu_3787* (Abb. 15, 3).

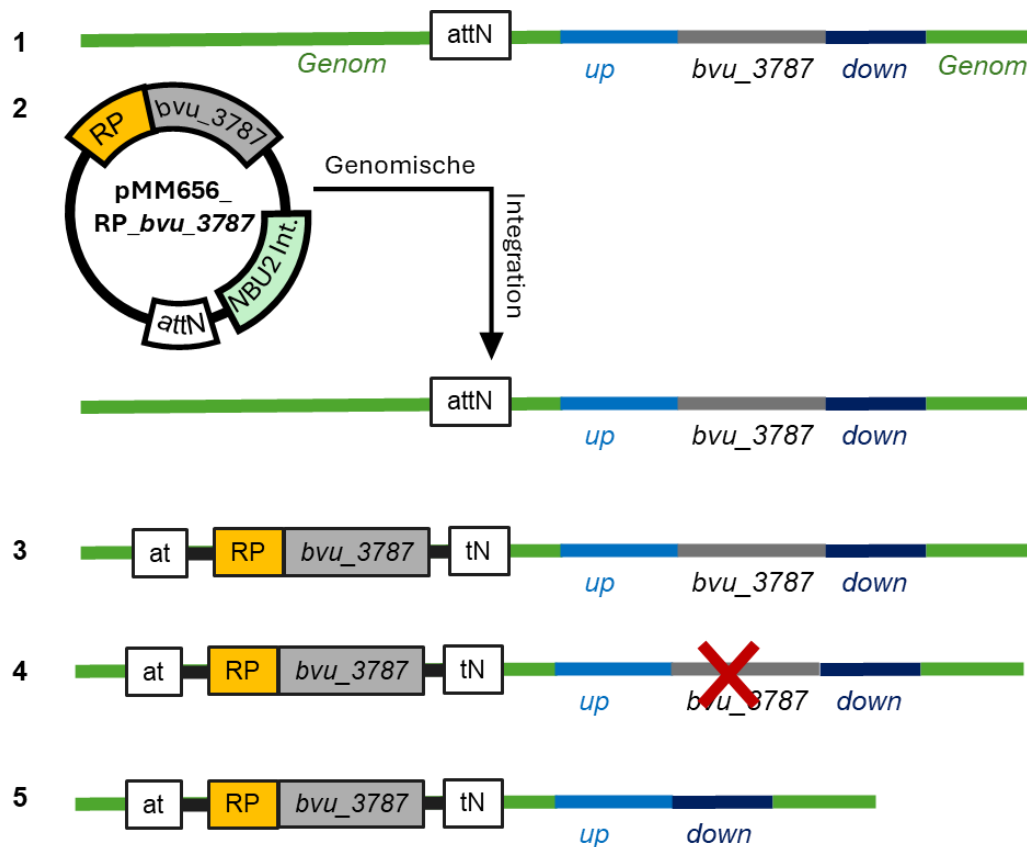


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Entwicklung eines *P. vulgatus* Stammes mit regulierbarer PFOR. (1) Grundzustand des Genoms von *P. vulgatus* 3xKO. (2) Einbringen des regulierbaren Gens *bvu_3787* über das Integrations-Plasmid pMM656_RP_bvu_3787 und der darauf kodierten NBU2 Integrase. (3) Zustand des Genoms nach Integration des Plasmids in der *attN*-site. Das für die PFOR kodierende Gen *bvu_3787* liegt in doppelter Ausgabe vor. (4) Deletion der genomischen Kopie von *bvu_3787*. (5) Endzustand des erstellten Stammes. Die Gensequenz *bvu_3787* liegt nur noch nachgeschaltet an den Rhamnosepromotor vor. RP=Rhamnose-Promotor, NBU2 Int. = NBU2 Integrase.

Nachdem zusätzlich eine regulierbare, Plasmid-vermittelte, Kopie von *bvu_3787* in der genomischen DNA vorlag (Abb. 15, 3), sollte in einem nächsten Schritt, die Ursprungssequenz aus dem Genom deletiert werden (Abb. 15, 4). Am Ende sollte wie in Abbildung 15, Schritt 5 dargestellt nur noch die durch den induzierbaren RP regulierte Kopie von *bvu_3787* vorliegen. In den folgenden Kapiteln wird die Generierung dieses Stammes näher erläutert.

3.1.3.1 Deletion der Gene des Rhamnose-Operon (*bvu_0595-0597*)

Wie oben beschrieben, sollte die Expression von *bvu_3787* im Folgenden über das pMM656 System und den Rhamnose-induzierbaren Promotor reguliert werden. Allerdings musste beachtet werden, dass *P. vulgatus* in der Lage ist, den Einfachzucker Rhamnose, welcher als

Induktor des Promotors dienen sollte, zu verstoffwechseln. Die Nutzung von Rhamnose als Wachstumssubstrat durch *P. vulgatus* könnte somit zu einer Beeinträchtigung der Induktion des Promotors führen. Um dennoch eine möglichst präzise Regulation zu ermöglichen, sollte daher in einem ersten Schritt die Verstoffwechslung von Rhamnose durch *P. vulgatus* unterbunden werden.

In *P. vulgatus* sind drei verschiedene Enzyme an der Verstoffwechslung von Rhamnose beteiligt. Der L-Rhamnose-H⁺-Symporter (RS, BVU_0597) dient der Aufnahme des Zuckers welcher anschließend durch die L-Rhamnose-Isomerase (RI, BVU_0596) zu Rhamnulose umgewandelt wird. Letztere wird dann durch die Rhamnulokinase (RK, BVU_0595) zu L-Rhamnulose-1-Phosphat weiter verstoffwechselt. Alle für die genannten drei Enzyme kodierende Nukleotidsequenzen liegen in *P. vulgatus* innerhalb eines Operons vor. Um die Verwertung von Rhamnose durch den Organismus zu verhindern, sollte das komplette Operon deletiert werden. Hierfür wurde das Konstrukt pMM656_Δ0595-0597 (Abb. 16 A) erstellt. Existiert zusätzlich zu der spezifischen Rhamnose-Aufnahme über BVU_0597 kein unspezifischer Weg, könnte die Deletion des für das RS kodierende Gen *bvu_0597* dazu führen, dass Rhamnose nicht nur zur Verstoffwechslung, sondern auch zur Induktion des Promotors nicht mehr zur Verfügung steht. Um dieses Problem zu umgehen und die Rolle des RS in *P. vulgatus* näher zu analysieren, sollte zusätzlich ein Stamm generiert werden, in welchem nur die für die RK und RI kodierenden Gene *bvu_0595* und *bvu_0596* deletiert sind, die RS allerdings normal exprimiert wird. Zur Generierung eines solchen Stammes wurde das Plasmid pMM656_Δ0595-0596 (Abb. 16 B) erstellt.

Zur Deletion der beiden Gene *bvu_0595* und *bvu_0596* wurden die 1000 bp der *upstream*-Region von *bvu_0595* und 1000 bp der *downstream*-Region von *bvu_0596* auf das Konstrukt kloniert. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden unter Verwendung der Primerpaare Operon_up_fw/rev und 0595/0596_down_fw/rev aus dem Genom von *P. vulgatus* amplifiziert.

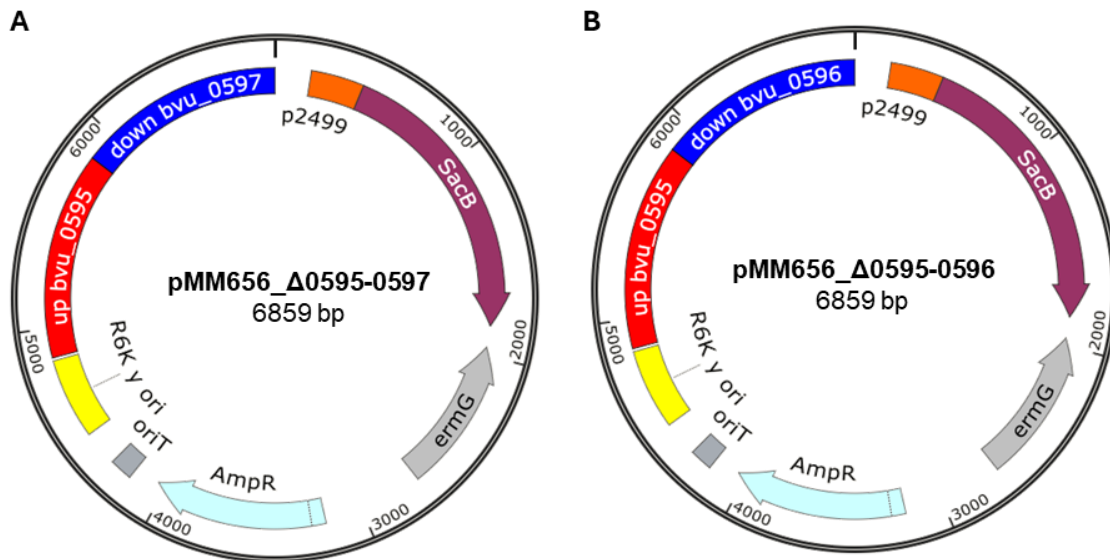


Abbildung 16: Plasmidkarten der erstellten Konstrukte pMM656_Δ0595-0597 (A) und pMM656_Δ0595-0596 (B). (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_Δ0595-0597 zur Deletion des kompletten Rhamnose-Operons (*bvu_0595*, *bvu_0596* und *bvu_0597*) in *P. vulgatus* 3xKO. Auf dem Plasmid befinden sich die 1000 bp lange *upstream*-Region von *bvu_0595* sowie die 1000 bp *downstream*-Region von *bvu_0597* für die homologe Rekombination. (B) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_Δ0595-0596 zur Deletion der Gene *bvu_0595* und *bvu_0596* in *P. vulgatus* 3xKO. Auf dem Plasmid befinden sich die 1000 bp lange *upstream*-Region von *bvu_0595* sowie die 1000 bp *downstream*-Region von *bvu_0596* für die homologe Rekombination. Außerdem befinden sich auf den Vektoren jeweils der Promotor des Gens *bvu_2499* (p2499). Dieser initiiert die Transkription des *sacB*-Gens, welches als Gegenselektionsmarker dient. Die Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR) dient der Selektion von *E. coli* und die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermG*) der Selektion von *Bacteroides*-Spezies. OriT = Origin of transfer; Ori = Origin of replication für *E. coli*.

Zur Deletion des kompletten Rhamnose-Operons, wurden ebenfalls die 1000 bp der *upstream*-Region von *bvu_0595* mit Hilfe der Primer Operon_up_fw/rev vervielfältigt. Als *downstream*-Region wurden hier 1000 bp stromabwärts von *bvu_0597* gewählt. Diese Sequenz wurde mit Hilfe der Primer Operon_down_fw/rev amplifiziert. Beide Konstrukte wurden mittels DNA Assembly Mastermix von NEB® assembliert. Die anschließende Transformation in *E. coli* β2155 erfolgte über Elektroporation und die Überprüfung der Korrekten Assemblierung mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung. Anschließend erfolgte der Transfer in *P. vulgatus* 3xKO jeweils über Konjugation mit *E. coli* β2155 als Donor-Stamm. Nach der Durchführung der zweiten homologen Rekombination wurde mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung die Deletion der jeweiligen Gensequenzen überprüft (Abb. 17).

3. Ergebnisse

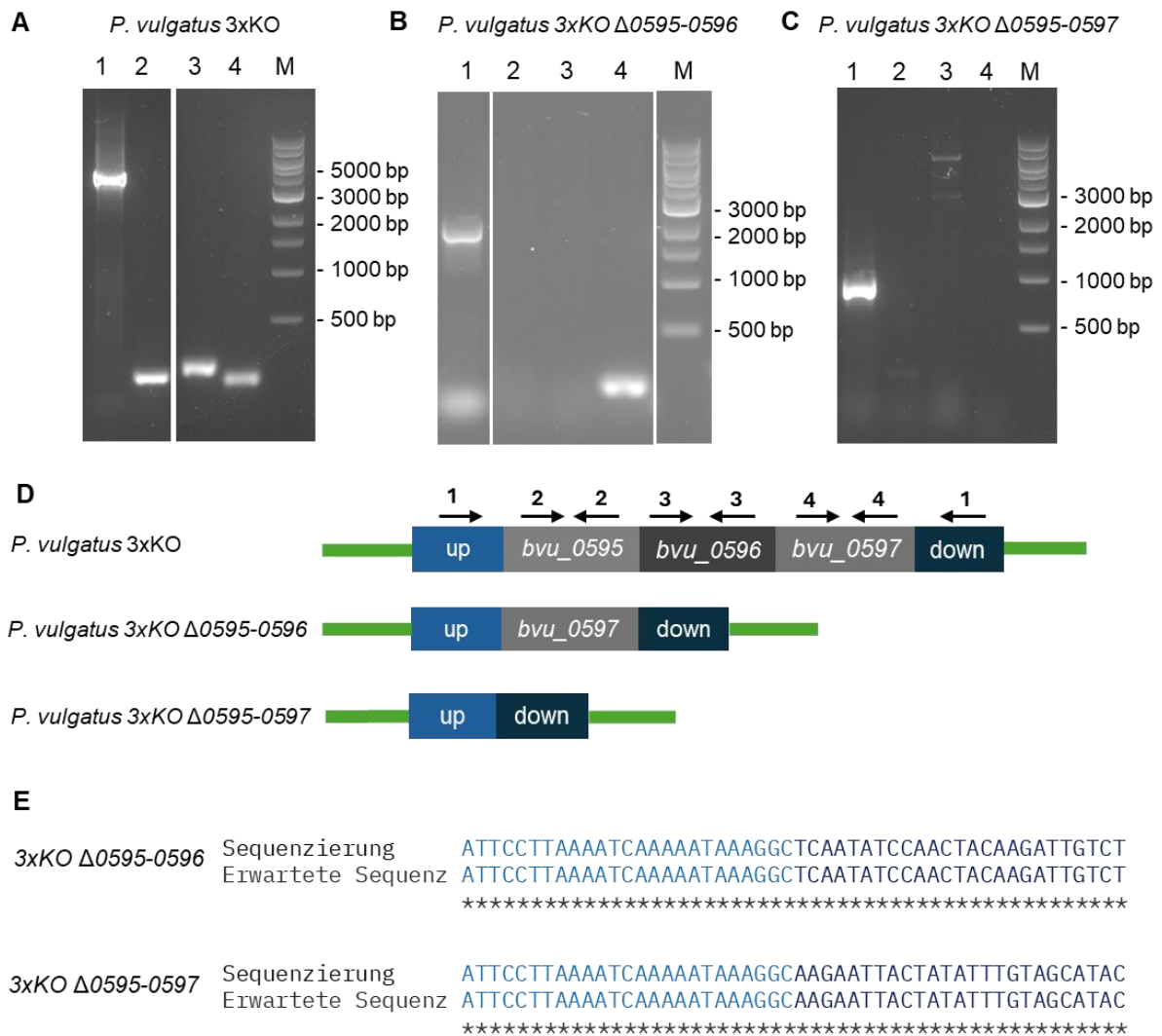


Abbildung 17: Kolonie-PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Generierung von *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 und *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597. (A) - (C) Agarosegel zum Nachweis des Rhamnose-Operons (Spur 1) sowie der einzelnen Gensequenzen *bvu_0595* (Spur 2), *bvu_0596* (Spur 3) und *bvu_0597* (Spur 4) in *P. vulgatus* 3xKO (A), *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 (B) und *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597 (C). Die Primer qPCR_0595_fw/rev (2), qPCR_0596_fw/rev (3) und qPCR_0597_fw/rev (4) binden innerhalb der kodierenden Sequenz der jeweiligen Gene. Die Primer scr_delta_Operon_fw/rev (1) binden jeweils in der *upstream*-Region von *bvu_0595* und der *downstream*-Region von *bvu_0597* und flankieren somit vollständig das Rhamnose-Operon. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (D) Schematische Darstellung der chromosomalen DNA in *P. vulgatus* 3xKO, *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 und *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597 sowie der Bindungsbereiche der Primer. (E) Sequenzierung des Deletionsbereiches zur Bestätigung der Deletion der Gene *bvu_0595* und *bvu_0596* in der chromosomalen DNA von *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 sowie der Gene *bvu_0595*, *bvu_0596* und *bvu_0597* in der chromosomalen DNA von *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597.

Das Vorhandensein der einzelnen Gene wurde mit Hilfe der Primer qPCR_0595_fw/rev, qPCR_0596_fw/rev und qPCR_0597_fw/rev, welche jeweils innerhalb der kodierenden Sequenzen von *bvu_0595* (Spur 2), *bvu_0596* (Spur 3) und *bvu_0597* (Spur 4) binden, geprüft

(Abb. 17). Im Gegensatz zu *P. vulgatus* 3xKO, welcher alle drei Fragmente mit 214 bp (Abb. 17, A, Spur 2), 238 bp (Abb. 17, A, Spur 3) beziehungsweise 170 bp (Abb. 17, A, Spur 4) aufwies, konnte nach Initialisierung der zweiten homologen Rekombination mit dem Plasmid pmm656_Δ0595-0596 nur noch ein Fragment für das Gen *bvu_0597* nachgewiesen werden (Abb. 17 B). Über eine zusätzliche PCR mit den Primern scr_delta_Operon_fw/rev (1) wurde in *P. vulgatus* 3xKO ein 4919 bp großes Fragment amplifiziert (Abb. 17 A, Spur 1). Die gleichen Primer bildeten in dem ersten Konstrukt nur ein Fragment mit einer Größe von 2186 (Abb. 17 B, Spur 1). Somit wurde die Deletion der Gene *bvu_0595* (1479 bp) und *bvu_0596* (1254 bp) ein zweites Mal bestätigt. Die anschließende Sequenzierung unter Verwendung der Primer scr_delta_Operon_fw/rev (1) bestätigte die markerlose Deletion und somit die Generierung des Stammes *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 (Abb. 17 E). Auch nach der zweiten homologen Rekombination des Genoms mit dem Vektor pMM656_Δ0595-0597 war das durch die Primer scr_delta_Operon_fw/rev amplifizierte Fragment mit 1166 bp (Abb. 17 C) deutlich kleiner im Vergleich zum Ausgangsstamm (Abb. 17 A) und auch kleiner als in *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 (Abb. 17 B). Zusätzlich konnte in diesem Stamm auch *bvu_0597* nicht mehr nachgewiesen werden. Die anschließende Sequenzierung (Abb. 17 E) bestätigte auch hier die Generierung des Stammes *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597.

Zur Untersuchung der phänotypische Auswirkung der vorgenommenen Deletionen, wurden das Wachstumsverhalten von *P. vulgatus* 3xKO (Abb. 18 A), *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 (Abb. 18 B) und *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597 (Abb. 18 C) auf minimal Medium mit Glucose und Rhamnose als Substrat verglichen.

Die Durchführung erfolgte in einer 48-Well Platte unter anaeroben Bedingungen bei 37°C. Mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) wurde alle 20 min die Optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Den Erwartungen entsprechend, nutzte der Ausgangsstamm *P. vulgatus* 3xKO sowohl Glukose als auch Rhamnose als Substrat (Abbildung 18 A) und erreichte eine End-OD von 0,69 auf Glucose und 0,5 auf Rhamnose. *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 erreichte mit Glucose als Substrat eine vergleichbare OD von 0,77. Mit Rhamnose als Substrat konnte allerdings kein Wachstum festgestellt werden (Abb. 18 B). Auch für *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597 konnte kein Wachstum auf Rhamnose gemessen werden. Auf Glucose erreichte der Stamm eine maximale OD von 0,52 (Abb. 18 C).

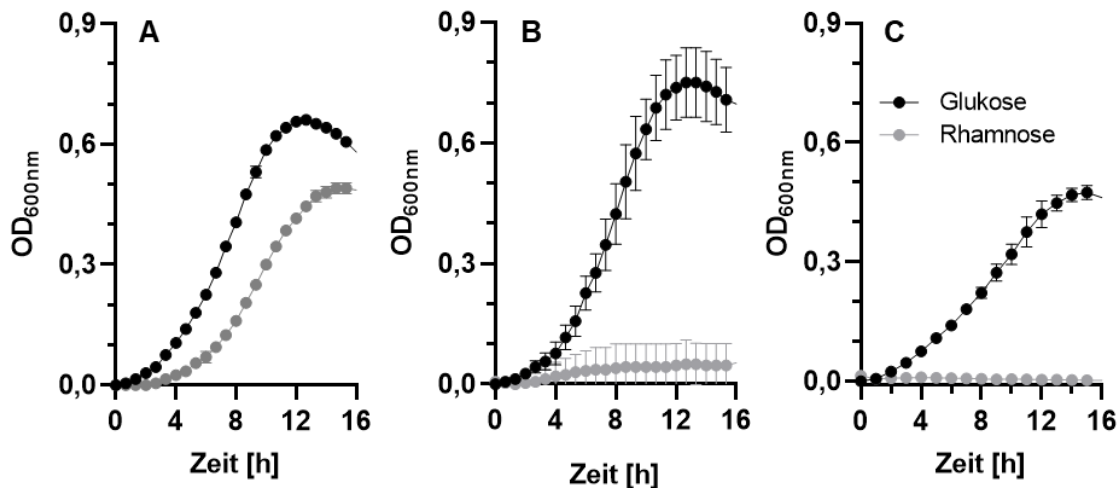


Abbildung 18: Wachstum von *P. vulgatus* 3xKO (A), *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ (B) und *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0597$ (C) mit Glucose und Rhamnose als Substrat. Die drei Stämme wurden auf Minimalmedium DMM mit 10 mM Glucose (●) und 10 mM Rhamnose (◐) in einer 48-Well Platte bei 37°C und unter anaeroben Bedingungen inkubiert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) alle 20 min bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600nm}) gemessen. Die OD_{600nm} wurde gegen die Zeit aufgetragen. Die Wachstumsexperimente erfolgten in biologischen Triplikaten. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Nachdem die Stämme *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ und *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0597$ generiert wurden, welche Rhamnose nicht mehr als Wachstumssubstrat nutzen konnten, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob dies tatsächlich eine präzisere Regulation ermöglichte. Hierfür wurde erneut das oben beschriebene Plasmidsystem pMM656 (Mimee *et al.*, 2015) genutzt. Zur Selektion von *E. coli* Spezies dient die plasmidkodierte Ampicillin-Resistenzkassette (AmpR). Zusätzlich befindet sich auf dem Plasmid von Mimee *et al.* (2015) eine Erytromycin-Resistenzkassette zur Selektion von *Bacteroides* Spezies. Da die gleiche Resistenzkassette allerdings schon im Deletionsvektor pMM656_*sacB* vorliegt, und im späteren experimentellen Verlauf beide Plasmide zeitgleich in *P. vulgatus* angewandt werden mussten, war ein Austausch der Resistenzkassette notwendig. Für den Austausch wurde die auf dem Plasmid pG108 kodierte, aus *B. thetaiotaomicron* stammende Tetracyclin-Resistenzkassette (TetQ) (Jones *et al.* 2020) gewählt und somit das Konstrukt pMM656_TetQ_*nanoluc* erstellt (Abb.19 A).

Zur Klonierung des Vektors pMM656_TetQ_*nanoluc* wurde das Plasmidrückgrat von pMM656 mit Hilfe der Primer pMM656bb_fwd und pMM656bb_rev amplifiziert. Die TetQ-Kassette

wurde über die Primer TetQ_pMM656_fw/rev mit dem Plasmid pG108 als *template* vervielfältigt. Die Assemblierung erfolgte unter Anwendung des NEB® DNA Assembly Mastermixes und die anschließende Transformation des Konstruktes in *E. coli* β 2155 erfolgte mittels Elektroporation. Über eine anschließende Kolonie-PCR wurde die korrekte Assemblierung der Fragmente geprüft (Abb. 19 B). Die *screening* Primer Scr_pMM656_TetQ_fw/rev banden hierbei im Rückgrat von pMM656 und flankieren die für TetQ kodierende Gensequenz. Die PCR ergab ein 2174 bp langes Fragment (Abb. 19 B) womit der Einbau der Austausch der Resistenzkassette und die Generierung von pMM656_TetQ_nanoluc bestätigt waren.

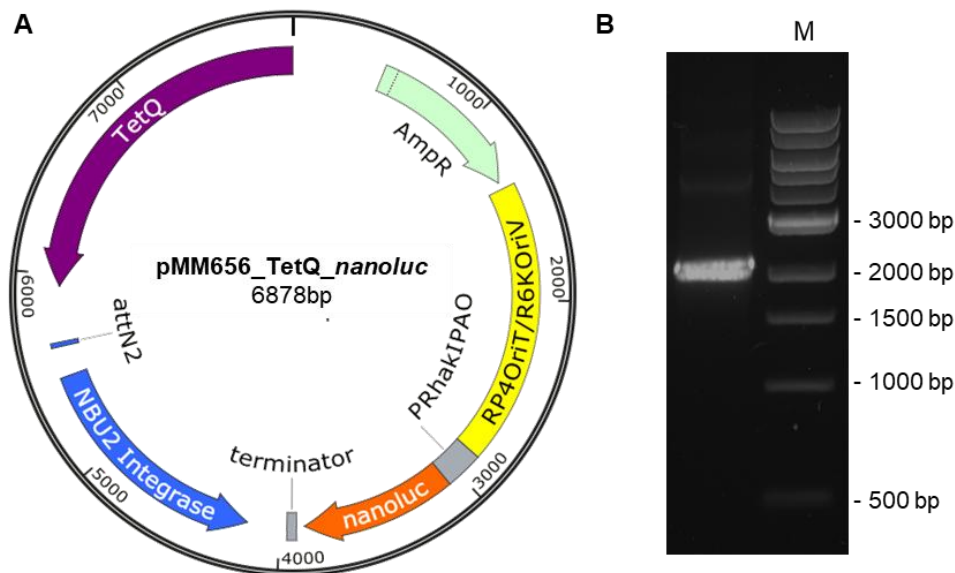


Abbildung 19: Konstruktion des Vektors pMM656_TetQ_nanoluc (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_TetQ_nanoluc. Die auf dem Plasmid kodierte nanoluc-Sequenz kodiert eine Nanoluc-Luciferase, welche als Reporter-System genutzt werden kann. Diese steht unter der Kontrolle des stromaufwärts liegenden Rhamnose induzierbaren Promotors ($P_{RhaKIPAO}$). Das Plasmid kodiert zusätzlich eine NBU2 Integrase, welche die sequenzspezifische Rekombination zwischen der auf dem Vektor kodierten attN2-site und einer am 3'-Ende eines der für tRNA^{Ser} kodierenden Gene im Genom liegenden attN-site katalysiert. R6KOriV = *origin of replication*; RP4OriT = *origin of transfer*; AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette; TetQ = Tetrazyklin-Resistenzkassette. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der korrekten Assemblierung der TetQ-Resistenzkassette in das Rückgrat von pMM656. Das verwendete Primerpaar Scr_pMM656_TetQ_fw/rev bindet in dem Plasmidrückgrat und flankiert die Gensequenz von *tetQ*. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Nun erfolgte der über biparentale Konjugation vermittelte Transfer des Integrationsvektors in die Stämme *P. vulgaris* 3xKO, *P. vulgaris* 3xKO Δ 0595-0596 und *P. vulgaris* 3xKO Δ 0595-0597. Die mittels Tetrazyklin selektierten Klone wurden dann mit Hilfe einer Kolonie PCR auf die

Integration von pMM656_TetQ_nanoluc untersucht (Abb. 20). Unter Anwendung der in pMM656_TetQ bindenden und die nanoluc-Sequenzen flankierenden Primer screen_pmm656_fw/rev konnte in allen drei Stämmen erwartungsgemäß ein Fragment von 870 bp amplifiziert werden (Abb. 20, Spur 5)). Die Primer Bac_16S_2_for/rev dienen zum Nachweis der Bacteroides-Spezies. Zusätzlich wurden die Primerpaare qPCR_0595_fw/rev, qPCR_0596_fw/rev und qPCR_0597_fw/rev genutzt, um die Integration von pMM656_TetQ in den jeweiligen Stämmen *P. vulgatus* 3xKO (Abb. 20 A), *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0596 (Abb. 20 B) und *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0597 (Abb. 20 C) nachzuweisen. Die Ergebnisse der Kolonie-PCR bestätigten die Generierung der Stämme *P. vulgatus* 3xKO_pMM656_TetQ_nanoluc, *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0596_pMM656_TetQ_nanoluc und *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0597_pMM656_TetQ_nanoluc. Zur Vereinfachung werden dies Stämme im Folgenden als 3xKO_nanoluc, 3xKO Δ 0595-0596_nanoluc und 3xKO Δ 0595-0597_nanoluc bezeichnet.

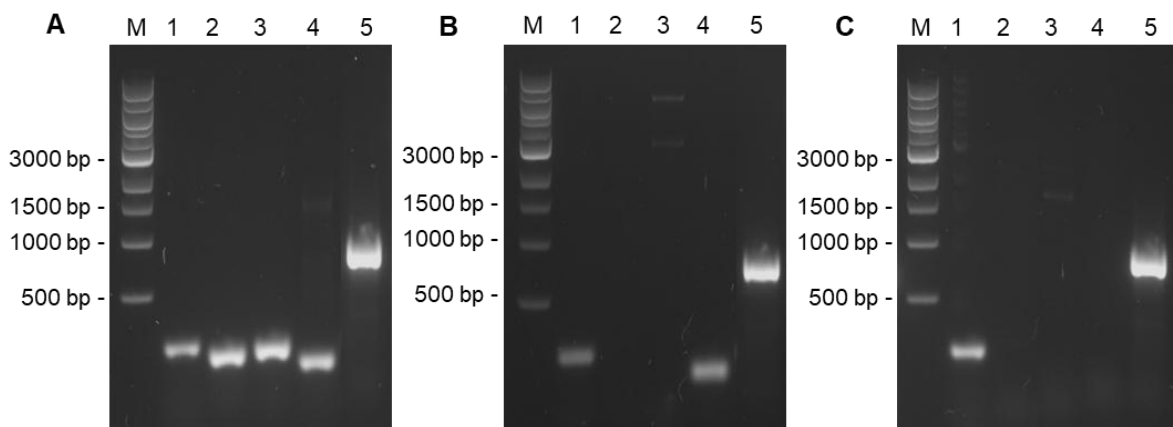


Abbildung 20: Nachweis der Integration von pMM656_TetQ_nanoluc in *P. vulgatus* 3xKO (A), *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0596 (B) und *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0597 (C). Agarosegele nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Integration von pMM656_TetQ_nanoluc in die verschiedenen Stämme *P. vulgatus* 3xKO (A), *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0596 (B) und *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0597 (C). Die verwendeten Primer Bac_16S_fe/rev (Spur 1) dienen dem Nachweis der Gattung *Bacteroides*. Die Primer qPCR_0595_fw/rev (Spur 2), qPCR_0596_fw/rev (Spur 3) und qPCR_0597_fw (Spur 4) und rev binden jeweils innerhalb der entsprechenden Gensequenz und dienen zum Nachweis der Deletionsstämme. Die Primer screen_pmm656_fw/rev (Spur 5) binden im Plasmidrückgrat und flankieren die Nukleotidsequenz von TetQ. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Wie bereits beschrieben kann die Regulation der Genexpression über den Rhamnose-induzierbaren Promotor mit Hilfe von pMM656_TetQ_nanoluc und dem darauf kodierten Luciferase-Reportersystems untersucht werden. Das entsprechende nanoluc-Gen kodiert eine

NanoLuc-Luciferase, welche die sauerstoffabhängige Umsetzung des Substrates Furimazin zu Furimamid katalysiert (England *et al.*, 2016). Während dieser Reaktion kommt es zur Freisetzung von Biolumineszenz, welche mit Hilfe eines Photodetektors detektiert werden kann.

Durch den Rhamnose-Promotor kann über die Rhamnose-Konzentration die Genexpression der Nanoluc quantitativ gesteuert werden. Diese Regulation wurde im Folgenden in den Stämmen 3xKO_*nanoluc*, 3xKO Δ 0595-0596_*nanoluc* und 3xKO Δ 0595-0597_*nanoluc* getestet. Als Referenz-Stamm wurde der Wildtyp-Stamm von *P. vulgatus* verwendet, welcher das *nanoluc*-Gen nicht kodiert. Zunächst wurden alle Stämme in PY-Medium mit 5 mM Glukose als Substrat kultiviert. Die Inkubation erfolgte in einer 48-Well-Platte bei 37°C unter anaeroben Bedingungen. Die optische Dichte wurde alle 20 min mit Hilfe eines Plattenlesegerätes bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 21 A). Beim Erreichen der stationären Phase nach 8 h, wurde das Medium jeweils mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen (0-4 mM) supplementiert (Abb. 21 A, t₀). Dies diente der Induktion des Rhamnose-Promotors und folglich der Expression der Nanoluc-Luciferase. Nach weiteren 16h Inkubation wurden die Zellen für den Nanoluc-Assay entsprechend den Herstellerangaben weiterverarbeitet (Abb. 21 A, t_{Ende}).

In Abb. 21 A, ist beispielhaft das Wachstum von 3xKO_*nanoluc* bei 0 mM und 4 mM Rhamnose gezeigt. Da dieser Stamm, den Zucker als Substrat nutzen kann, wurde hier erwartungsgemäß nach der Zugabe von Rhamnose ein erneuter Anstieg der OD beobachtet, während die nicht supplementierte Kultur in der stationären Phase verblieben ist (Abb. 21 A). Vergleicht man die erreichten ODs der einzelnen Kulturen (Abb. 21 B), so ist zu erkennen, dass 3xKO Δ 0595-0596_*nanoluc* und 3xKO Δ 0595-0597_*nanoluc* unabhängig von der supplementierten Rhamnose-Konzentration immer eine maximale optische Dichte zwischen 0,53 und 0,56 erreichten. 3xKO_*nanoluc* hingegen, welcher den Zucker noch als Wachstumssubstrat verwenden kann, zeigte ohne Supplementierung eine maximale OD von 0,58 welche durch die Zugabe von Rhamnose auf 0,66 (1,5mM) und 0,73 (4 mM) anstieg.

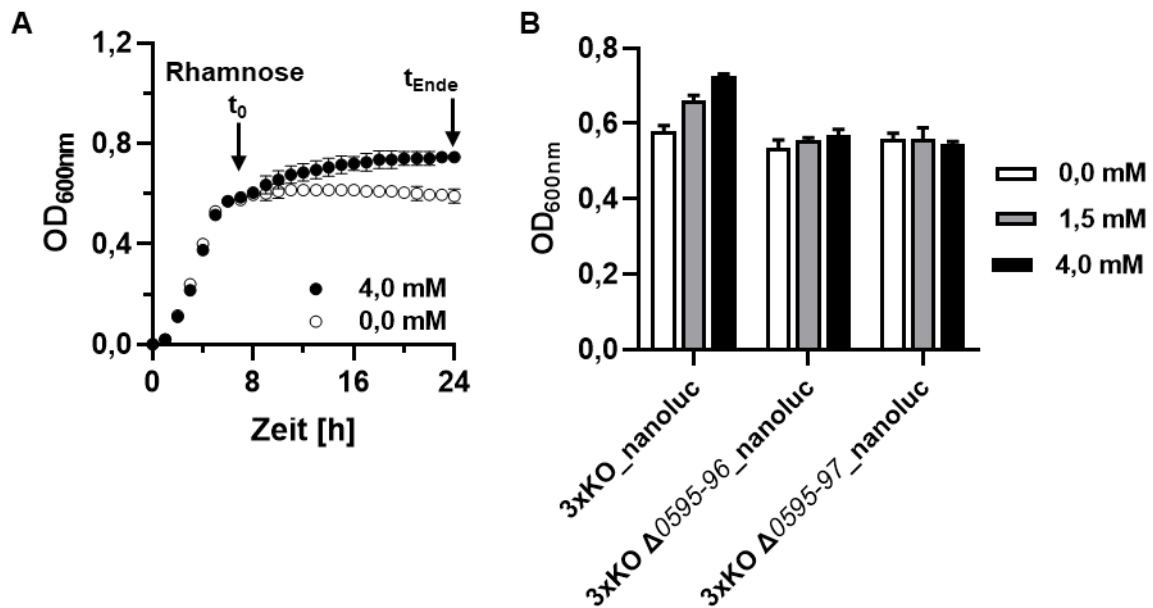


Abbildung 21: Wachstum verschiedener *P. vulgaris* Stämme, mit und ohne Induktion des Rhamnose-induzierbaren Promotors, so wie maximale OD_{600nm} der Kulturen bei verschiedenen Rhamnose-Konzentrationen. (A) Dargestellt ist die Durchführung der Inkubation der *P. vulgaris* Stämme für den Nanoluc-Luciferase-Assay. Die unterschiedlichen *P. vulgaris* Stämme wurden 8 h bis zur stationären Phase bei 37° C mit 5 mM Glucose auf PY-Medium kultiviert. Am Anfang der stationären Phase wurden unterschiedliche Rhamnose-Konzentrationen (0-4 Mm) ins Medium supplementiert (t₀) und die Zellen weitere 16 Stunden inkubiert. Die Optische Dichte wurde alle 20 min bei einer Wellenlänge von 600nm (OD_{600nm}) mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) gemessen (B) Dargestellt ist die maximale OD_{600nm} zum Zeitpunkt der Zellernte, nach der Inkubation mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen. Die dargestellten Experimente erfolgten in einem biologischen Duplikat. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

In Bezug auf die Nanoluc-Aktivität war zu erkennen, dass die gemessene Lumineszenz, mit Ausnahme des WT, in allen Stämmen mit steigender Rhamnose-Konzentration zunahm (Abb. 22). Wurde der Promotor nicht induziert (0 mM Rhamnose) so wurde den Erwartungen entsprechend keine Lumineszenz gemessen. Im WT, welcher das nanoluc-Gen nicht exprimiert, wurde trotz Induktion erwartungsgemäß keine Aktivität beobachtet (Abb. 22).

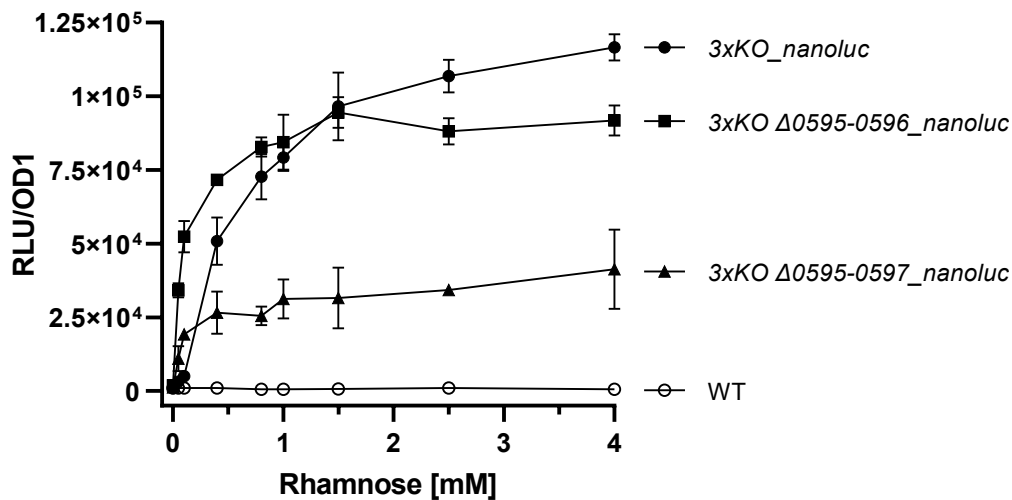


Abbildung 22: NanoLuc-Aktivität verschiedener *P. vulgatus* Stämme unter Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors. Die einzelnen Kulturen wurden in DMMG inkubiert und nach 8 h mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen supplementiert (siehe Abb. 21 A). Nach der Inkubation mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen wurden die Zellen lysiert. Das Zelllysate wurde gemäß den Herstellerangaben des NanoLuc®-Luciferase Assays behandelt. Die freigesetzte Biolumineszenz mit einem Emissionsmaximum (Emax) von 460 nm wurde mit einem Infinite 200 PRO NanoQuant Mikroplatten-Lesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf OD 1 normalisiert und mit der eingesetzten Rhamnose-Konzentration korreliert. Die dargestellten Experimente erfolgten in einem biologischen und technischen Duplikat. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. *Relative light units* (RLU). ○: *P. vulgatus* WT; ●: *P. vulgatus* 3xKO_nanoluc ; ■: *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596_nanoluc; ▲: *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597_nanoluc.

Für den Stamm 3xKO Δ0595-0597_nanoluc konnte trotz Ausschalten des Rhamnose-Symporters (BVU_0597) eine Aktivität der Nanoluc gemessen werden. Dies ließ darauf schließen, dass zusätzlich zu der spezifischen Aufnahme über den RS eine unspezifische Aufnahme von Rhamnose in *P. vulgatus* erfolgte (Abb. 22). Allerdings betrug die gemessene Nanoluc-Aktivität in diesem Stamm bei einer Promotor-Induktion mit 4 mM Rhamnose nur die Hälfte der Aktivität ($4,1 \times 10^4$ RLU/OD1) der Stämme 3xKO_nanoluc und 3xKO Δ0595-0596_nanoluc ($1,2 \times 10^5$ bzw. $9,2 \times 10^4$ RLU/OD1). Diese Ergebnisse zeigten eindeutig die Relevanz des RS für die Funktionalität des Rhamnose induzierbaren Promotors (Abb. 22).

Auch zwischen den Stämmen 3xKO_nanoluc und 3xKO Δ0595-0596_nanoluc konnten deutliche Unterschiede in der Nanoluc-Aktivität festgestellt werden (Abb. 22). Während die maximale Aktivität bei einer Induktion des Promotors mit 4 mM Rhamnose vergleichbar war

($1,2 \times 10^5$ bzw. $9,2 \times 10^4$ RLU/OD1), gab es bei geringen Rhamnose-Konzentrationen (0-1 mM) große Unterschiede. Bei einer Promotor-Induktion mit 0,05 mM Rhamnose lag die Aktivität in dem Stamm 3xKO $\Delta 0595-0596_nanoluc$ bereits bei $3,4 \times 10^4$, während die gemessene Aktivität im Stamm 3xKO $_nanoluc$ mit $3,2 \times 10^3$ RLU/OD1 10-Mal geringer war (Abb. 22). Auch durch die Induktion von 0,1 mM Rhamnose war die Aktivität in dem Stamm ohne funktionale RK und RI 10-Mal höher ($5,2 \times 10^4$ RLU/OD1) als im Ausgangsstamm ($5,0 \times 10^3$ RLU/OD1). Ab einer Konzentration von 0,4 mM Rhamnose wurde der Unterschied zwischen der Nanoluc-Expression der beiden Stämme geringer und war bei 1,5 mM gleich (Abb. 22). Die Daten zeigten somit, dass die Deletion von *bvu_0595* und *bvu_0596* die Induktion des Promotors bei geringen Rhamnose-Konzentrationen deutlich erhöhten.

Zusammenfassend zeigten die Daten aus Abbildung 22, dass der RS (BVU_0597) für die Regulation des Promotors notwendig ist und *bvu_0597* daher nicht deletiert werden muss. Durch die Deletion der für die RI und RK kodierenden Gene *bvu_0595* und *bvu_0596* konnte die für Induktion des Promotors notwendige Rhamnose-Konzentration allerdings stark verringert werden. Somit eignete sich der Stamm 3xKO $\Delta 0595-0596_nanoluc$ am besten für die Regulation des Rhamnose-induzierbaren-Promotors.

Um eine Aussage über den möglichen Zusammenhang der erhöhten Nanoluc-Expression in *P. vulgaris* 3xKO $\Delta 0595-0596_nanoluc$ und der unterbundenen Rhamnose-Verstoffwechslung in diesem Stamm treffen zu können, wurde zusätzlich zur Lumineszenz die im Medium vorhandene Rhamnose-Konzentration bestimmt (Abb. 23). Diese wurde am Anfang der Induktion (t_0) und zum Zeitpunkt des Nanoluc-Luciferase Assays (Abb. 21 A, t_{Ende}) im Überstand der Kulturen mittels HPLC gemessen.

In Abbildung 23 sind beispielhaft die Ergebnisse für die mit 0,1 mM (A), 0,4 mM (B), 0,6 mM (C) und 4 mM (D) induzierten Kulturen dargestellt.

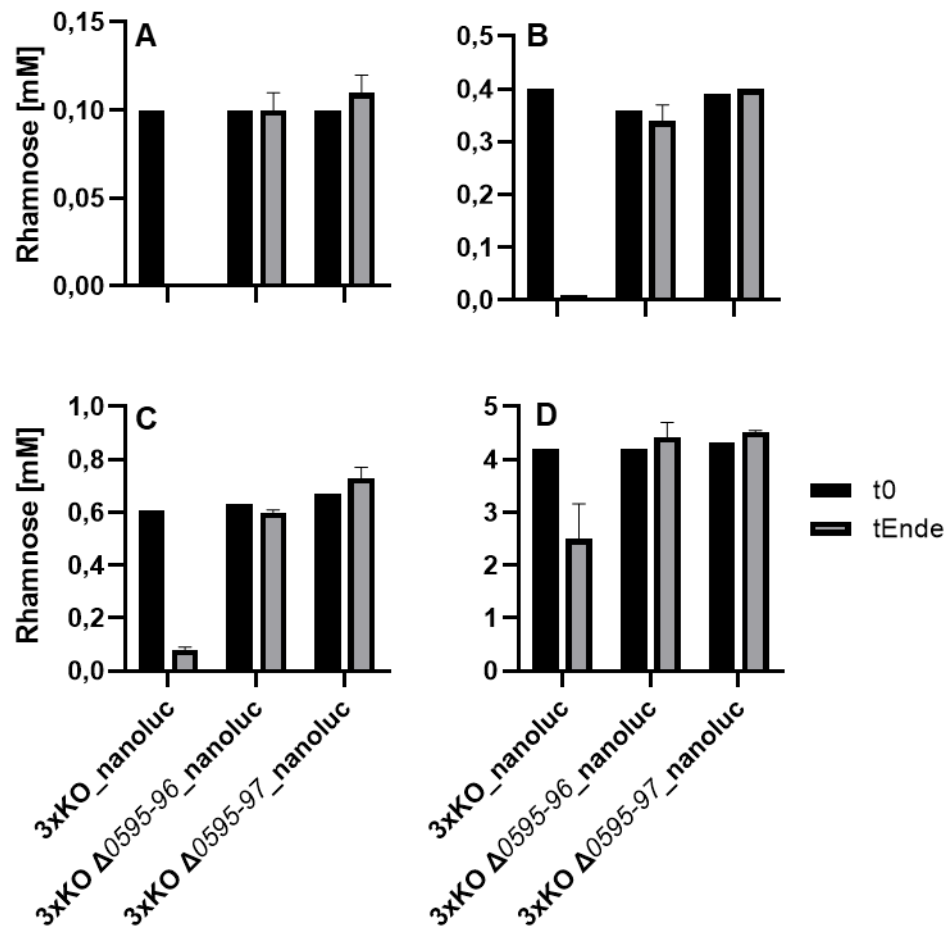


Abbildung 23: Verbleibende Rhamnose-Konzentrationen nach Induktion des Rhamnose-Promotors zur Messung der Nanoluc-Aktivität. Dargestellt sind beispielhaft die Induktions-Konzentration mit 0,1 mM (A), 0,4 mM (B), 0,6 mM (C) und 4 mM (D) Rhamnose am Anfang der Supplementierung (t0) und am Ernte-Zeitpunkt der Zellen (Abb. 21 A, tEnde). Es wurden jeweils 200 µl Medium entnommen, zentrifugiert und der Überstand mittels HPLC gemessen. Die Experimente wurden in biologischen Duplikaten durchgeführt.

Die Ergebnisse bestätigten, dass, den Erwartungen entsprechend, die Rhamnose-Konzentration in den Kulturen 3xKO Δ0595-0596_nanoluc und 3xKO Δ0595-0596_nanoluc im Laufe der Inkubation nicht verringert wurde. Für 3xKO_nanoluc konnten allerdings am Ende, bei einer Anfangskonzentration von 0,1 mM Rhamnose, keine Überreste mehr detektiert werden (Abb. 23 A). Bei einer der Supplementierung mit 0,4 mM Rhamnose wurden zum Erntezeitpunkt 0,01 mM detektiert (Abb. 23 B). Von den anfänglichen 0,6 mM, verblieb ein Zehntel ($0,08 \pm 0,01$ mM) in der Kultur (Abb. 23 C). Das Verhältnis der Rest-Rhamnose stieg mit zunehmender Anfangs-Konzentration an und betrug bei einer Induktion mit 4 mM mit $2,5 \pm 0,7$ mM Rest-Rhamnose noch mehr als die Hälfte (Abb. 23 D).

Auffällig war hierbei, dass die Anfangs-Konzentration, bei der am Ende noch Restzucker im Überstand detektiert wurde, mit der Konzentration korrelierte, bei der der Unterschied zwischen der Expression von 3xKO $\Delta 0595-0596_nanoluc$ und 3xKO $_nanoluc$ weniger wurde (Vergleich Abb. 22). Die Rhamnose-Konzentrationen, welche 3xKO $\Delta 0595-0596_nanoluc$ eine zehnfach höhere Nanoluc-Aktivität vermittelten, konnten bei 3xKO $_nanoluc$ aufgrund deren Verstoffwechslung nicht mehr detektiert werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Umsetzung von Rhamnose durch *P. vulgatus* bei geringen Konzentrationen zu einer schlechteren Induktion des Promotors führt.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass durch die Deletion der Gene *bvu_0595*, *bvu_0596* und *bvu_0597* die Verstoffwechslung von Rhamnose durch *P. vulgatus* unterbunden und somit die Regulation der *nanoluc*-Expression über den Rhamnose-induzierbaren Promotor optimiert werden kann. Auch wenn der RS (BVU_0597) noch im Genom vorhanden war, konnte die Rhamnose von *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ nicht als Substrat genutzt werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass der RS für die Aufnahme von Rhamnose und somit zur Regulation des verwendeten Promotors notwendig ist. Schlussfolgernd stellte sich heraus, dass der in diesem Kapitel generierte Stamm *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ sich am besten für eine Gen-Regulation über den Rhamnose-induzierbaren Promotor eignet.

3.1.3.2 Integration des Vektors pMM656_RP_3787 in *P. vulgatus*

In dem vorherigen Kapitel wurde gezeigt, dass eine Regulation von Genen über den Rhamnose-induzierbaren Promotor möglich ist. In einem nächsten Schritt sollte nun die Expression des für die PFOR kodierenden Gens (*bvu_3787*) mit dem zuvor beschriebenen System reguliert werden. Hierfür wurde das *nanoluc*-Gen auf dem pMM656_TetQ durch die Nukleotidsequenz von *bvu_3787* ersetzt und so der Vektor pMM656_RP_3787 (Abb. 24 A) erstellt. Dazu wurde unter Verwendung der Primer 656_TetQ_RP_BB_fw/rev (Tab. 7) das Plasmidrückgrat amplifiziert. Die Gensequenz von *bvu_3787* wurde mit Hilfe der Primer *bvu_3787* fw/rev vervielfältigt. Darauf folgten die Assemblierung der Fragmente und das Einbringen des Konstruktes in *E. coli* $\beta 2155$ mittels NEB® Assembly Master Mix und Elektroporation. Über Kolonie-PCR wurde die korrekte Assemblierung des Konstruktes überprüft. Über die Primer scr_pMM656_TetQ_bvu378 (Tab. 7) wurde den Erwartungen entsprechend ein 4151 bp

großes Fragment amplifiziert. Somit war die die korrekte Assemblierung von pMM656_RP_3787 nachgewiesen.

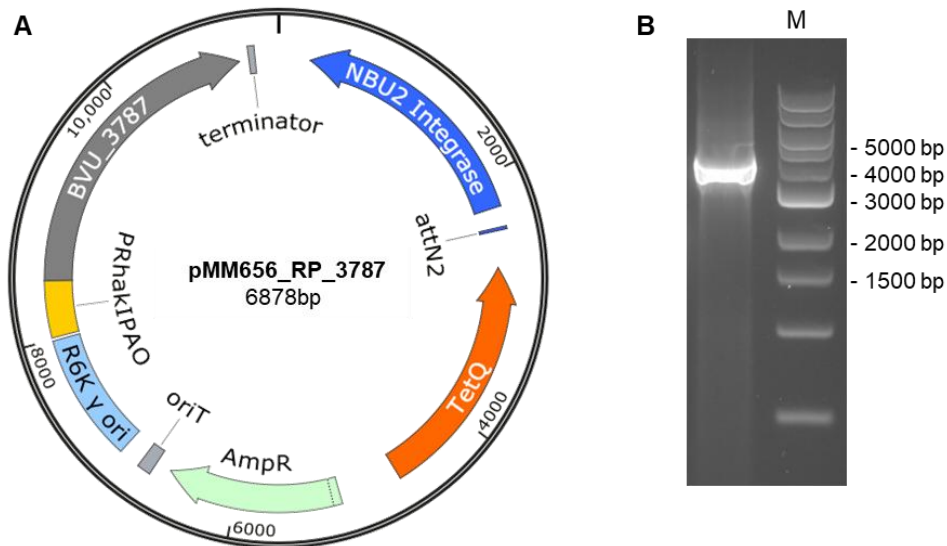


Abbildung 24: Konstruktion des Vektors pMM656_RP_3787 (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_RP_3787. Die auf dem Plasmid kodierte Sequenz von *bv_u_3787* steht unter der Kontrolle des stromaufwärts liegenden Rhamnose induzierbaren Promotors (P_{RhaKIPAO}). Das Plasmid kodiert zusätzlich eine NBU2 Integrase, welche die sequenzspezifische Rekombination zwischen der auf dem Vektor kodierten attN2-site und einer am 3'-Ende eines der für tRNAs_{er} kodierenden Gene im Genom liegenden attN-site katalysiert. R6KoriV = *origin of replication*; RP4OriT = *origin of transfer*; AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette; TetQ = Tetrazyklin-Resistenzkassette. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der korrekten Assemblierung des Gens *bv_u_3787* in das Rückgrat von pMM656. Das verwendete Primerpaar scr_pMM656_TetQ_Bvu_3787_fw/rev bindet in dem Plasmidrückgrat und flankiert die Gensequenz von *tetQ*. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Mittels biparentaler Konjugation wurde das neu generierte Konstrukt in *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 transferiert (Abb. 25 A). Zum Nachweis der Integration des Vektors in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 wurden die Primer attB_for und TetQ_pMM656_rev verwendeten. Der *foward* Primer band hierbei im Genom von *P. vulgatus*, stromaufwärts von der attN-site. Der reverse-Primer band auf dem Plasmidrückgrat, hinter der für *tetQ* sequenzierenden Sequenz. Wurde das Plasmid in die genomische DNA von *P. vulgatus* eingebaut, so war ein Fragment von 2313 bp zu erwarten. Während das gewünschte Signal im Wildtypstamm nicht vorhanden war (Abb. 25 B), konnte es in dem neu generierten Stamm detektiert werden (Abb. 25 C, Spur 2).

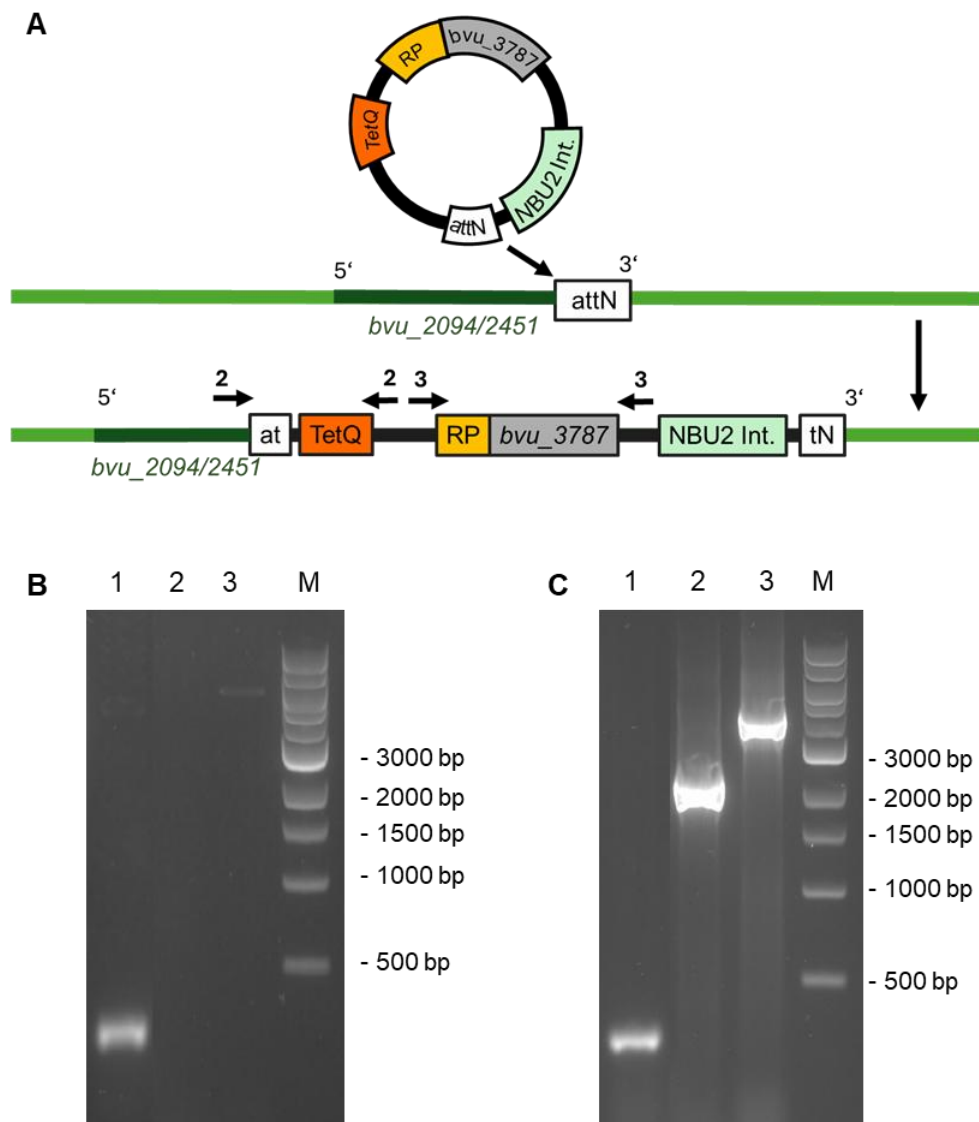


Abbildung 25: Rekombination des Plasmids pMM656_RP_3787 in das Genom von *P. vulgatus* und Kolonie-PCR zum Nachweis der Integration. (A) Schematische Darstellung der NBU2 Integrase vermittelten sequenzspezifischen Rekombination zwischen der auf dem Vektor pMM656_RP_3787 kodierten attN2-site und einer am 3'-Ende eines der für tRNAsen kodierenden Gene (*bvu_2094/2451*) im Genom liegenden attN-site. Die Pfeile und die zugehörigen Zahlen veranschaulichen die Bindungsstelle der in B und C verwendeten Primer. RP = Rhamnose-induzierbarer Promotor, TetQ = Tetrazyklin-Resistenzkassette, AmpR = Ampicillin-Resistenzkassette, NBU2 Int. = NBU2 Integrase. (B) Agarose-Gel nach PCR auf den Wildtyp-Stamm. (C) Agarose-Gel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Integration von pMM656_RP_3787 in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$. Die verwendeten Primer 16S_Bac fw/rev binden innerhalb der 16S RNA von *Bacteroides*-Spezies (Spur 1). Die Primer attB_for und TetQ_pMM656_rev (Spur 2) binden im Genom (*forward*-Primer) beziehungsweise auf dem Plasmidrückgrat (*rev*) und ergeben somit nur ein Fragment, wenn eine Integration des Plasmids in die genomische DNA stattgefunden hat. Die Primer scr_pMM656_TetQ_Bvu378_fw/rev binden jeweils im Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz des RP mit nachgeschaltetem *bvu_3787* (Spur 3).

Als zusätzlicher Nachweis wurden die Primer scr_pMM656_TetQ_Bvu378_fw/rev angewendet um das Vorhandensein von *bvu_3787* mit dem vorgeschalteten Rhamnose-Promotor nachzuweisen. Auch hier konnte das erwartete Fragment von 4151 bp im neuen Stamm aber nicht im WT gefunden werden (Abb. 25 B und C, Spur 3). Zum Nachweis, dass es sich bei der selektierten Kolonie um *P. vulgatus* handelte, wurden die Primer Bac_16S2_fw und rev verwendet (Abb. 25 B und C, Spur 1). Außerdem wurde mit den jeweiligen qPCR-Primern, welche innerhalb der spezifischen Gene binden, gezeigt, dass das Plasmid in den Stamm *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0596 eingebracht wurde (Abb. 25 B, Spur 2-7). Damit wurde die Generierung des Stammes *P. vulgatus* 3xKO Δ 0595-0596 pMM656_TetQ_RP_3787 (3xKO RP_3787) nachgewiesen.

Nach der Erstellung des Stammes 3xKO RP_3787 sollte die Auswirkung der Induktion des RP auf die Expression von *bvu_3787* und die Bildung von Acetat als Endprodukt untersucht werden. Hierfür wurden die neue Mutante 3xKO RP_3787 und als Vergleich der Stamm 3xKO auf DMMG (15 mM) kultiviert. Um einen Vergleich zwischen induziertem und nicht induziertem Promotor ziehen zu können, wurde jede Kultur, einmal ohne Rhamnose und einmal mit 4 mM Rhamnose, inkubiert. Während der exponentiellen Phase wurden die Zellen geerntet und zur RNA-Isolierung weiterverarbeitet. Anschließend erfolgte eine RT-qPCR mit Hilfe der Primer qPCR_bvu_0876_fw/rev. Zusätzlich zu *bvu_3787* wurde untersucht, ob die Induktion eine Auswirkung auf die für die PK, PTA und AK kodierenden Gene *bvu_0876*, *bvu_0523* und *bvu_0524* hatte, welche *bvu_3787* unmittelbar vor- und nachgeschaltet sind. Hierfür wurden die Primer qPCR_bvu_0876_fw/rev, qPCR_bvu_0523_fw/rev und qPCR_bvu_0524_fw/rev (Tab. 7) verwendet. Als Referenzgen diente das für das ribosomale Protein L23 kodierende Gen. Die Überstände der Kulturen wurden mittels HPLC analysiert.

Die in Abbildung 26 dargestellten Daten zeigen, dass die Zugabe von 4 mM Rhamnose eine Auswirkung auf die Transkript-Abundanz von *bvu_3787* hatte. Ohne Rhamnose-Zusatz hatte *bvu_3787* im Vergleich zu l23 eine Abundanz von $0,35 \pm 0,18$, wurden dem Medium 4 mM Rhamnose zugesetzt so stieg die relative Transkriptmenge auf $0,96 \pm 0,45$ (Abb. 26 A). Für die relative mRNA-Abundanz der restlichen Gene wurde kein Unterschied in der Gegenwart von Rhamnose festgestellt. Für eine genauere Analyse des Effekts von Rhamnose auf *bvu_3787*, wurde in Abbildung 26 B die Transkriptmenge nach der Induktion relativ zu der Transkriptmenge ohne Induktion (=1) dargestellt. Verglichen wurde dies mit den jeweiligen

RNA-Mengen im Stamm 3x KO. Die Daten zeigen, dass die mRNA-Abundanz in dem mutierten Stamm mit Induktion $2,7 \pm 0,9$ -mal höher war als ohne Induktion. Im 3xKO lag das Verhältnis bei $0,9 \pm 0,2$ und wurde somit nicht durch die Rhamnose-Supplementierung beeinflusst.

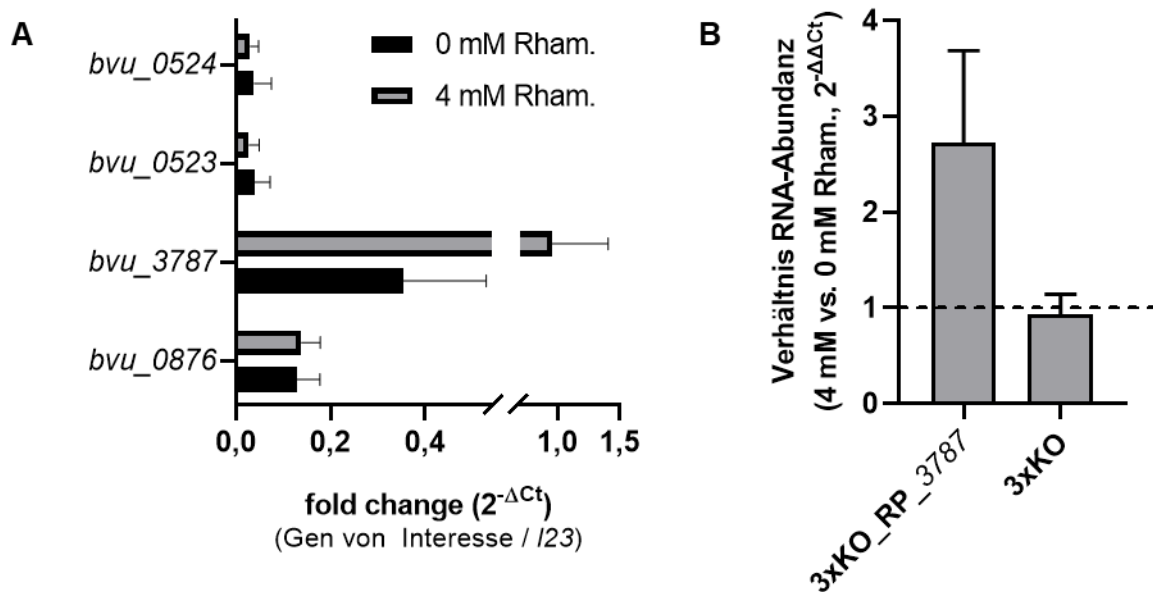


Abbildung 26: Transkriptanalyse der Gene des fermentativen Astes in *P. vulgatus* 3xKO RP_3787 und in *P. vulgatus* 3xKO mit und ohne Induktion des RP durch Rhamnose (A) Dargestellt ist die relative Transkriptmenge ($2^{-\Delta C_t}$) der Gene *bvu_0876* und *bvu_3787*, *bvu_0523* und *bvu_0524* zum Referenzgen *l23* von 3xKO RP_3787 mit induzierten und nicht induziertem RP. (B) Gezeigt ist die mRNA-Abundanz von *bvu_3787* in *P. vulgatus* 3xKO RP_3787 und *P. vulgatus* 3xKO bei induziertem RP (4 mM Rhamnose), normiert auf die Transkriptmenge ohne Induktion (schwarze Linie). Zur Berechnung wurde ausgehend vom ΔC_t der $\Delta\Delta C_t$ -Wert bestimmt und darauf die Formel $2^{-\Delta\Delta C_t}$ angewendet. Die dargestellten Experimente wurden jeweils in zweifacher Ausführung aus RNA-Präparaten aus vier verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Die parallel zu der Transkriptanalyse untersuchten Stoffwechselendprodukte ergaben, dass der neue Stamm 3xKO RP_3787 ohne Zusatz von Rhamnose $15,4 \pm 3,2$ mM Acetat/ gTG produzierte (Abb. 27). In Gegenwart von 4 mM Rhamnose bildete er $16,3 \pm 3,0$ mM Acetat/ gTG. Somit konnte hier keine eindeutige Auswirkung von Rhamnose festgestellt werden. Auch die Succinat-Produktion war in beiden Stämmen vergleichbar ($10,8 \pm 0,8$ mM Succinat/ gTG bei 0 mM Rhamnose und $11,1 \pm 2,7$ mM Acetat/gTG bei 4 mM Rhamnose) (Abb. 27).

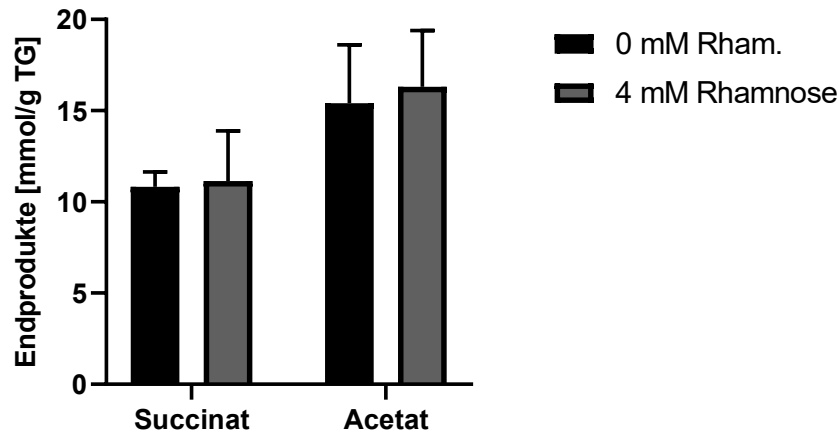


Abbildung 27: Stoffwechselendproduktbildung von *P. vulgatus* 3xKO RP_3787 mit und ohne Rhamnose. Jeweils fünf Kulturen wurden mit oder ohne supplementierter Rhamnose (4 mM) auf DMMG-Medium (15 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen verrechnet. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Anhand der in Kapitel 3.1.3.2 erzielten Ergebnisse konnte festgehalten werden, dass das Einbringen einer zweiten Kopie von *bvu_3787*, welche unter der Kontrolle eines mit Rhamnose induzierbarem Promotor lag, in das Genom von *P. vulgatus* erfolgreich war. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Genexpression tatsächlich über die Zugabe von Rhamnose ins Medium reguliert werden kann. Allerdings hatte eine Induktion mit 4 mM Rhamnose keine eindeutige Auswirkung auf die Acetat-Produktion.

3.1.3.3 Deletion der genomischen Kopie von *bvu_3787*

Nachdem die regulierbare Kopie von *bvu_3787* in das Genom von *P. vulgatus* eingebracht wurde (Abb. 15 Schritte 2 und 3), sollte nun erneut die Deletion der genomischen Kopie versucht werden. Dafür wurden das in Kapitel 3.1.2.1 erstellte Konstrukt verwendet und dem zuvor beschriebenen Versuchsablauf gefolgt. Da die einfache Deletion von *bvu_3787* in Kapitel 3.1.2.1 einen letalen Effekt hatte und in der Abwesenheit von Rhamnose die Expression der auf dem Plasmid kodierten Kopie von *bvu_3787* nicht möglich sein sollte, wurden zusätzlich bei der Generierung der zweiten Homologen 10 mM Rhamnose ins Medium und in die Selektions-Platten hinzugefügt. Nach der Gegenselektion auf Saccharose-haltigen Agar-Platten, wurde mittels Kolonie PCR geprüft, ob die gewünschte Deletion stattgefunden hat. Die Verwendeten Primer *seq_Δ3787_fw/rev* banden jeweils in der *up-* beziehungsweise

downstream-Region von *bvu_3787* und flankierten somit die zu deletierende Sequenz (Abb. 28 B). Mittels der Primer wurde ein 735 bp langes Fragment amplifiziert (Abb. 28 A Spur 2), was der erwarteten Größe bei Fehlen des Gens entsprach. Die darauffolgende Sequenzierung bestätigte die markerlose Deletion der genomischen Kopie von *bvu_3787* (Abb. 28 C). Mit Hilfe der Primer seq_Rham_fw/rev wurde zusätzlich ein Fragment von 1447 bp erzeugt (Abb. 28 A, Spur 1). Da die Primer im Plasmidrückgrat vor dem Rhamnosepromotor und in der auf dem Plasmid kodierten Gensequenz von *bvu_3787* banden, wurde somit nachgewiesen, dass die regulierbare Kopie noch im Genom vorhanden war.

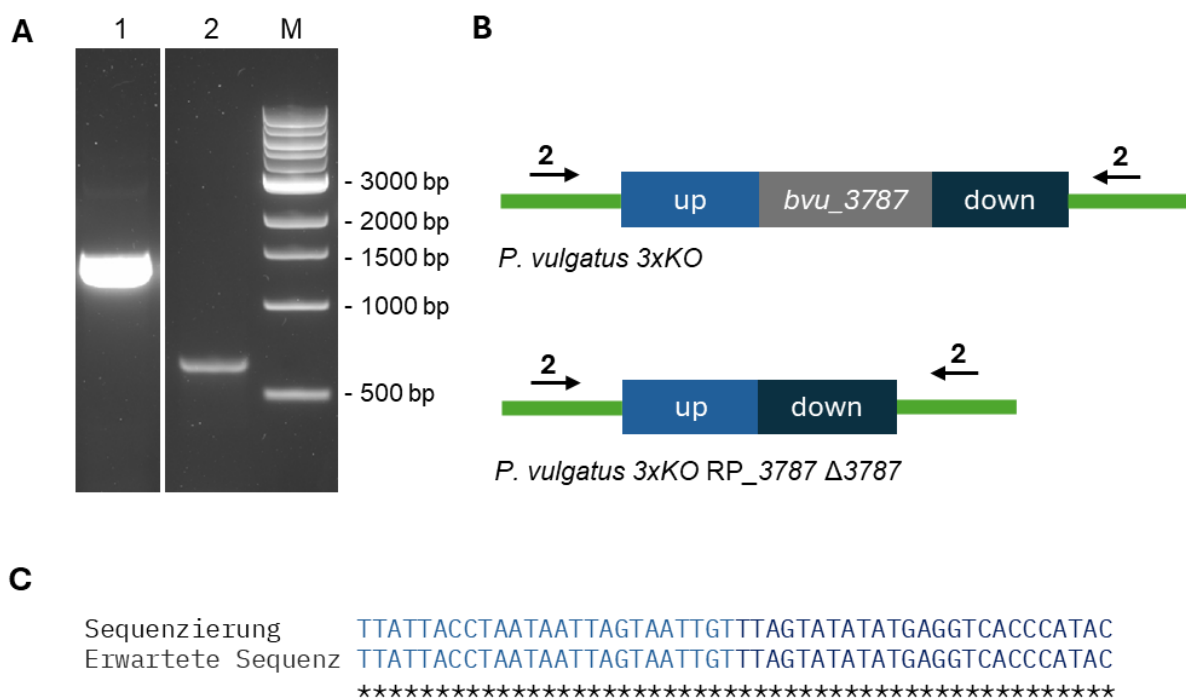


Abbildung 28: Kolonie-PCR und Sequenzierung zum Nachweis der Generierung von *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 RP_3787 Δ3787. (A) Agarosegel nach Kolonie-PCR zur Untersuchung der zweiten homologen Rekombinante. Die Primer seq_Δ3787_fw/rev binden strom- auf und -abwärts der *up*- beziehungsweise *downstream*-Region der genomischen Kopie von *bvu_3787* (Spur 2) und die Primer seq_Rham_fw/rev binden im Plasmidrückgrat vor dem Rhamnosepromotor und in der auf dem Plasmid kodierten Gensequenz von *bvu_3787* (Spur 1). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland). (B) Schematische Darstellung des Genoms von *P. vulgatus* vor und nach der Deletion. Die Pfeile zeigen die Bindestelle der Primer seq_Δ3787_fw/rev welche zur Sequenzierung genutzt wurden. (C) Sequenzierung des Deletionsbereiches zur Bestätigung der Deletion der genomischen Kopie des für die PFOR kodierende Gens *bvu_3787*.

Zur Untersuchung der phänotypische Auswirkung der Deletion wurde der Stamm in einer 48-Well Platte in DMMG jeweils mit und ohne Rhamnose zur Induktion inkubiert und die Optische Dichte mittels Plattenlesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) bestimmt. Da die einfache Deletion von *bvu_3787* in Kapitel 3.1.2 einen letalen Effekt hatte und in der Abwesenheit von Rhamnose die Expression der auf dem Plasmid kodierten Kopie von *bvu_3787* nicht möglich sein sollte, war zu erwarten, dass der generierte Stamm ohne Rhamnose nicht lebensfähig ist. Entgegen der Erwartungen, wurde für den neu generierten Stamm dennoch Wachstum ohne Induktion beobachtet Sowohl mit als auch ohne Rhamnose erreichte der Stamm nur eine maximale OD von 0,3 (Abb. 29 A) und auch in der Wachstumsrate konnte kein Unterschied zwischen den beiden Kulturen festgestellt werden (Abb. 29). Eine anschließende Analyse der Stoffwechselendprodukte mittels HPLC verdeutlichte, dass auch ohne Induktion des Promotors Acetat gebildet wurde (Abb. 29 B). Somit war die Deletion zwar erfolgreich aber der gewünschte Phänotyp konnte nicht generiert werden.

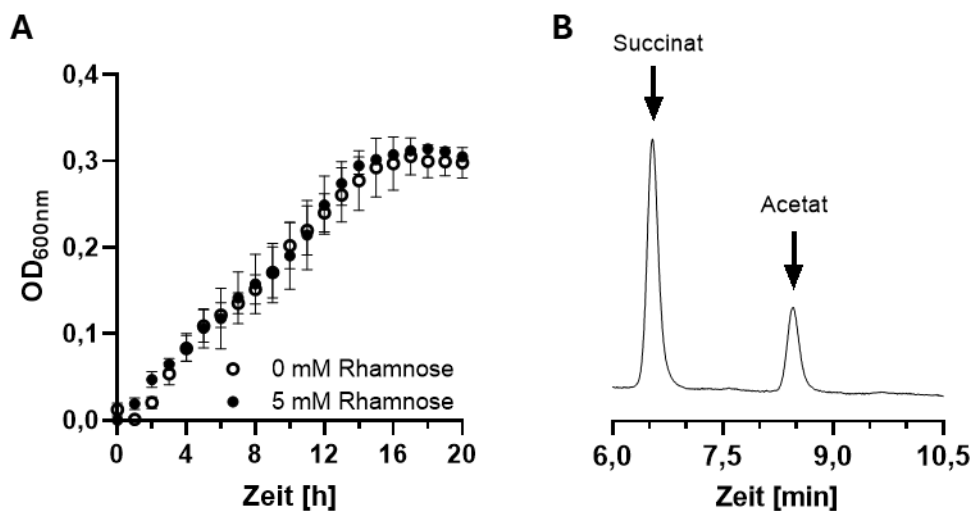


Abbildung 29: Wachstum von *P. vulgatus* 3x KO RP_3787 Δ3787 und HPLC-Chromatogramm der Stoffwechselendprodukte. (A) Wachstumskurve von *P. vulgatus* 3x KO RP_3787 Δ3787 mit (5 mM) und ohne (0 mM) Rhamnose. Die Durchführung erfolgte in einer 48-Wellplatte bei 37°C unter anaeroben Bedingungen. Als Medium wurde DMMG (15 mM) verwendet. Die optische Dichte wurde mittels Plattenlesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Das Experiment erfolgte in dreifacher Ausführung. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. (B) Dargestellt ist exemplarisch ein HPLC-Chromatogramm der Stoffwechselendprodukte im Kulturüberstand von *P. vulgatus* 3x KO RP_3787 Δ3787 ohne Rhamnose.

Zusammenfassend konnte in Kapitel 3.1.3 ausgehend von *P. vulgatus* 3xKO ein Stamm generiert werden, welcher anstelle der genomischen Kopie von *bvu_3787* eine regulierbare Kopie auf einem Plasmid im Genom integriert hatte. Somit war es möglich, die anfänglich letale Deletion (Kapitel 3.1.2.1) zu umgehen. Zusätzlich konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die Transkriptmenge von *bvu_3787* über eine Rhamnose-Supplementierung erhöht werden kann und das Regulationssystem funktional ist. Auch wenn in diesem Fall nicht der gewünschte Phänotyp beobachtet werden konnte (siehe Kapitel 4.1.1.3), war die Generierung eines regulierbaren Konstruktes auf Genotyp-Ebene erfolgreich.

3.1.4 Homologe Überexpression der Gene aus dem PPW in der dreifach Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310 \Delta 2499 \Delta 2880$

3.1.4.1 Homologe Überexpression des für die Transketolase kodierenden Gens *tkt*

Neben der Deletion von Genen zur Eliminierung von unerwünschten Nebenprodukten, gibt es zusätzlich die Möglichkeit den Stoffwechsel von Bakterien mittels homologer Überexpression bestimmter Gene zu beeinflussen. Nach Zhu *et al.* (2014) wird die Aktivität des Pentosephosphat-Wegs (PPW) und die damit einhergehende Succinat-Produktion in *E. coli* durch die Expression der Transketolase geprägt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Überexpression des Transketolase-Gens (*tkt*, *bvu_2318*) auch in *P. vulgatus* die Succinat-Produktion beeinflusst (Lück, 2023). Durch die homologe Expression von *bvu_2318* über den *shuttle*-Vektor pG106 wurde die Transketolase in *P. vulgatus* pG106_p2499_*tkt* 29-mal stärker transkribiert, was zu einer 35 %-igen Steigerung des Succinat-Ertrages führte (Lück, 2023). Das verwendete Plasmid basiert auf dem *shuttle*-Vektor pG106 (Jones *et al.*, 2020). Auf diesem Vektor befindet sich eine 5 kb große Mob-Rep-Region (Abb. 30), welche in den Vertretern der Gattung *Bacteroides* als OriV der Initiation der Plasmidreplikation dient (Jones *et al.*, 2020). Als Selektionsmarker dient eine vom Vektor kodierte hybride Erythromycin-Resistenzkassette. Diese vermittelt sowohl in *E. coli* (ErmAM) als auch in *Bacteroides*-Spezies (ErmF) eine Resistenz (Jones *et al.*, 2020). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass dieser *shuttle*-Vektor sich als genetisches Werkzeug zur homologen Überexpression von Genen in *P. vulgatus* eignet (Lück & Deppenmeier, 2022). Zur Überexpression des Transketolase-Gens wurden

zusätzlich der native LDH-Promotor (p2499) sowie das Gen *bvu_2318* welches für die Transketolase kodiert, in den Vektor eingebracht (Abb. 30) (Lück, 2023).

Zudem konnte wie bereits beschrieben in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, dass die Deletion der Methylmalonyl-CoA-Mutase (MM-CoA-Mutase), der D-Lactat-Dehydrogenase (D-LDH) und der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) in *P. vulgatus* ebenfalls zur Erhöhung der Succinat-Produktion führte (Lück, 2023).

Um eine zusätzliche Steigerung der Succinat-Ausbeute zu erreichen, wurde in dieser Arbeit das Überexpressions-Plasmid pG106_p2499_tkt in die dreifach-Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309\text{-}0310\ \Delta 2499\ \Delta 2880$ (*P. vulgatus* 3xKO) eingebracht. Die Transformation des Plasmids in *P. vulgatus* 3xKO erfolgte mittels Elektroporation und anschließender Selektion auf Erythromycin-haltigen Agar-Platten. Mittels Kolonie-PCR, unter Verwendung der Primer pG106_screening_fw und pG106_screening_rev (Tab. 7), wurde das Vorhandensein des auf dem Plasmid gelegenen Gens *tkt* überprüft.

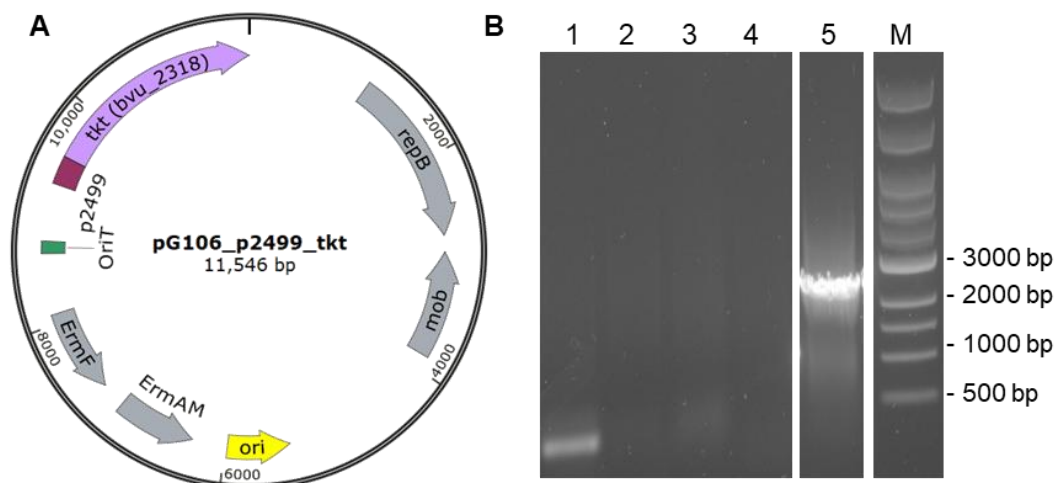


Abbildung 30: Plasmidkarte pG106_p2499_tkt und Kolonie-PCR zum Nachweis des shuttle Vektors in *P. vulgatus* $\Delta 0309\text{-}0310\ \Delta 2499\ \Delta 2880$. (A) Plasmidkarte des verwendeten Vektors pG106_p2499_tkt (Lück, 2023) mit dem darauf kodierten Gen *bvu_2318* (*tkt*) und der 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz der LDH. Die 5 kb große Mob-rep-Region dient als OriV (*origin of replication*) für *Bacteroides*-Spezies. Die Resistenzkassette ErmFermAM dient der Selektion von *E. coli* (ErmAM) und *Bacteroides* (ErmF). OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis des Transfers von pG106_p2499_tkt in *P. vulgatus* 3xKO. Die verwendeten Primer 16S_Bac fw/rev binden innerhalb der 16S RNA von *Bacteroides*-Spezies (Spur 1). Die Primer qPCR_bvu0309 fw/rev (Spur 2), qPCR_LDH fw/rev (Spur 3) sowie qPCR_bvu2880 fw/rev (Spur 4) binden innerhalb der Gene der MM-CoA-Mutase, der LDH und der PFL. Die Primer pG106_screening_fw/rev binden in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz von *bvu_2318* mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz des Gens *bvu_2499* (p2499). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland)

Nach einer Gelelektrophorese wurde die erwartete Fragmentgröße von 2565 bp nachgewiesen (Abb. 30 B, Spur 5). Die Primer 16S_Bac_fw und 16S_Bac_rev dienten dem Nachweis von *P. vulgatus*. Zusätzlich dienten die Primerpaare qPCR_bvu0309_fw/rev, qPCR_LDH fw/rev sowie qPCR_bvu2880 fw/rev, welche innerhalb der Nukleotidsequenz von *bvu_0309*, *bvu_2499* und *bvu_2880* banden, dem Nachweis der Deletionsmutante 3xKO. Durch das Fehlen der entsprechenden Fragmente (Abb. 30 B) wurde die Generierung des Stammes *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt verifiziert.

In einer vorherigen Studie wurde gezeigt, dass der Shuttle-Vektor pG106 nach einbringen und replizieren etwa 30-mal in *P. vulgatus* vorliegen kann (Lück, 2023). Um sicher zu stellen, dass das Plasmid pG106_p2499_tkt auch in *P. vulgatus* 3xKO problemlos repliziert wird, wurde die Kopienzahl des *tkt* Gens in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO mittels qPCR untersucht. Das für das ribosomale Protein L23 kodierende Gen *bvu_0803* aus *P. vulgatus* diente hierbei als Referenzgen. Zur Bestimmung der relativen Anzahl an *tkt*-Genen wurden die genspezifischen Primer qPCR_tkt_fw und qPCR_tkt_rev (Tab 7) sowie die für das *l23*-Gen spezifischen Primer qPCR_l23_for und qPCR_l23_rev (Tab 7) verwendet. Entsprechend den Erwartungen war die Kopienzahl des *tkt*-Gens in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO deutlich erhöht (Abb. 31). Während das Gen in *P. vulgatus* 3xKO nur einmal vorlag, befanden sich in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt 35 ± 3 Kopien (Abb. 31 A).

Anschließend an die Quantifizierung der *tkt*-Kopienzahl wurde die Transkriptabundanz von *tkt* in dem Überexpressionsstamm und in *P. vulgatus* 3xKO bestimmt. Hierfür wurden beide Stämme in DMM-Medium mit Xylose als Substrat bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert und die RNA der jeweiligen Zellen extrahiert. Die darauffolgende Transkriptanalyse erfolgte mittels RT-qPCR unter Verwendung von genspezifischen Primern für das *tkt* Gen. Wie bei der Bestimmung der Kopienzahl diente auch hier *bvu_0803* als Referenzgen. Die Durchführung und Auswertung erfolgten nach der in Kapitel 2.4.16 (Material und Methoden) beschriebenen Methodik.

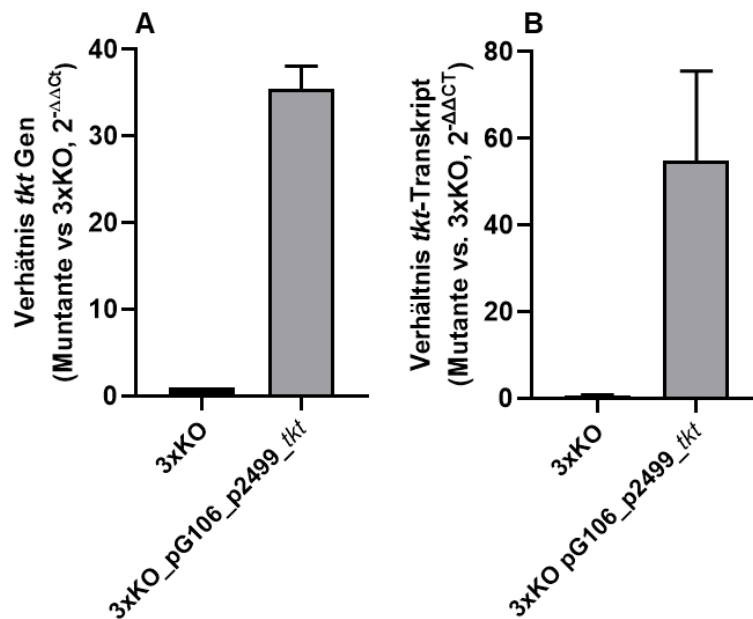


Abbildung 31: Kopienzahl (A) und Transkriptabundanz (B) des Gens *tkt* in *P. vulgatus* 3xKO und in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *tkt*. (A) Zum Vergleich der chromosomal und Plasmid kodierten Kopienzahl in der Expressionsmutante mit der chromosomal kodierten Kopienzahl in *P. vulgatus* 3xKO wurde eine qPCR durchgeführt. (B) zur Bestimmung der relativen Transkriptmenge wurde eine RT-qPCR angewandt. Für die Analysen in A und B wurden genspezifische Primer verwendet und *bvu_0803* diente als Referenzgen. Über den ΔCT -Wert wurde erst die Differenz zwischen dem *tkt*- und dem *l23*- Gen berechnet und anschließend über die Ermittlung des $\Delta\Delta CT$ -Wertes und der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ das Verhältnis zwischen der Expressionsmutante und *P. vulgatus* 3xKO bestimmt. Die in A und B dargestellten Experimente wurden jeweils in dreifacher Ausführung aus DNA- beziehungsweise RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Entsprechend der erhöhten Kopienzahl war auch die *tkt*-Transkriptmenge in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *tkt* im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO erhöht (Abb. 31B). In dem Plasmid-tragenden Stamm konnte somit im Vergleich zu dem nur chromosomal kodierenden Stamm eine 54 ± 14 fach erhöhte Transkriptmenge des *tkt*-Gens bestimmt werden (Abb. 31 B). Nachdem die erhöhte Transkriptabundanz des *tkt*-Gens in der Expressionsmutante festgestellt wurde, folgte eine Transkriptanalyse aller Gene des PPW von *P. vulgatus*. Dies sollte dazu dienen, festzustellen, ob die Überexpression des *tkt*-Gens einen Einfluss auf die restlichen Gene des PPW hat. Wie zuvor wurde die Gesamt-RNA von in DMMX exponentiell wachsenden Kulturen extrahiert und die Transkriptabundanz mittels genspezifischer Primer (Tab. 7) und RT-qPCR ermittelt. Als Referenzgen diente das für das L23 kodierende Gen *bvu_0803*. Da vorherige Transkriptanalysen nur den WT umfassten (Lück, 2023) und noch keine Daten zu der Deletionsmutante vorlagen, wurde der WT als Vergleichsstamm mit hinzugezogen.

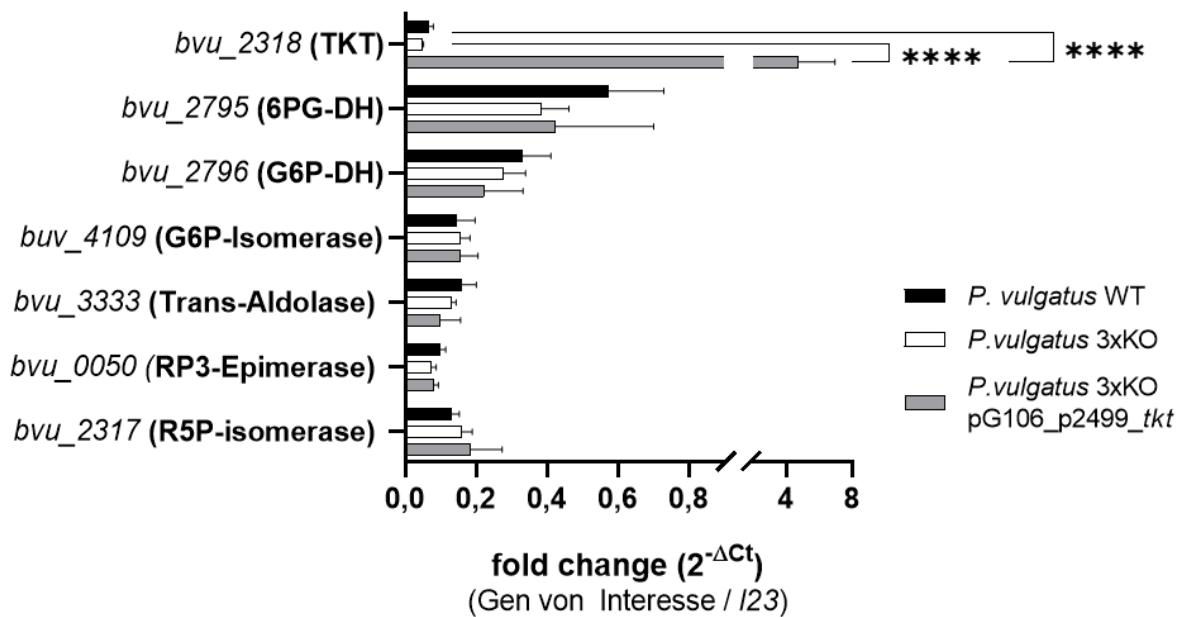


Abbildung 32: Transkriptanalyse der Gene des PPW in *P. vulgatus* WT, *P. vulgatus* 3xKO und der Expressions-Mutante *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt. Dargestellt ist die relative Transkriptmenge der Gene des PPW im Vergleich zum Referenzgen *I23*. Zur Auswertung wurde der ΔC_T zwischen dem jeweiligen Gen von Interesse und dem Referenzgen *I23* berechnet und anschließend mit der Formel $2^{-\Delta C_T}$ das Verhältnis der mRNA-Abundanz ermittelt. Die dargestellten Experimente wurden jeweils in zweifacher Ausführung aus RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt. Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe eines two-way ANOVA Testes ermittelt. Die Sternchen zeigen einen P-Wert von $< 0,0001$ an.

Die deletierten Gene spielen erst nach der Xyloseverwertung zu Phosphoenolpyruvat eine Rolle, demnach konnten den Erwartungen entsprechend keine signifikanten Unterschiede in der Transkript-Abundanz der Gene im PPW zwischen dem WT und der Deletionsmutante festgestellt werden (Abb. 32). Ähnlich wie beim WT war die Transkriptmenge des *tkt*-Gens auch bei der Deletionsmutante etwa 20-mal geringer als die des Referenzgens *I23* (Abb. 32). Zusätzlich wies das *tkt*-Gen in beiden Stämmen die geringste Transkriptmenge aller Gene des PPW auf (Abb. 32). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Expression der *tkt* der limitierende Faktor im oxidativen PPW ist. Für *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt wurde eine Transkript-Abundanz des *tkt*-Gens von 4,77 im Vergleich zum Referenzgen ermittelt (Abb. 32). Die Transkript-Abundanz des *tkt*-Gens wurde somit in der Expressionsmutante wie bereits in Abbildung 3 gezeigt signifikant erhöht. Für die restlichen Gene konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 32).

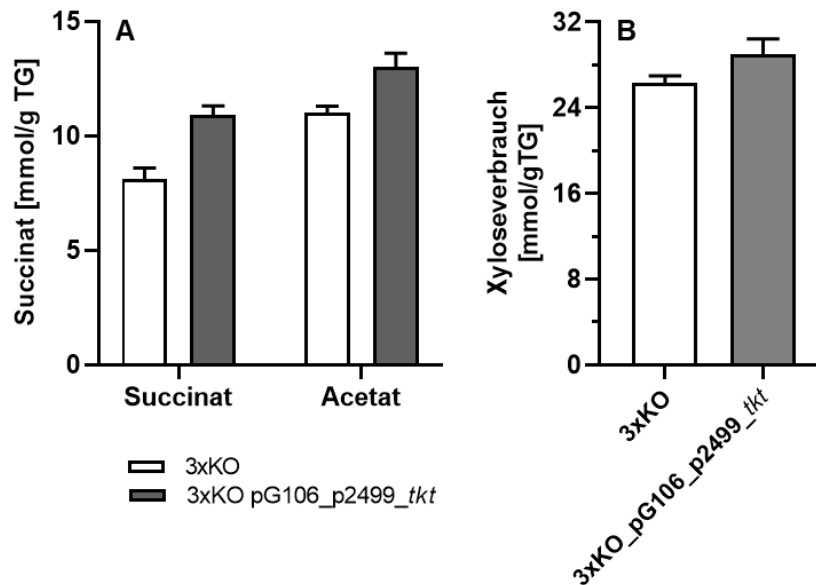


Abbildung 33: Stoffwechselendproduktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* 3xKO und *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt. Jeweils 11 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte (A) und des Substratverbrauchs (B) wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Da in früheren Studien gezeigt wurde, dass eine erhöhte Transkriptmenge von *tkt* zu einer gesteigerten Succinat-Produktion führte (Lück, 2023), wurde hier untersucht, ob der Einfluss einer größeren *tkt*-Transkriptmenge auf die Succinat-Ausbeute in der Deletionsmutante bestehen bleibt (Abb. 33). Zusätzlich wurde untersucht, wie sich die Bildung der Endprodukte im Vergleich zum WT-Stamm verhielt (Abb. 34). Zur Analyse der Stoffwechselendprodukte mittels HPLC, wurden mehrere Kulturen der drei verschiedenen Stämme in DMMX (18 mM) kultiviert. Im Vergleich zur Deletionsmutante konnte in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt eine deutliche Erhöhung der Succinat-Produktion festgestellt werden. Während bei *P. vulgatus* 3xKO $8,1 \pm 0,5$ mmol Succinat/gTG gemessen wurden, produzierte *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt $10,9 \pm 0,4$ mmol Succinat/g TG. Dementsprechend wurde die Succinat-Produktion in der Deletionsmutante durch die Überexpression von *tkt* um 35 % erhöht (Abb.33 A). Zusätzlich zu der gesteigerten Succinat-Produktion wurden geringe Unterschiede in der Acetatproduktion beobachtet. Während *P. vulgatus* 3xKO $11,0 \pm 0,29$ mmol Acetat/g TG produzierte, wurden bei der Überexpressionsmutante $13 \pm 0,6$ mmol Acetat/g TG gemessen (Abbildung 33 A). Auch hinsichtlich des Substratverbrauchs gab es geringe Unterschiede zwischen den beiden Stämmen. *P. vulgatus* 3xKO verbrauchte

26,4 ± 0,6 mmol Xylose/g TG. *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt hingegen verstoffwechselte 29,0 ± 1,4 mmol Xylose/g TG (Abb. 33 B). In Abbildung 34 wurde die Produktion der Stoffwechselendprodukte *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt mit der vom Wildtyp-Stamm verglichen. Beim Wild-Typen wurden 3,96 ± 0,14 mmol Succinat/g TG gemessen (Abb. 34). Im Vergleich zu diesem konnte die Succinat-Ausbeute durch die Überexpression von *tkf* in der Dreifach-Deletionsmutante insgesamt um 175 % gesteigert werden. Auch für die Acetatproduktion wurde eine Steigung von 9,73 ± 0,4 mmol/g TG (WT) auf 13,0 ± 0,6 mmol/g TG (*P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt) festgestellt (Abb. 34). Diese war mit 33 % allerdings im Vergleich zur erhöhten Succinat-Produktion gering. Da die Überexpressionsmutante auf dem Deletionsstamm *P. vulgatus* Δ0309-0310 Δ2499 Δ2880 basiert, waren die restlichen Endprodukte von *P. vulgatus* (Formiat, Lactat, Propionat) erwartungsgemäß in der neuen Mutante nicht zu finden (Abb. 34 B).

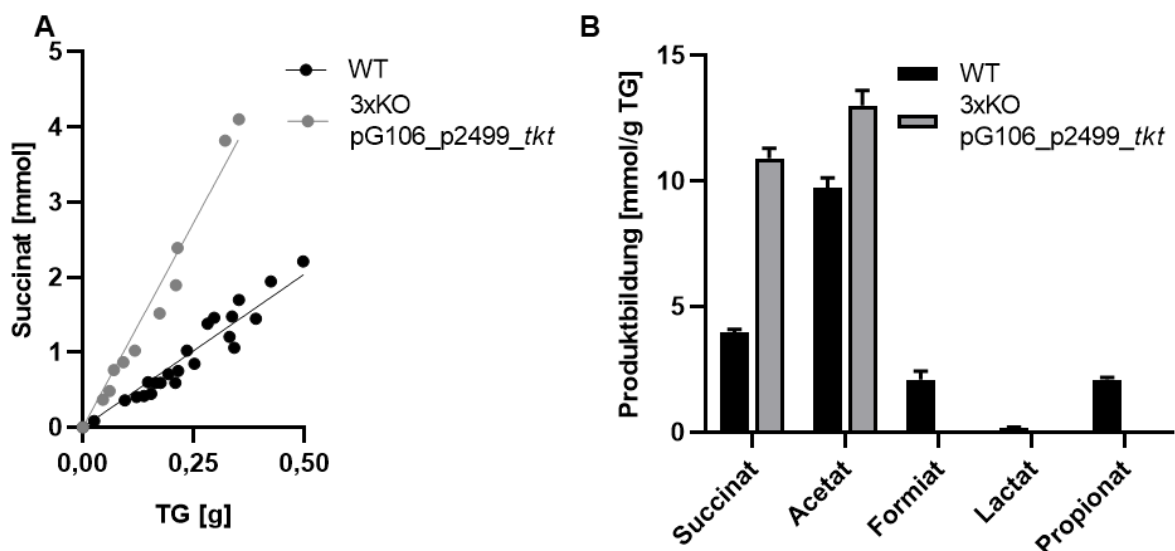


Abbildung 34: Succinat-Produktion und Stoffwechselendprodukt-Bildung von *P. vulgatus* WT und *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt. Mindestens 11 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. (A) Die Succinat-Konzentration wurde gegen das entsprechende Trockengewicht der jeweiligen Kultur aufgetragen. (B) Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass eine Überexpression des für die TKT kodierenden Gens basierend auf dem zuvor etablierten *shuttle*-Vektor pG106 auch in der Deletionsmutante möglich war und dass dies zu einer zusätzlichen Erhöhung der Succinat-Ausbeute beigetragen hat.

3.1.4.2 Homologe Überexpression des für die Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase kodierenden Gens *g6pdh*

Neben der Transketolase gibt es noch weitere Enzyme, die im PPW eine zentrale Rolle spielen. In einer früheren Studie von Lück (2023) wurde gezeigt, dass die Transkript-Abundanz der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) sowie der 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase (6PGDH) in *P. vulgaris* mit dem Substrat Xylose im Vergleich zu Glukose als Substrat deutlich erhöht war. Dies ließ vermuten, dass die beiden Gene eine wichtige Rolle in der Verstoffwechslung von Xylose einnehmen. Zusätzlich deutet die erhöhte Transkript-Abundanz darauf hin, dass Xylose als Substrat zu einer gesteigerten Expression der Gene des oxidativen PPW führt (Lück, 2023).

Dies wiederum könnte zu einem gesteigerten Kohlenstofffluss über den oxidativen Zweig des PPW beitragen und folglich mit einer gesteigerten Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von NADH, einhergehen, welche zur Succinat-Synthese eingesetzt werden könnten. Da die G6PDH (BVU_2796) das erste Enzym im oxidativen PPW ist, wurde dieses Enzym in der vorliegenden Arbeit für die Überproduktion in *P. vulgaris* 3xKO gewählt.

Hierfür wurde erneut der shuttle-Vektor pG106_p2499 mit dem natürlichen Promotor von *bvu_2499* als Template genutzt. Für die Amplifizierung des Plasmidrückgrats wurden die Primer pG106_bb_fw/rev (Tab. 7) verwendet. Um die Initiation der Transkription von *g6pdh* zu gewährleisten, wurden die Primer so gewählt, dass die Promotorsequenz von *bvu_2499* mit amplifiziert wurde. Die für die G6PDH kodierende Sequenz wurde mit Hilfe der Primer Bvu_2796_fw/rev (Tab. 35) aus der genomischen DNA von *P. vulgaris* vervielfältigt. Die Assemblierung erfolgte mit Hilfe des DNA Assembly Mastermix von NEB. Das generierte Konstrukt pG106_p2499_*g6pdh* (Abb. 35 A) wurde dann in *E. coli* NEB® 10β transferiert und vervielfältigt. Anschließend wurde das aufgereinigte Konstrukt mittels Elektroporation in *P. vulgaris* 3xKO eingebracht. Somit wurde der Stamm *P. vulgaris* 3xKO pG106_p2499_*g6pdh* generiert. Das Vorhandensein des auf dem Plasmid gelegenen Gens *g6pdh* wurde mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierfür wurden die Primer pG106_screening_fw und pG106_screening_rev (Tab. 7), welche im Plasmidrückgrat banden und die entsprechende Gensequenz flankierten, verwendet. Nach einer Gelelektrophorese wurde die erwartete Fragmentgröße von 2061 bp nachgewiesen (Abb. 35 B).

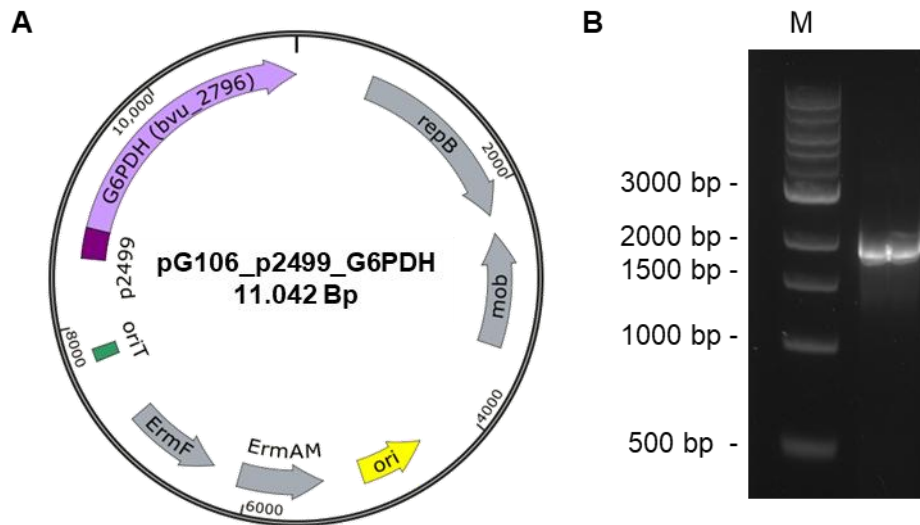


Abbildung 35: Plasmidkarte und Kolonie-PCR des erstellten Konstrukts pG106_p2499_g6pdh. (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pG106_p2499_g6pdh mit dem darauf kodierten Gen *bv_u_2796* (*g6pdh*) und der 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz der LDH. Die 5 kb große Mob-rep-Region dient als OriV (*origin of replication*) für *Bacteroides*-Spezies. Die Resistenzkassette ErmF/ErmAM dient der Selektion von *E. coli* (ErmAM) und Bacteroidaceae (ErmF). OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis des Transfers von pG106_p2499_g6pdh in *P. vulgatus* 3xKO. Die verwendeten Primer pG106_screening_fw und pG106_screening_rev binden in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (*bv_u_2796*) mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz des Gens *bv_u_2499* (p2499). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Nachdem das Plasmid pG106_p2499_g6pdh in die Deletionsmutante transferiert worden war, folgte eine Transkriptanalyse aller Gene des PPW von *P. vulgatus*. Dies diente dazu festzustellen, ob es analog zum *tkf*-Gen auch bei *g6pdh* zu einer Überexpression kam und welche Auswirkungen dies auf die Transkriptabundanz der übrigen Gene im PPW hatte. Hierfür wurde die Transkriptmenge der Gene von Interesse in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh mit denen in *P. vulgatus* 3xKO verglichen. Die Durchführung der Transkriptanalyse erfolgte wie für *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkt in Kapitel 3.1.4.1 beschrieben.

Bei der Betrachtung der Transkriptmenge im Verhältnis zum Referenzgen *l23* wurde deutlich, dass sowohl die Transkriptabundanz der G6PDH als auch der 6-Phosphogluco-Dehydrogenase (6PG-DH) in der neuen Überexpressionsmutante im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO erhöht war (Abb. 36 A). Während in der Deletionsmutante die Transkriptmenge von *g6pdh* bei $0,29 \pm 0,06$ im Vergleich zu *l23* lag, betrug sie in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh $1,79 \pm 0,01$.

Zusätzlich war auch bei der Transkriptmenge von *6pgdh* ein Anstieg von einer Transkriptmenge von $0,37 \pm 0,04$ in der Deletionsmutante auf $1,14 \pm 0,39$ in der Expressionsmutante zu beobachten (Abb. 36 A). Um den Anstieg der mRNA-Abundanz zu verdeutlichen, wurde die Transkriptmenge aller Gene aus *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* auf die jeweilige Transkriptmenge in *P. vulgatus* 3xKO normiert (Abb. 36 B). Hier wurde deutlich, dass die mRNA-Abundanz des *g6pdh*-Gens in der Expressionsmutante $7,22 \pm 0,04$ -mal so hoch war als im Ausgangsstamm. Auch die Transkript-Abundanz von *6pgdh* war in der Expressionsmutante auf das $2,73 \pm 0,94$ -fache gestiegen (Abb. 36 B). Für die restlichen Gene des PPW konnte keine eindeutige Veränderung im Vergleich zum Ausgangsstamm beobachtet werden (Abb. 36 A und B).

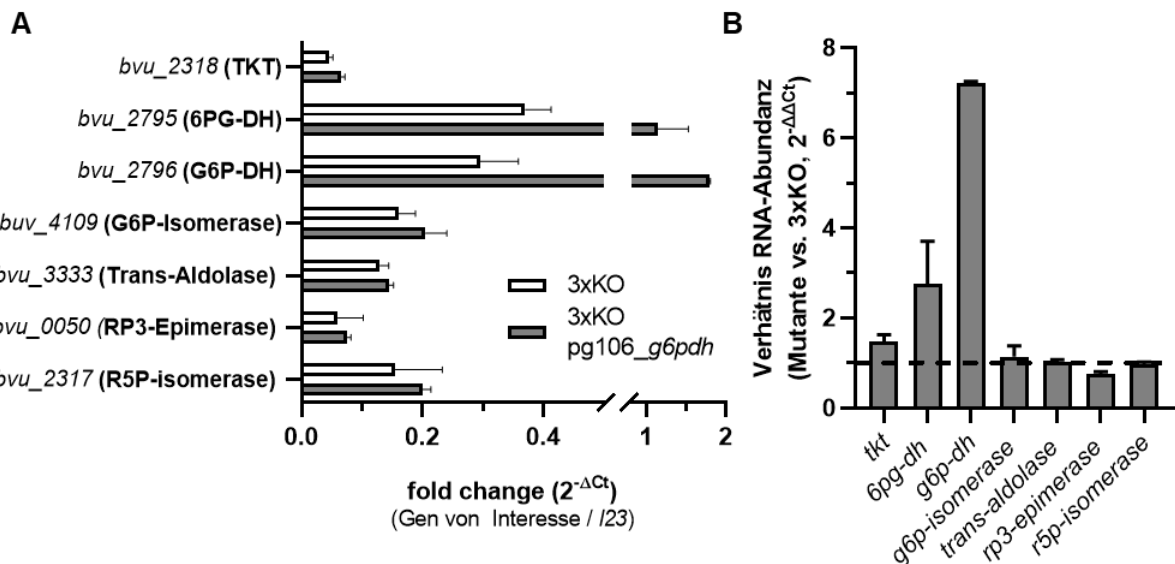


Abbildung 36: Transkriptanalyse der Gene des PPW in *P. vulgatus* 3xKO und der Expressions-Mutante *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh*. (A) Dargestellt ist die relative Transkriptmenge der Gene des PPW im Vergleich zum Referenzgen *I23*. Zur Auswertung wurde der ΔCT zwischen dem jeweiligen Gen von Interesse und dem Referenzgen *I23* berechnet und anschließend mit der Formel $2^{-\Delta CT}$ das Verhältnis der mRNA-Abundanz ermittelt. (B) Gezeigt ist die mRNA-Abundanz der Gene des PPW in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* normiert auf die des Wildtypen. Zur Berechnung wurde ausgehend von ΔCT der $\Delta\Delta CT$ -Wert bestimmt und darauf die Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ verwendet. Die dargestellten Experimente wurden jeweils in dreifacher Ausführung aus RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Um die Auswirkung der erhöhten Transkriptmenge der Gene *g6pdh* und *6pgdh* auf die Bildung der Stoffwechselendprodukte zu untersuchen, wurden diese mittels HPLC bestimmt. Hierfür wurden mehrere Kulturen in DMMX (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase die Überstände in der HPLC eingesetzt. In Abbildung 37 wurden die

gemessenen Stoffwechselendprodukte von 3xKO und der *g6pdh*-Überexpressionsmutante gegenübergestellt. In Abbildung 38 wurden die detektierten Stoffwechselendprodukte der *tkt*- und der *g6pdh*-Überexpressionsmutante (A) sowie des WT und der *g6pdh*-Überexpressionsmutante (B) miteinander verglichen.

Für die neue Mutante *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* wurde eine Succinat-Ausbeute von $11,8 \pm 0,4$ mmol/g TG erreicht. Hierbei handelt es sich im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO (8,1 mmol Succinat/g TG) um eine Steigerung von 45,7% (Abb. 37 A). Bezüglich der Acetat-Produktion wurden für die Überexpressionsmutante ($11,2 \pm 0,1$ mmol/g TG) und für den Ausgangsstamm ($11,0 \pm 0,29$ mmol/g TG) vergleichbare Werte gemessen (Abb. 37 A). Auffällig war außerdem dass in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* ein Succinat : Acetat Verhältnis von 1:1 bestand (Abb. 37 A).

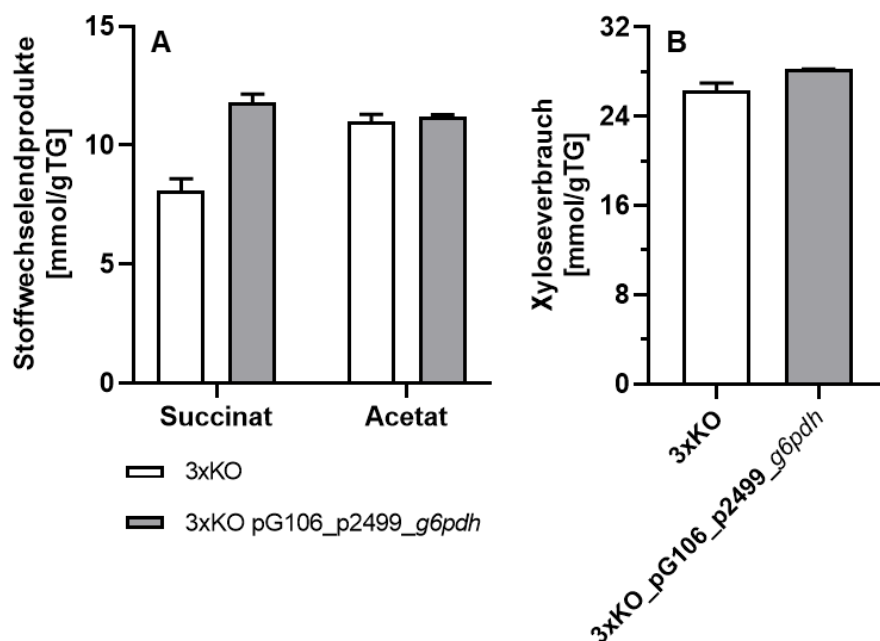


Abbildung 37: Stoffwechselendproduktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* 3xKO und *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh*. Jeweils 11 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte (A) und des Substratverbrauchs (B) wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Hinsichtlich des Substratverbrauchs hatte die erhöhte Transkriptmenge der Gene *g6pdh* und *6pgdh* einen geringen Einfluss. Für *P. vulgatus* 3xKO lag der Xyloseverbrauch bei

26,4 ± 0,6 mmol/g TG, während er in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* mit 28,2 ± 0,04 leicht anstieg (Abb. 37 B).

Im Vergleich zur *tkf*-Expressionmutante (10,9 ± 0,4 mmol Succinat/g TG) wurde in der *g6pdh*-Expressionmutante zusätzlich ein geringer Anstieg in der Succinat-Ausbeute festgestellt (11,8 ± 0,4 mmol Succinat/g TG). Die Bildung von Acetat war bei der neuen Mutante mit 11,2 mmol/g TG geringer als bei der *tkf*-Expressionsmutante (13,4 ± 0,8 mmol/g TG) (Abb. 38 A). Da der WT 3,96 ± 0,14 mmol Succinat /gTG produzierte, wurde mit der *g6pdh*-Expressionmutante das 3-fache an Ausbeute erzielt. Die Acetatproduktion (11,2 ± 0,1 mmol/g TG) war im Vergleich zum WT (9,7 ± 0,4 mmol Acetat/g TG) insgesamt 15 % höher. Durch die Überexpression des Gens der G6PDH in der Dreifachdeletionsmutante ist es gelungen das Succinat : Acetat Verhältnis von 0,4:1 (WT) auf 1:1 zu verschieben (Abb. 38 B). Da die Expressionsmutante auf dem Deletionsstamm basiert, wurden den Erwartungen entsprechend keine weiteren Stoffwechselendprodukte detektiert (Abb. 38 B).

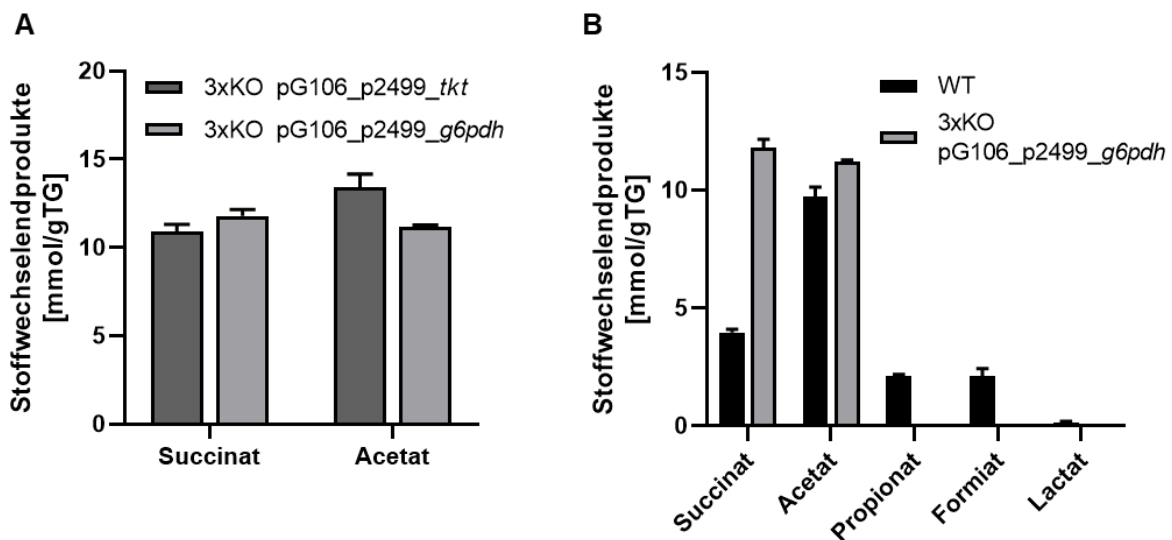


Abbildung 38: Stoffwechselendproduktbildung von verschiedenen *P. vulgatus* Stämmen. (A) Vergleich der Konzentrationen an Stoffwechselendprodukten zwischen *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *tkf* und *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh*. (B) Produktbildung von *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* im Vergleich zum WT. Für beide Experimente wurden 11 Kulturen der jeweiligen Stämme auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur konnte mittels HPLC analysiert werden. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

3.1.4.3 Parallele, homologe Überexpression der für die TKT und G6PDH kodierenden Gene

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass die Überexpression der für die TKT sowie für die G6PDH kodierenden Gene über den shuttle Vektor pG106 jeweils zu einer höheren Succinat-Ausbeute geführt haben (Kapitel 3.1.4.1 und 3.1.4.2). Daher wurde beschlossen die Überexpression beider Gene zu kombinieren. Ziel war es dadurch den Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgaris* 3xKO noch weiter in Richtung Succinat-Bildung zu lenken. Hierfür sollten beide Gene auf dem gleichen Vektor vorliegen. Um eine Expression beider Gene zu gewährleisten, sollte jeweils jedes Gen stromaufwärts über eine eigene Sequenz für den natürlichen Promotor der LDH verfügen (Abb. 39 A). Als Grundlage für das Plasmidrückgrat dienten daher der shuttle-Vektor pG106_p2499_tkt.

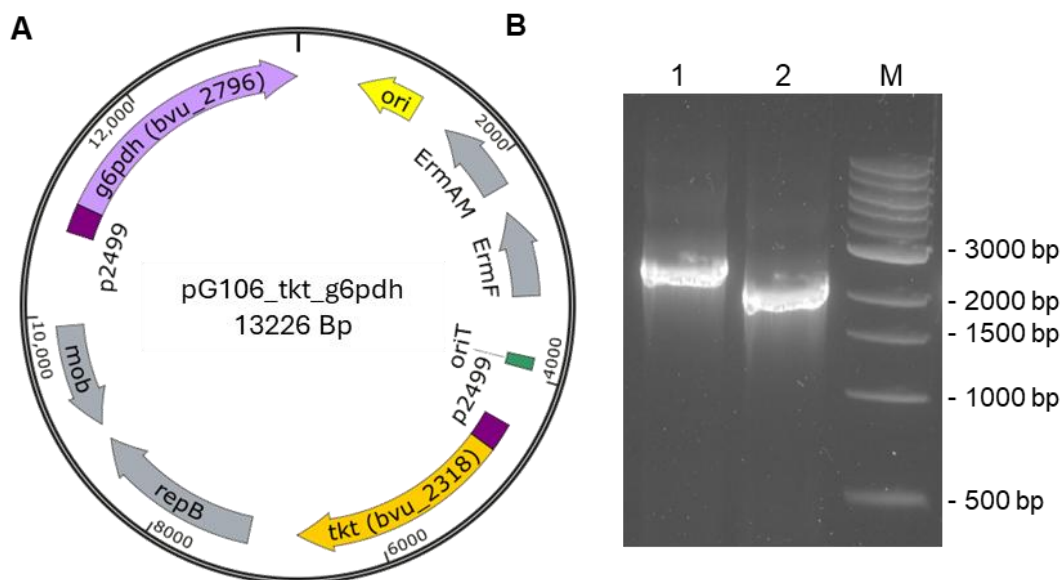


Abbildung 39: Plasmidkarte und Kolonie-PCR des erstellten Konstrukts pG106_tkt_g6pdh. (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pG106_p2499_tkt_p2499_g6pdh mit den darauf kodierten Genen *bv_u_2318* (*tkt*) und *bv_u_2796* (*g6pdh*). Stromaufwärts beider Gene liegt die 250 bp Promotorsequenz der LDH (p2499). Die 5 kb große Mob-rep-Region dient als OriV (*origin of replication*) für *Bacteroides*-Spezies. Die Resistenzkassette ErmF-ErmAM dient der Selektion von *E. coli* (ErmAM) und *Bacteroidaceae* (ErmF). OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis des Transfers von pG106_p2499_tkt_p2499_g6pdh in *P. vulgaris* Δ0309-0310 Δ2499 Δ2880. Die verwendeten Primerpaare scr_tkt_fw und scr_tkt_rev sowie scr_g6pdh_fw und scr_g6pdh_rev binden jeweils in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz der TKT (*bv_u_2318*) beziehungsweise der G6PDH (*bv_u_2796*) mit 250 bp stromaufwärts gelegener Promotorsequenz des Gens *bv_u_2499* (p2499). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Das Plasmidrückgrat wurde mit Hilfe der Primer BB_pG106_fw und BB_pG106_rev (Tab 7) amplifiziert. Mittels der Primer AS_G6PDH_fw und AS_G6PDH_rev wurde die für die *g6pdh* kodierende Sequenz (*bvu_2976*) einschließlich des stromaufwärtsliegenden Promotors p2499 aus dem Vektor pG106_p2499_*g6pdh* amplifiziert. Die Assemblierung erfolgte mit Hilfe des DNA Assembly Mastermix von NEB®. Das generierte Konstrukt pG106_*tkt_g6pdh* (Abb. 39 A) wurde dann in *E. coli* NEB® 10β transferiert und vervielfältigt. Anschließend wurde das aufgereinigte Konstrukt mittels Elektroporation in *P. vulgaris* 3xKO eingebracht und die Doppel-Überexpressionsmutante *P. vulgaris* 3xKO pG106_*tkt_g6pdh* generiert.

Das Vorhandensein der auf dem Plasmid gelegenen Gene *tkt* und *g6pdh* wurden mittels Kolonie-PCR überprüft. Hierfür wurden die Primerpaare scr_*tkt_fw* und scr_*tkt_rev* sowie scr_*g6pdh_fw* und scr_*g6pdh_rev* (Tab. 7), welche jeweils im Plasmidrückgrat banden und die entsprechende Gensequenz flankierten, verwendet. Nach einer Gelelektrophorese konnten die erwarteten Fragmentgrößen 2634bp für *tkt* und 2237 bp für *g6pdh* (Abb. 39 B) nachgewiesen werden. Nach dem Transfer des Plasmids pG106_*tkt_g6pdh* in *P. vulgaris* 3xKO erfolgte erneut eine Transkriptanalyse aller Gene des PPW.

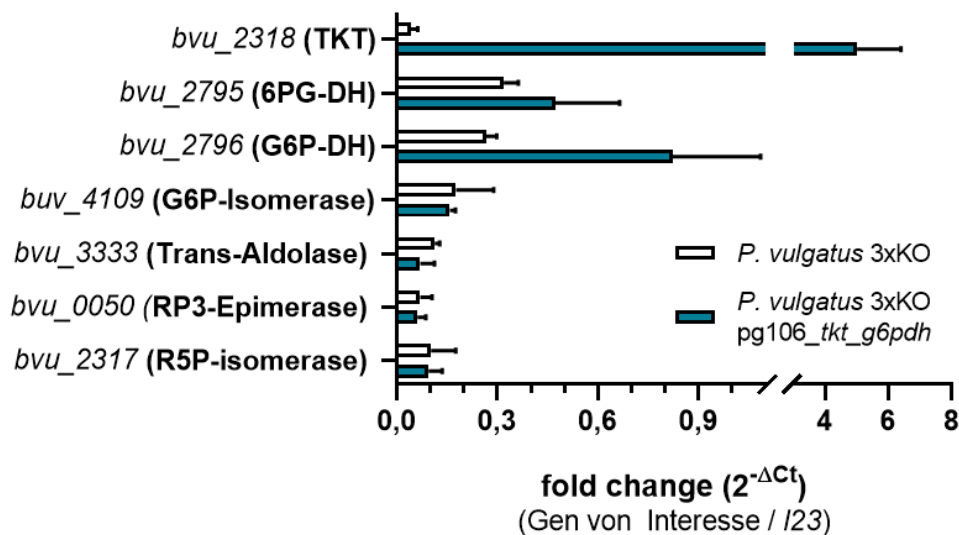


Abbildung 40: Transkriptanalyse der Gene des PPW *P. vulgaris* 3xKO und der Expressions-Mutante *P. vulgaris* 3xKO pG106_*tkt_g6pdh*. Dargestellt ist die relative Transkriptmenge der Gene des PPW im Vergleich zum Referenzgen *I23*. Zur Auswertung wurde der ΔC_t zwischen dem jeweiligen Gen von Interesse und dem Referenzgen *I23* berechnet und anschließend mit der Formel $2^{-\Delta C_t}$ das Verhältnis der mRNA-Abundanz ermittelt. Die dargestellten Experimente wurden jeweils in zweifacher Ausführung aus RNA-Präparaten aus zwei verschiedenen Kulturen durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Erwartungsgemäß wies *P. vulgatus* 3xKO pG106_ *tkt_g6pdh* im Vergleich zum Ausgangsstamm eine erhöhte mRNA-Abundanz der *tkt* auf. Diese wurde durch das Einbringen des Plasmids von $0,04 \pm 0,02$ im Vergleich zu *l23* auf $5,02 \pm 1,38$ erhöht (Abb. 40). Auch die Transkriptmenge von *g6pdh* war mit einer Abundanz von $0,83 \pm 0,26$ (im Vergleich zu *l23*) in der Doppel-Überexpressionsmutante deutlich höher als in *P. vulgatus* 3xKO ($0,27 \pm 0,03$) (Abb. 40). Diese Ergebnisse belegen somit, dass die parallele Überexpression der Gene *tkt* und *g6pdh* möglich war.

Zur Analyse der Auswirkung der erhöhte Transkriptmenge beider Gene auf die Succinat-Ausbeute folgte eine HPLC-Analyse der Überstände von 11 auf DMMX gewachsenen Kulturen der neuen Mutante.

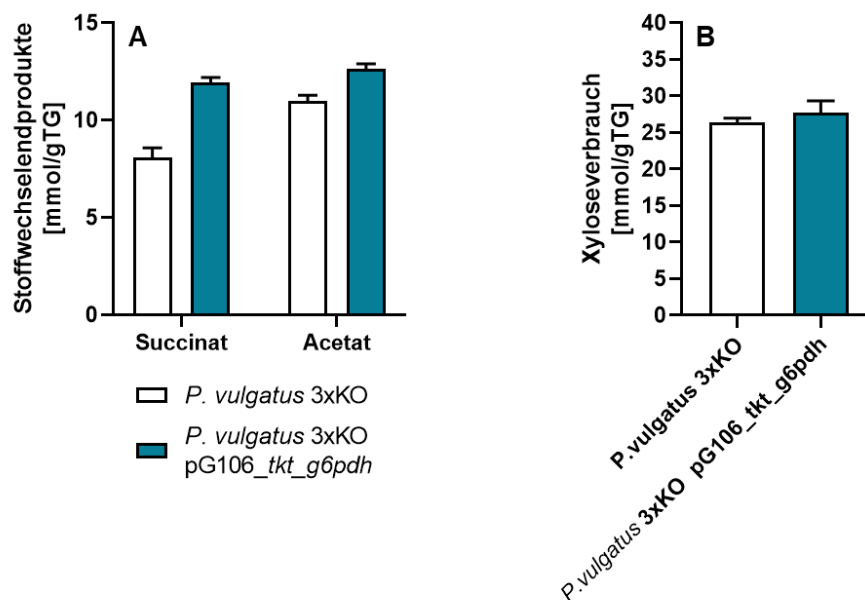


Abbildung 41: Stoffwechselendproduktbildung und Substratverbrauch von *P. vulgatus* 3xKO und *P. vulgatus* 3xKO pG106_ *tkt_g6pdh*. Jeweils 11 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. Die Konzentrationen der Stoffwechselendprodukte (A) und des Substratverbrauchs (B) wurden mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen korreliert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Wie zu erwarten, wurden bei der neuen Expressionsmutante nur die beiden Stoffwechselendprodukte Succinat und Acetat gemessen. *P. vulgatus* 3xKO pG106_ *tkt_g6pdh* produzierte $11,94 \pm 0,26$ mmol Succinat/g TG (Abbildung 41 A). Im Vergleich zum Ausgangsstamm *P. vulgatus* 3xKO war dies ein Anstieg von fast 50 %. In Bezug auf den Xyloseverbrauch war kein nennenswerter Unterschied zwischen der Deletionsmutante

($26,4 \pm 0,6$ mmol Xylose/g TG) und der Doppel-Überexpressionsmutante ($27,7 \pm 1,65$ mmol Xylose/g TG) zu beobachten (Abb. 41 B).

Zum Vergleich der drei erzeugten Expressionsmutanten mit *P. vulgatus* 3xKO wurden die Succinat und Acetat Erträge in % dargestellt. Der Ausgangsstamm *P. vulgatus* 3xKO wurde hierbei auf 100 % gesetzt (Abb. 42). Ausgehend von einer 100 %-igen Succinat-Produktion in *P. vulgatus* 3xKO, führte die Überexpression der *tkl* zu einem Ertrag von $135,4 \pm 13,3$ % (Abb. 42). Die Überexpression der *g6pdh* führte zu einer noch deutlicheren Steigerung der Succinat-Produktion mit $146,4 \pm 13,6$ %. Auch für die parallele Überexpression der *tkl* und der *g6pdh* konnte eine Erhöhung der Succinat-Produktion erreicht werden. Dieser Stamm produzierte $148,2 \pm 12,4$ % Succinat (Abb. 42). Insgesamt konnte im Vergleich zum Ausgangsstamm eine Steigerung der Succinat-Ausbeute um rund 50 % erreicht werden.

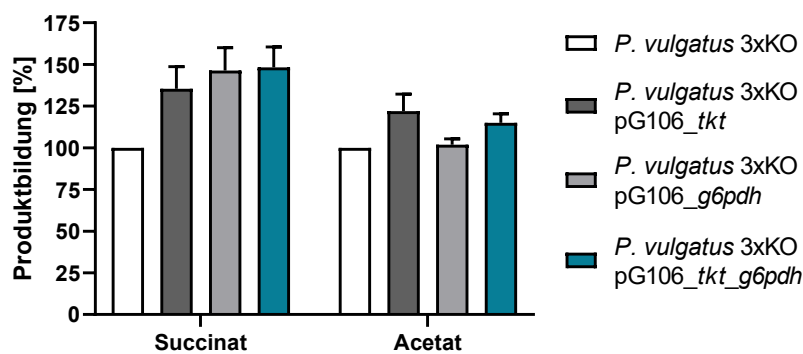


Abbildung 42: Prozentuale Bildung von Succinat und Acetat der drei Expressionsmutanten *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkl, *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh und *P. vulgatus* 3xKO pG106_tkl_g6pdh im Vergleich zum Ausgangsstamm *P. vulgatus* 3xKO. Die gemessenen Succinat und Acetatausbeuten wurden auf *P. vulgatus* 3xKO normiert und in % dargestellt. Hierbei wurde der jeweilige Ertrag von *P. vulgatus* 3xKO auf 100 % festgelegt.

Hinsichtlich der Acetatproduktion waren ebenfalls Unterschiede zwischen den einzelnen Stämmen zu erkennen (Abbildung 42). So wurden für *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_tkl $135,4 \pm 13,3$ % Acetat detektiert. Die Überexpression des Gens *g6pdh* hingegen hatte keinen Einfluss auf die Acetatproduktion. Hier lag der Ertrag bei $101,8 \pm 3,5$ %. Durch die Kombination von *tkl* und *g6pdh* auf dem shuttle-Vektor pG106 im Stamm *P. vulgatus* 3xKO pG106_tkl_g6pdh wurde die Acetatproduktion auf $115,1 \pm 5,4$ % erhöht (Abbildung 42).

Im Vergleich zum WT-Stamm ($3,96 \pm 0,1$ mmol /g TG) produzierte *P. vulgatus* 3xKO pG106_tkt_g6pdh ($11,94 \pm 0,26$ mmol/g TG) die 3-fache Menge an Succinat (Abbildung 43). Setzt man die Succinat-Produktion des WT-Stamm auf 100 % so liegt die Succinat-Ausbeute von *P. vulgatus* 3xKO pG106_tkt_g6pdh bei 300 %. Somit konnte die Succinat-Produktion durch den neu generierten Stamm im Vergleich zum WT um 200 % gesteigert werden.

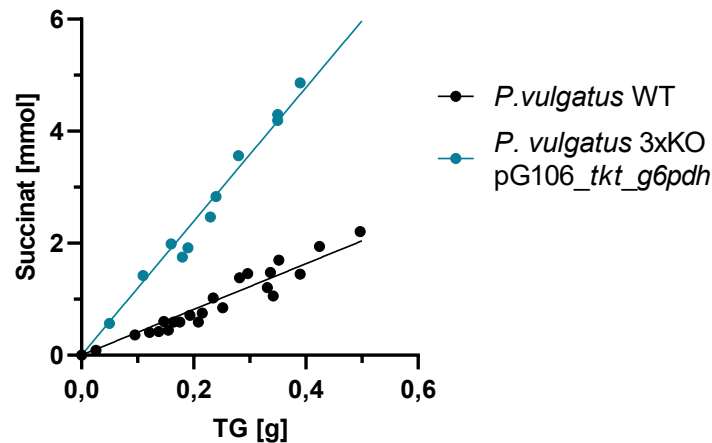


Abbildung 43: Succinat-Produktion in *P. vulgatus* WT und *P. vulgatus* 3xKO pG106_tkt_g6pdh. Mindestens 11 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. Die Succinat-Konzentration wurde gegen das entsprechende Trockengewicht der jeweiligen Kultur aufgetragen.

Die Untersuchung der Stoffwechselendprodukte zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der erhöhten *tkt*-Expression und einer gesteigerten Acetat-Produktion. Da die entsprechenden Stämme keine Pyruvat:Formiat-Lyase mehr besaßen, konnte die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA nur noch über die Pyruvat:Ferredoxin- Oxidoreduktase erfolgen. Dies führt zur Bildung von Reduktionsäquivalenten in Form von Fd_{red} sowie zur Freisetzung von CO_2 . Überschüssiges Fd_{red} kann durch die im Genom von *P. vulgatus* kodierten [FeFe]-Hydrogenase (BVU_0347) zur Bildung von molekularem Wasserstoff (H_2) genutzt werden. Aufgrund dessen wurde im Folgenden der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die erhöhte Acetat-Produktion mit einer vermehrten Bildung an H_2 einhergeht.

Hierfür wurden alle Stämme in DMMX kultiviert. Während der exponentiellen Phase wurde die gebildete Gasphase entnommen und mittels Gaschromatographen analysiert. Die genaue Durchführung und Berechnung sind in Kapitel 2.6.2 beschrieben.

Die Untersuchung mittels Gaschromatographen ergab, dass die gebildete H₂-Konzentration in den Stämmen mit einem zusätzlich plasmidkodierten *tkt* Gen höher war als in den Stämmen, welche die *tkt* nur chromosomal kodierten (Abb. 44). Während bei *P. vulgaris* 3xKO pG106_p2499_ *tkt* und *P. vulgaris* 3xKO pG106_ *tkt_g6pdh* $5,08 \pm 0,76$ mmol H₂/g TG beziehungsweise $4,92 \pm 0,74$ mmol H₂/g TG gemessen wurden, bildeten *P. vulgaris* 3xKO und *P. vulgaris* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* jeweils $3,79 \pm 0,32$ beziehungsweise $3,86 \pm 0,97$ mmol H₂/g TG (Abb. 44).

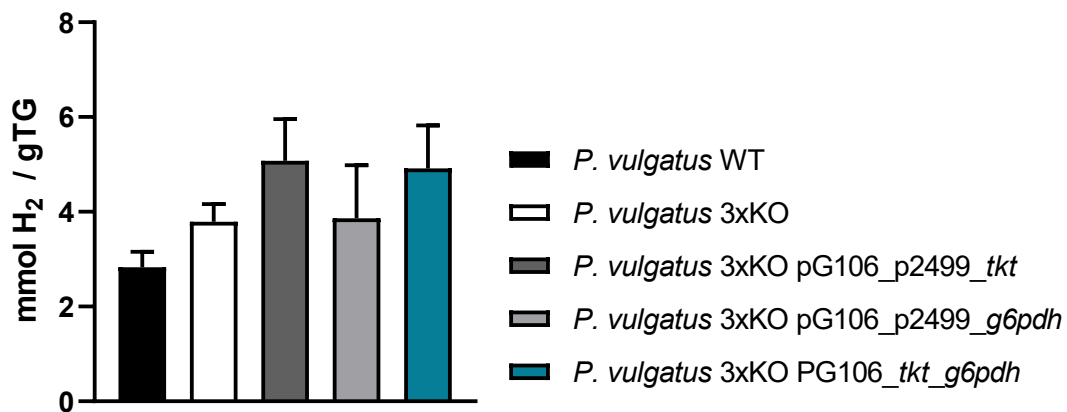


Abbildung 44: Wasserstoffbildung von *P. vulgaris* WT, *P. vulgaris* 3xKO, *P. vulgaris* 3xKO pG106_p2499_ *tkt*, *P. vulgaris* 3xKO pG106_p2499_ *g6pdh* und *P. vulgaris* 3xKO pG106_ *tkt_g6pdh*. Jeweils vier Kulturen von jedem Stamm wurden auf DMMX-Medium kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurde die gebildete Gasphase aufgefangen. Hiervon wurden 100 µl mittels Gaschromatograph analysiert. Die gemessenen Werte wurden mit dem Gesamtvolumen der Gasphase und mit dem Trockengewicht der entsprechenden Kulturen verrechnet.

Zusammenfassend wurde in Kapitel 3.1.4 gezeigt, dass eine Überexpression der *tkt* wie im WT auch in der Triple-Deletionsmutante zu einer erhöhten Succinat-Produktion führte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass das Enzym G6PDH des oxidativen PPW sich noch besser für eine Überexpression eignete, da dies nicht nur eine 46 %-ige Erhöhung der Succinat-Ausbeute im Vergleich zu *P. vulgaris* 3xKO ermöglichte, sondern auch zum ersten Mal ein 1:1 Verhältnis in den Endprodukten Succinat und Acetat festgestellt wurde. Des Weiteren wurden zum ersten Mal in *P. vulgaris* zwei Gene parallel über einen Vektor homolog exprimiert. Auffällig war zudem die erhöhte Acetat-Produktion in der *tkt*- nicht aber in der *g6pdh*-Mutante sowie die Korrelation zwischen der erhöhten Acetat- und H₂-Produktion.

3.1.5 Succinat-Produktion durch *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh im anaeroben Kleinfermenter

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass die gemeinsame Überexpression der Gene *tkt* und der *gpdh* zu einem Succinatertrag von $11,94 \pm 0,26$ mmol/g TG geführt hat (Kapitel 3.1.4). Im Vergleich dazu hatte die Mutante mit der *g6pdh* Überexpression eine fast identisch hohe Ausbeute ($11,8 \pm 0,37$ mmol Succinat/ g TG). In Bezug auf Acetat war die Konzentration bei *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh allerdings deutlich geringer als bei *P. vulgatus* 3xKO pG106_tkt_g6pdh. Da für die Succinat-Produktion Nebenprodukte unerwünscht sind, bot sich *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh als der bessere Produktionsstamm an. Aufgrund dessen wurde *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh für weitere Untersuchungen gewählt.

In den bisherigen Experimenten erreichte *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh in der Serumflasche nur maximal eine OD von 1,8. Die maximale Succinat-Konzentration lag hier bei 8,33 mmol/L Kultur. Verrechnet man diese mit dem Molekulargewicht von Succinat (118,09 g/mol) so erreicht man einen maximalen Ertrag von 1 g Succinat/L Kultur.

Um diesen Ertrag zu erhöhen, wurde *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh als Fed-Batch-Fermentation in einem anaeroben Kleinfermenter kultiviert. Der Vorteil hierin lag, dass sowohl mit Substrat nachgefüttert werden konnte als auch durch Titration mit KOH die Ansäuerung des Mediums durch die Fermentationsprodukte Succinat und Acetat verringert werden konnte. Zur Gewährleistung der anaeroben Wachstumsbedingungen, wurde der Versuch mit dem Kleinfermenter im anaeroben Zelt durchgeführt. Das Wachstum erfolgte auf DMMX mit einer Ausgangskonzentration von 36 mM Xylose. Bei Bedarf wurde mit Substrat und Zusätzen (Spurenelementen) nachgefüttert (Abb. 45 ↓). Die Neutralisierung mittels OH⁻-Ionen des sich ansäuernden Mediums erfolgte voll-automatisch mit Hilfe einer pH-Sonde und einer Pumpe. Die genauere Durchführung ist in Kapitel 2.3.2.1 (Material und Methoden) beschrieben.

Zur Verfolgung des Zellwachstums und der Endproduktbildung wurden mit Hilfe einer Spritze einige Milliliter der Zellsuspension entnommen, die OD gemessen und die Konzentration von Substrat und Endprodukten aus den Zellüberständen mittels HPLC bestimmt (Abb. 45).

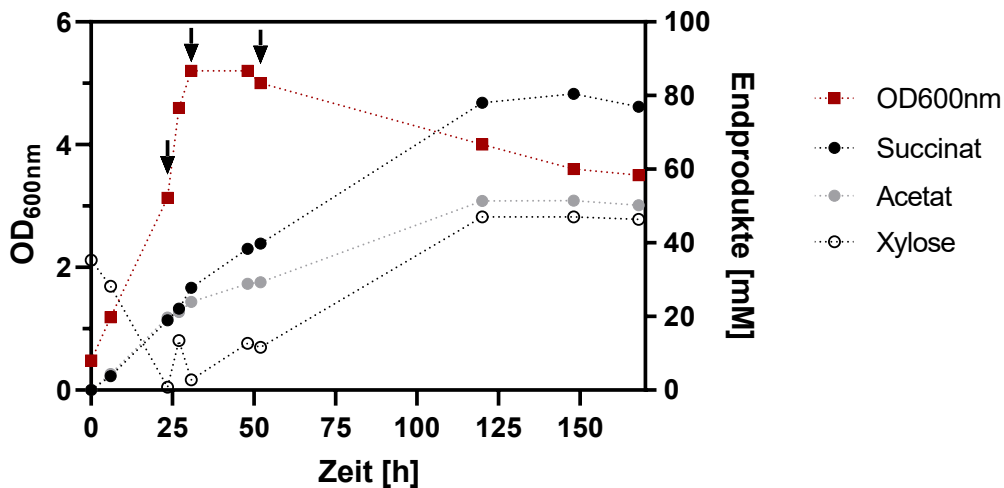


Abbildung 45: Wachstum sowie Substratverbrauch und Produktbildung von *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh während der fed-batch-Fermentation im anaeroben Kleinfermenter. Die OD_{600nm} (■) ist auf der linken Y-Achse und die Konzentration des Substrates (○: Xylose) sowie der Endprodukte Succinat (●) und Acetat (●) auf der rechten Y-Achse aufgetragen. Die entsprechenden Konzentrationen wurden mittels HPLC bestimmt. Die Zeitpunkte der Nachfütterung (beiden ersten Male 36 mM, drittes Mal 60 mM Xylose) sind durch Pfeile (↓) gekennzeichnet.

Der Wachstumsverlauf zeigt einen sehr schnellen Anstieg der optischen Dichte innerhalb der ersten 24 h (Abb. 45). In dieser Zeit wurde auch die gesamte ursprüngliche Menge von 36 mM Xylose verbraucht. Daher wurde zu diesem Zeitpunkt mit 36 mM Xylose nachgefüttert (Abb. 45, ↓). Anschließend konnte ein erneuter starker Wachstumsanstieg beobachtet werden. Die maximale OD_{600nm} von 5,2 wurde bereits nach 30 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt betrug die verbleibende Substratmenge nur noch 2,8 mM, weswegen erneut mit 36 mM Xylose nachgefüttert wurde. Der Substratverbrauch verlangsamte sich anschließend drastisch, weshalb nach 50 h ein letztes Mal mit 60 mM Xylose nachgefüttert wurde (Abb. 45). Der Verlauf der Produktbildung kann in zwei Phasen unterteilt werden. In einer ersten Phase wurden Succinat und Acetat in einem 1:1 Verhältnis produziert. Dies entspricht den Beobachtungen in der Serumflasche. Nach 30 h verschob sich dieses Verhältnis allerdings in Richtung Succinat (Abb. 45) und lag am Ende der Fermentation bei 1,6:1. Bemerkenswerterweise erfolgte die Umstellung des Kohlenstoffflusses ab dem Erreichen der stationären Wachstumsphase. Nach 125 h konnte weder ein Substratverbrauch noch eine Produktbildung beobachtet werden. Im Verlauf der gesamten Fermentation verbrauchte *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh 120 mM Xylose und produzierte 80,4 mM Succinat sowie 51,4 mM Acetat (Abb. 45). Dies entsprach einer Menge von 10 g/L Succinat.

Zusammenfassend ergaben die Daten aus Kapitel 3.1.5 dass die Succinat-Ausbeute durch *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh im Fermenter 10-mal höher war als in der Serumflasche. Trotz bisher nicht optimierten Bedingungen, konnten durch die Fed-batch-Fermentation 10 g/L Succinat produziert werden.

3.2 Übertragung der genetischen Werkzeuge aus *P. vulgatus* auf weitere Stämme der Familie Bacteroidaceae

3.2.1 Screening nach geeigneten Organismen

3.2.1.1 Xylanverwertung durch verschiedene Vertreter der Bacteroidaceae

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war die Übertragung, der für *P. vulgatus* angepassten genetischen Systeme auf weitere Spezies der Gattung *Bacteroides*. Diese Untersuchung sollte ebenfalls mit Hinblick auf eine biotechnologische Succinat-Produktion aus erneuerbaren Ressourcen stattfinden. Da einer Vielzahl an *Bacteroides*-Spezies die Eigenschaft zur Verstoffwechslung von komplexen Polysacchariden zugeschrieben wird (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012) sollte in einem ersten Schritt ermittelt werden, welche Vertreter der Familie Bacteroidaceae sich für eine Succinat-Produktion durch Xylan-Verwertung eignen. Hierfür wurden 5 Stämme der Gattungen *Bacteroides* (*B. cellulosilyticus*, *B. xylanisolvens*, *B. intestinalis* und *B. graminisolvens*) sowie ein Vertreter der Gattung *Phocaeicola* (*P. dorei*) getestet (Abb. 46). Diese Stämme produzieren alle Succinat als Bestandteil der Stoffwechselendprodukte (persönliche Mitteilung Hager N.). Als Referenz-Stamm wurde *P. vulgatus* verwendet. Alle Stämme wurden in Minimalmedium (DMM) mit 0,5 % Buchen-Xylan inkubiert. Als Kontrolle wurde ebenfalls eine Inkubationsreihe mit 27 mM Glukose als Substrat angesetzt. Das Wachstum erfolgte in einer 48-Well-Platte unter anaeroben Bedingungen bei 37°C. Die OD_{600nm} wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite

200Pro, Männedorf, Schweiz) alle 20 Minuten bestimmt und gegen die Zeit aufgetragen (Abb. 46).

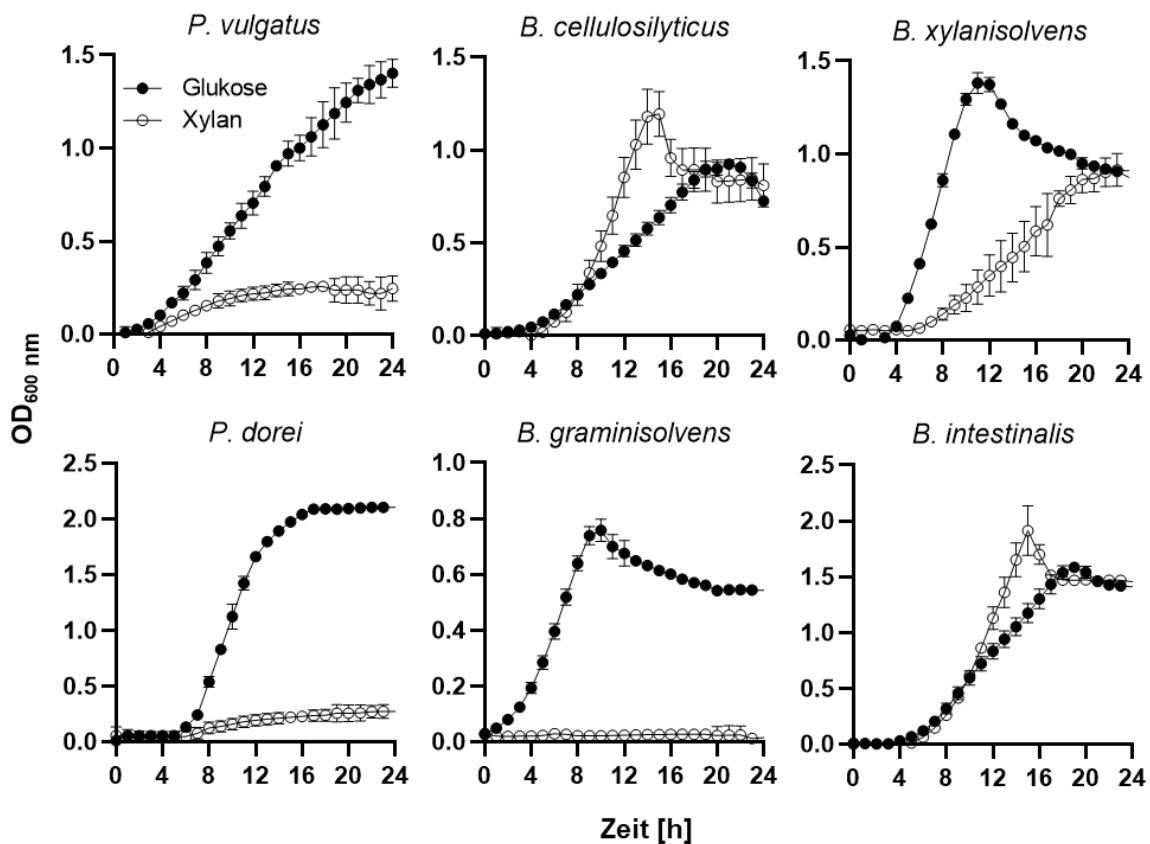


Abbildung 46: Wachstum verschiedener Vertreter der Familie Bacteroidaceae auf Buchen-Xylan. Alle Stämme wurden auf Minimalmedium (DMM) mit 0,5 % (w/v) Xylan aus der Buche angeimpft. Als Wachstumskontrolle erfolgte jeweils zusätzlich eine Inkubation mit 27 mM Glukose als Substrat. Die Inkubation erfolgte in einer 48-Well Platte, unter anaeroben Bedingungen bei 37°C. Mittels Plattenlesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) wurde alle 20 Minuten die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm (OD_{600nm}) gemessen und gegen die Zeit aufgetragen. Alle Experimente wurden in dreifacher Durchführung ausgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Aus den Wachstumskurven war zu erkennen, dass nicht alle getesteten Stämme in der Lage waren, Xylan aus der Buche als Substrat zu nutzen. *B. cellulosilyticus* konnte das Buchen-Xylan sehr gut verwerten und erreichte bereits nach 15 h eine maximale OD von 1,2 was leicht höher war als die Glucose-Kontrolle bei einer OD von 0,9 nach 20 h. Eine Verstoffwechslung von Buchen-Xylan konnte ebenfalls bei *B. xylanisolvens* beobachtet werden (OD 1 nach 20 h) (Abb. 46). *P. dorei* erreichte ähnlich wie *P. vulgatus* auf Xylan eine OD von 0,3 aber im Vergleich zu Glucose als Substrat (OD 2,1) war diese 7-mal geringer. *B. graminisolvens* erreichte auf

Glucose eine maximale OD von 0,8, mit Xylan als Substrat war hingegen gar kein Wachstum zu sehen. *B. intestinalis* wies ein ähnliches Wachstumsverhalten auf wie *B. cellulosilyticus* mit einer maximalen OD von 1,9 nach 16 h auf Xylose und einer OD von 1,6 nach 19 h auf Glucose.

Zusammenfassend wurden mit *B. cellulosilyticus*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens* zusätzlich zu *P. vulgatus* drei weitere Xylan-abbauende Vertreter aus der Familie der Bacteroidaceae identifiziert, die zudem ein verbessertes Wachstum auf dem Substrat aufwiesen.

3.2.1.2 Antibiotogramm von *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens*

Um festzustellen, ob sich *B. cellulosilyticus*, *B. xylanisolvens* und *B. intestinalis* ebenfalls für eine biotechnologische Herstellung von Succinat eignen, musste jedoch zunächst geprüft werden, ob die bisherigen an *P. vulgatus* angepassten genetische Werkzeuge auf diese Stämme übertragbar sind. Sowohl die Erstellung der Überexpressionsmutanten sowie die Bildung der Deletionsstämme beinhalten eine Selektion über Resistenzmarker. Um sicher zu gehen, dass die entsprechenden Vektoren in den jeweiligen Stämmen Anwendung finden können, wurde von *B. cellulosilyticus*, *B. xylanisolvens* und *B. intestinalis* ein Antibiotogramm erstellt (Abb. 47 und Tab. 26). *P. vulgatus* wurde zusätzlich als Referenz-Stamm untersucht. Zur Analyse der Sensitivität der Organismen gegenüber verschiedenen Antibiotika wurde ein angepasster Kirby-Bauer-Agardiffusionstest (Biemer, 1973) durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Stämme aus einer angewachsenen Kultur ebenflächig auf BHI-Agar-Platten verteilt. Anschließend wurden in Antibiotika getränkte Diffusionsplättchen auf die Agar-Platten gegeben. Die Inkubation der Platten erfolgte für 24 h bei 37°C. Zur Auswertung wurden die Hemmhofdurchmesser bestimmt. Diese sind in Tabelle 26 zusammengefasst. Zur vereinfachten Darstellung wurden die Ergebnisse zusätzlich in Abbildung 47 dargestellt.

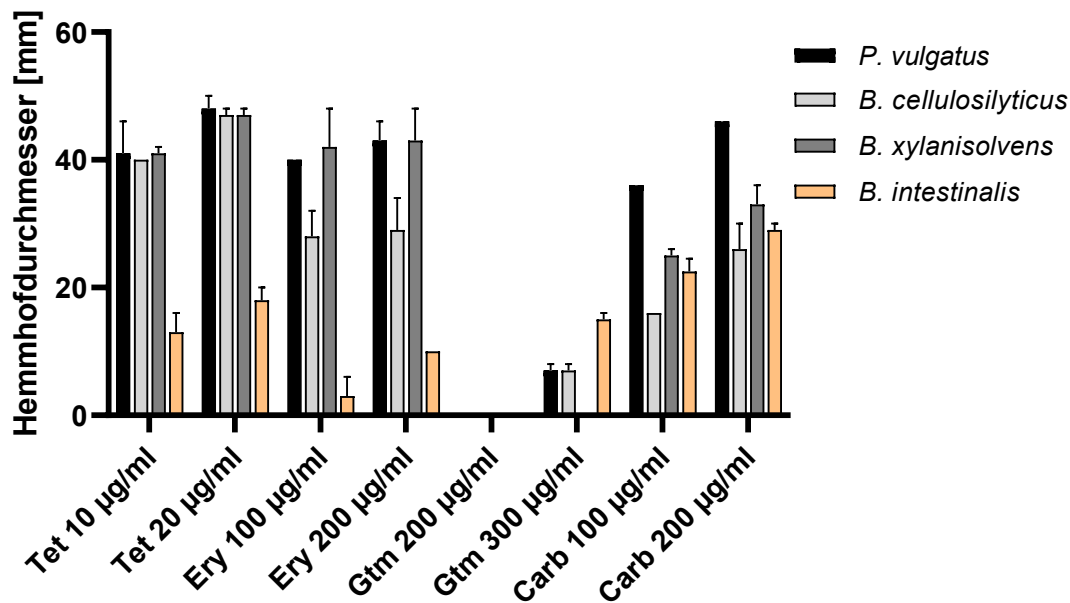


Abbildung 47: Antibiogramm von *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus*, *B. intestinalis* und *B. Xylanisolvens*. Dargestellt sind die Hemmhofdurchmesser in mm für die jeweiligen getesteten Antibiotika bei den für die Organismen *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus*, *B. intestinalis* und *B. Xylanisolvens*. Das Antibiogramm wurde mit Hilfe eines Agardiffusionstest erstellt. Jeder Test wurde in Duplikaten durchgeführt. Die Zahlen geben die getestete Konzentration in µg/ml an. Tet = Tetracyklin, Ery= Erythromycin, Gtm= Gentamycin, Carb = Carbenicillin.

Da Gentamycin zur Selektion von *Bacteroides*-Spezies verwendet wird, wurde dieses als Negativ-Kontrolle verwendet. Den Erwartungen entsprechend wurde bei einer Konzentration von 200 µg Gentamycin/ml bei keinem der Organismen ein Hemmhof gebildet. Bei einer Konzentration von 300 µg/ml waren die Hemmhöfe ebenfalls vernachlässigbar (7 mm bei *P. vulgatus* und *B. cellulosilyticus*, und 15 mm bei *B. intestinalis*). Die Antibiotika Tetracyklin und Erythromycin wurden bereits in *P. vulgatus* zur Selektion von Plasmid-haltigen Stämmen angewandt. Entsprechende der Sensitivität von *P. vulgatus* wurde unter Verwendung von Tetracyklin (10 und 20 µg/ml) sowie bei Erythromycin (100 und 200 µg/ml) ein Hemmhofdurchmesser zwischen 41 und 48 mm gemessen. Für *B. xylanisolvens* und *B. cellulosilyticus* wurden vergleichbare Hemmhofdurchmesser beobachtet. Auffallend war, dass die entsprechenden Durchmesser für *B. intestinalis* mit 3 bis 18 mm (Tab. 26) deutlich geringer waren, was darauf hindeutet, dass dieser Stamm resistent gegenüber Erythromycin und Tetracyklin ist. Aufgrund dieser Ergebnisse war *B. intestinalis* nicht für die Verwendung der etablierten genetischen Werkzeuge geeignet.

Tabelle 26: Antibiogramm von *P. vulgatus*, *B. cellulosilyticus*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens*

		Hemmhofdurchmesser in mm			
	$\mu\text{g/ml}$	<i>P. vulgatus</i>	<i>B. cellulosilyticus</i>	<i>B. intestinalis</i>	<i>B. xylanisolvens</i>
Tet ¹	10	41 \pm 5	40 \pm 0	13 \pm 3	41 \pm 1
Tet ¹	20	48 \pm 2	47 \pm 1	18 \pm 2	47 \pm 1
Ery ²	100	40 \pm 0	28 \pm 4	3 \pm 3	42 \pm 6
Ery ²	200	43 \pm 3	29 \pm 5	10 \pm 0	43 \pm 5
Gtm ³	200	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0
Gtm ³	300	7 \pm 1	7 \pm 1	15 \pm 1	0 \pm 0
Carb ⁴	100	36 \pm 0	16,0 \pm 0	22,5 \pm 2	25,0 \pm 1
Carb ⁴	200	46 \pm 0	26,0 \pm 4	29,0 \pm 1	33,0 \pm 3

¹Tet: Tetracyclin, ²Ery: Erythromycin, ³Gtm: Gentamycin, ⁴Carb: Carbenicillin

3.2.1.3 Transfer des genomintegrativen Vektors pMM656_TetQ_nanoluc in *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens*

Nachdem überprüft wurde, dass sich *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* für die Verwendung der Tetrazyklin und Erythromycin Resistenzkassetten als Selektionsmarker eignen, galt es noch weitere Kriterien zu beachten. Wie bereits erwähnt integriert das pmm656 Plasmid mit dem Nanoluc-Reportersystem (Mimee *et al.*, 2015) in *B. thetaiotaomicron* über einen zur plasmidkodierten attN-site homologen Bereich am 3'Ende der für tRNA^{Ser} kodierende Gene *bt_t70* oder *bt_t71*. In *P. vulgatus* werden die entsprechenden attN-sites ebenfalls kodiert (*bvu_2451* und *bvu_2094*), was die Nutzung des Systems in diesem Organismus ermöglicht (Lück & Deppenmeier, 2022). Im Folgenden wurde überprüft ob diese homologen Bereiche ebenfalls in *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* vorhanden sind. Mit Hilfe einer Blast-Analyse und einem Sequenz-Alignment wurde eine Homologie der Gene *BcellWH2_04704* (Abb. 48 A) und *BcellWH2_04746* (Abb. 48 B) aus *B. cellulosilyticus* und dem aus *B. thetaiotaomicron* entsprechenden tRNA^{Ser} kodierendem Gen *bt_t70* bestätigt. In *B. xylanisolvens* kodieren vier verschiedene Gene (*bxy_t_48930*, *bxy_t_48960*, *bxy_t_49030* und *bxy_t_49040*) für tRNA^{Ser} jedoch sind die für die Rekombination spezifischen Sequenzbereiche (Wang, 2000) (Abb. 48, graue und blaue

Bereiche) nur in dem Gen *Bxy_t_49030* vorhanden. Dieses Gen zeigt eine homologe Nukleotidsequenz zu *bt_t70* (Abb. 48 C). In beiden Stämmen waren dementsprechend die für die tRNA^{Ser} kodierenden Gene konserviert.

A

```

bt_t70          ggagaggtggcagagtggtcgattgcggcgggtcttgaaaaccgttgactgcgaggtacc 60
BcellWH2_04704 ggagaggtggcagagtggtcgattgcggcgggtcttgaaaaccgttgactgcgaggtacc 60
*****

bt_t70          cgggggttcgaatccctgtctctccg- 85
BcellWH2_04704 cgggggttcgaatccctgtctctccgc 86
*****

B

bt_t70          ggagaggtggcagagtggtcgattgcggcgggtcttgaaaaccgttgactgcgaggtacc 60
BcellWH2_04746 ggagaggtggcagagtggtcgattgcggcgggtcttgaaaaccgttgactgcgaggtacc 60
*****

bt_t70          cgggggttcgaatccctgtctctccg- 85
BcellWH2_04746 cgggggttcgaatccctgtctctccgc 86
*****

C

bt_t70          ggagaggtggcagagtggtcgattgcggcgggtcttgaaaaccgttgactgcgaggtacc 60
BXY_T_49030     ggagaggtggcagagtggtcgattgcggcgggtcttgaaaaccgttgactgcgaggtacc 60
*****

bt_t70          cgggggttcgaatccctgtctctccg 85
BXY_T_49030     cgggggttcgaatccctgtctctccg 85
*****

```

Abbildung 48: Sequenz-Alignment des tRNA^{Ser} kodierenden Gens aus *B. thetaiotaomicron* (*bt_t70*) und *B. cellulosilyticus* (*bcellWH2_04704* und *bcellWH2_49030*) sowie *B. xylanisolvens* (*bxy_T_49030*). *BcellWH2_04704* und *BcellWH2_49030* aus *B. cellulosilyticus* wiesen beide eine Homologie zu *bt_t70* auf, wobei allerdings beide Gensequenzen um ein Cytosin länger sind (A und B). In *B. xylanisolvens* zeigte nur *bxy_T_49030* eine Homologie zu *bt_t70* (C). Die in grau und blau markierten Nukleotidbereiche sind essentiell für die genomische Rekombination mit dem Plasmid pMM656.

Nachdem sichergestellt wurde, dass sowohl *B. cellulosilyticus* als auch *B. xylanisolvens* die für eine Rekombination mit dem Plasmid pMM656 notwendigen Bedingungen erfüllten, sollte ein über biparentale Konjugation vermittelter Transfer des Vektors in die beiden Zielstämme erfolgen. *E. coli* β 2155 diente hierbei als Donorstamm. Die Selektion rekombinierter Zellen erfolgte durch den Einsatz von Erythromycin (100 μ g/ml) haltigen Agarplatten. Zusätzlich wurden 200 μ g/ml Gentamycin zur Gegenselektion von *E. coli* verwendet. Über eine Kolonie-PCR und anschließender Gelelektrophorese wurde abschließend die Integration des Vektors in

die genomische DNA von *B. cellulosilyticus* als auch *B. xylanisolvens* überprüft. Unter Verwendung der Primer qPCR_16SBac_fw/rev (Tab. 7) welche spezifisch in der 16S RNA von *Bacteroides*-Spezies binden, konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei den vorliegenden Kolonien nicht mehr um *E. coli* handelte (Abb. 49 A und B, Spur 1). Zum Nachweis der auf dem Plasmid kodierten Nanoluc und der Tetracyklin-Resistenzkassette wurden die Primer screen_pmm656_fw/rev und Scr_pMM656_TetQ_fw (Tab. 7) verwendet. Sowohl in *B. cellulosilyticus* (Abb. 49 A) als auch in *B. xylanisolvens* (Abb. 49 B) konnten so die erwarteten Fragmente von 870 bp (Spur 2) und 2174 bp (Spur 3) amplifiziert werden. Somit wurde die Generierung von *B. cellulosilyticus* pMM656_TetQ_nanoluc und *B. xylanisolvens* pMM656_TetQ_nanoluc bestätigt.

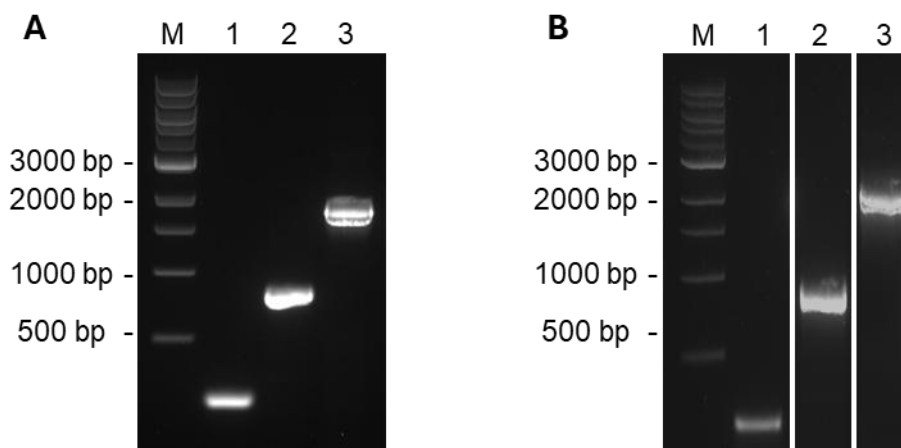


Abbildung 49: Nachweis der Integration des Vektors pMM656_TetQ_nanoluc in das Genom von *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens*. (A und B) Agarosegele nach Kolonie-PCR auf *B. cellulosilyticus* (A) und *B. xylanisolvens* (B). Die Primer scr_16DBac_fe/rev binden spezifisch im Genom von *Bacteroides*-Spezies (Spur 1). Die Primer screen_pmm656_fw/rev und Scr_pMM656_TetQ_fw binden jeweils im Plasmidrückgrat und flankierenden die für die nanoluc (Spur 2) und TetQ-Kassette (Spur 3) kodierenden Bereiche. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Damit eine Überproduktion oder Regulation über das Plasmid pMM656_TetQ möglich ist, musste erst dessen Funktionalität in *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* überprüft werden. Hierfür wurde das in Kapitel 3.1.3 beschriebene Nanoluc-Reportersystem verwendet. Die einzelnen Kulturen wurden in DMMG kultiviert und mit Rhamnose supplementiert. Die ausgewachsenen Zellen wurden anschließend gemäß der Herstellerangaben mit dem Substrat für die Nanoluc-Luciferase versetzt und die gebildete Biolumineszenz mittels Plattenlesegerät

(Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) detektiert. Die relative Lichteinheit wurde auf OD1 normiert (RLU/OD1). Im jeweiligen Wildtyp-Stamm sowie in den Kulturen mit 0 mM Rhamnose wurde erwartungsgemäß keine Biolumineszenz gemessen (Abb. 50). Sowohl für *B. cellulosilyticus* als auch für *B. xylanisolvens* wurde bei steigender Rhamnose-Konzentration (0-4 mM) eine zunehmende Biolumineszenz beobachtet (Abb. 50 A und B). Ab einer Konzentration von 3 mM Rhamnose konnte in beiden Organismen keine Zunahme der Biolumineszenz mehr gemessen werden. Hieraus war zu schließen, dass bei dieser Konzentration die maximale Expression des *nanoluc*-Gens erreicht worden war. Dabei betrug die maximal gemessene Lumineszenz in *B. cellulosilyticus* 24697 ± 3860 RLU/OD1 (Abb. 50 A) und in *B. xylanisolvens* 11430 ± 549 RLU/OD1. Im Vergleich zu *P. vulgaris* wo eine maximale RLU/OD1 von 116559 ± 4460 detektiert wurde (Kapitel 3.1.3., Abb. 22 A), war die gemessene Lumineszenz etwa zehn-mal geringer. Dies bedeutete, dass sowohl in *B. cellulosilyticus* (Abb. 50 A) als auch in *B. xylanisolvens* (Abb. 50 B) die Expression des Nanoluc-Gens über den Rhamnose-induzierbaren Promotor gesteuert werden konnte, die Effizienz, der auf *P. vulgaris* optimierten Methode, allerdings in den hier untersuchten Organismen etwas geringer war.

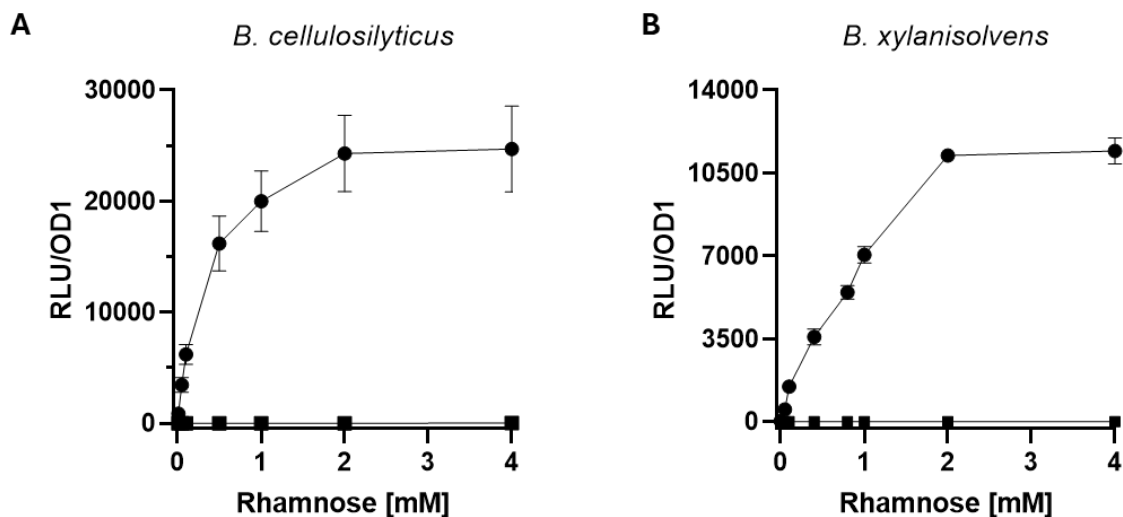


Abbildung 50: NanoLuc-Aktivität unter Kontrolle des Rhamnose-induzierbaren Promotors in *B. cellulosilyticus* pMM656_tetQ_nanoluc (A) und *B. xylanisolvens* pMM656_tetQ_nanoluc (B). Nach der Inkubation mit unterschiedlichen Rhamnose-Konzentrationen wurden die Zellen lysiert. Das Zelllysate wurde gemäß den Herstellerangaben des NanoLuc®-Luciferase Assay behandelt. Die freigesetzte Biolumineszenz (Emax=460 nm) wurde mit einem Infinite 200 PRO NanoQuant Mikropplatten-Lesegerät (Tecan, Männedorf, Schweiz) gemessen. Die gemessenen Werte wurden auf OD 1 normalisiert und mit der eingesetzten Rhamnose-Konzentration korreliert. Die Experimente wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. ● = Stamm mit pMM656_tetQ_nanoluc, ■ = Wildtyp-Stamm, RLU: Relative light units.

Bis hierher konnte gezeigt werden, dass sich das pMM656 System aus *B. thetaiotaomicron* (Mimee *et al.*, 2015), welches bereits für *P. vulgatus* optimiert wurde (Lück, 2023) auch auf die Spezies *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* der Gattung *Bacteroides* übertragen ließ.

In einem nächsten Schritt stellte sich die Frage, ob das für *P. vulgatus* entwickelte *SacB*-Deletionssystem ebenfalls auf *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* übertragbar ist. Bei diesem System katalysiert das plasmidkodierte *sacB*, während des Wachstums auf Saccharosehaltigen Gegenselektionsplatten die Bildung von polymerem Levan innerhalb der Zelle. Da *P. vulgatus* das produzierte Levan nicht abbauen kann, führt dies zum Tod der Zellen. Somit können nur diejenigen Zellen auf den Agar-Platten anwachsen, welche das Plasmid über eine zweite homologe Rekombination verloren haben (Neff *et al.*, 2023). Zur Nutzung des Systems, darf der entsprechende Organismus folglich kein Levan abbauen können. Es gibt bereits Hinweise darauf, dass die Organismen nur Levan oder Inulin, nicht aber beides verwerten können (Sonnenburg *et al.*, 2010; Neff *et al.*, 2023). Für *B. xylanisolvens* wurde bereits in einer früheren Studie gezeigt, dass es in der Lage ist Inulin zu verstoffwechseln, auf Levan aber kein Wachstum möglich ist (Wienberg, 2023). Somit sind in *B. xylanisolvens* alle notwendigen Kriterien für die Anwendung des *sacB*-Systems erfüllt. Da diesbezüglich zu *B. cellulosilyticus* noch keine Daten vorlagen, wurde die Verstoffwechslung von Levan und Inulin im nachfolgenden untersucht. Dazu wurde *B. cellulosilyticus* auf DMM mit Levan und Inulin inkubiert. Als Wachstumskontrolle diente ein Ansatz mit Glucose (15 mM) als Substrat. Nach 16 h Inkubation war sowohl auf Glukose als auch auf Levan ein eindeutiges Wachstum zu erkennen (Abb. 51). In beiden Ansätzen wurde eine vergleichbare maximale OD von 1,1 (Levan) und 1,2 (Glucose) erreicht. Mit Inulin als Substrat konnte allerdings kein Wachstum festgestellt werden (Abb. 51). Da *B. cellulosilyticus* Levan als Substrat nutzen konnte, und somit das *sacB*-System in diesem Organismus möglicherweise nicht als Deletions-System geeignet war, lag das Augenmerk in den folgenden Versuchen auf *B. xylanisolvens*.

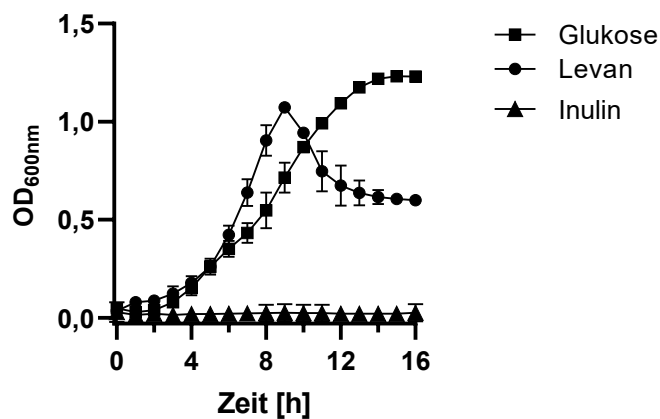


Abbildung 51: Wachstum von *B. cellulosilyticus* auf Levan und Inulin. Das Wachstum erfolgte in einer 48-Well Platte bei 37°C unter anaeroben Bedingungen. Als Substrat wurden jeweils 15 mM Kohlenstoffquelle (bezogen auf die enthaltenen Monomer-Einheiten) aus Glukose, Inulin aus Chicorée (Megazyme Inc.), und bakteriellem Levan (Pohlentz *et al.* 2022) eingesetzt. Die OD wurde mittels Plattenlesegerät (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen und mit der entsprechenden Inkubationszeit korreliert. Die Experimente erfolgten in dreifacher Ausführung.

3.2.2 Deletion der Methyl-Malonyl-CoA-Mutase (BXY_12020, BXY_12030) in *B. xylanisolvens*

Von den drei ursprünglich untersuchten Xylan-Verwertern erfüllte nur *B. xylanisolvens* alle Kriterien für die Anwendung der Gendeletion durch das *sacB*-Systems. Im Folgenden wurde getestet, ob das System auch in der Umsetzung auf den Organismus anwendbar ist. Als *proof of concept* sollte die Methyl-Malonyl-CoA Mutase ausgeschaltet werden. Wie in *P. vulgatus* ist dieses Enzym Teil des respiratorischen Astes im Stoffwechselweg von *B. xylanisolvens*. Hier katalysiert das Protein die Umsetzung von Succinyl-CoA zu Methyl-MalonylCoA (Abb. 52) und spielt damit eine Schlüsselrolle in der Verstoffwechselung von Succinat zu Propionat. Das Enzym besteht aus zwei Untereinheiten welche von den Genen *bxy_12020* und *bxy_12030* kodiert werden.

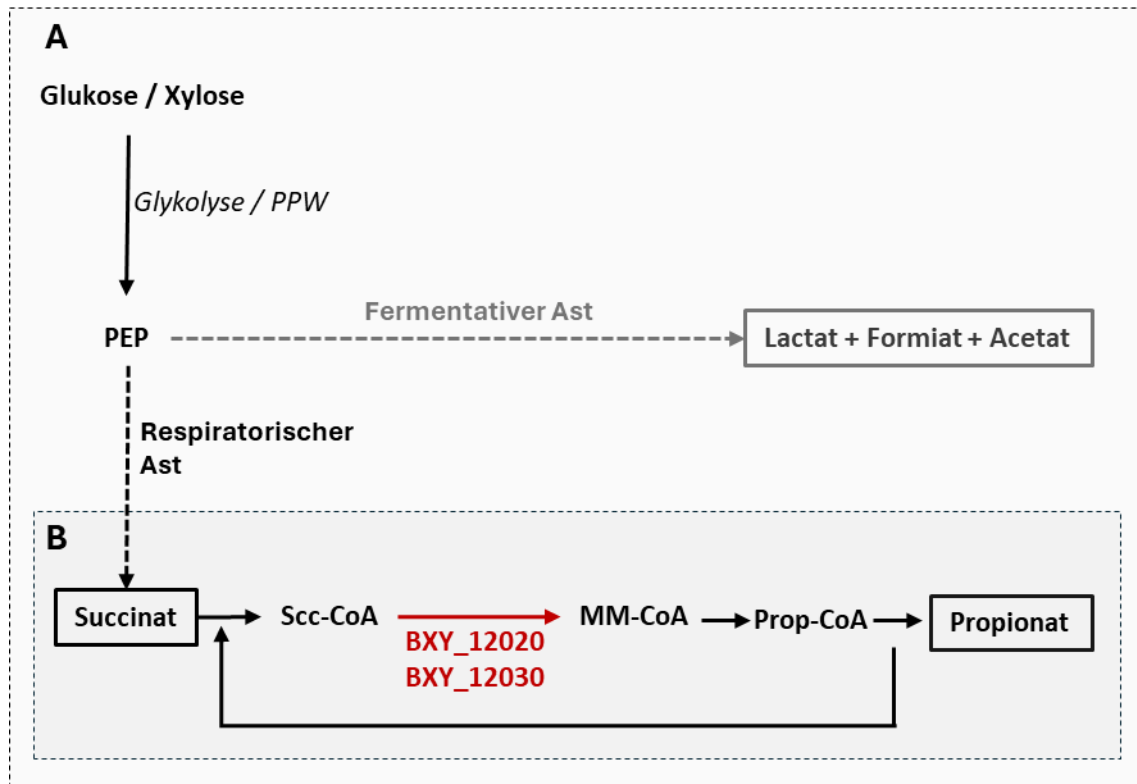


Abbildung 52: Schematische Darstellung des zentralen Kohlenstoffflusses (A) und des Propionatwegs (B) in *B. xylanisolevns*. Nach der Glykolyse beziehungsweise dem PPW, teilt sich der Stoffwechselweg in den fermentativen (---) und respiratorischen (---) Ast auf. Nach Carboxylierung und anschließender Reduktion von PEP zu Succinat kann dieses weiter zu Propionat umgewandelt werden (B). Die freigesetzten Endprodukte sind umrahmt. Die beiden Untereinheiten der Methylmalonyl-CoA-Mutase (BXY_12020 und BXY_12030) sowie deren Reaktionsweg sind in rot dargestellt. PEP= Phosphoenol-Pyruvat; PPW = Pentose-Phosphat-Weg; Succ-CoA= Succinyl-Coenzym A; MM-CoA= Methyl-Malonyl-Coenzym A; Prop-CoA = Propionyl-Coenzym A.

Um den Stoffwechselweg von Propionat auszuschalten, sollten folglich diese beiden Gene deletiert werden. Dazu wurden 1000 bp stromaufwärts von *bxy_12020* und 1025 bp stromabwärts von *bxy_12030* als *up*- und *downstream*-Regionen gewählt, über welche später die homologe Rekombination zwischen dem Genom von *B. xylanisolevns* und dem Plasmid stattfinden sollte. Die entsprechenden Nukleotidsequenzen wurden mit Hilfe der Primer *bxy_12020 up_fw/rev* und *bxy_12030 down_fw/rev* aus der genomischen DNA von *B. xylanisolevns* amplifiziert. Die Vervielfältigung des Plasmidrückgrats von pMM656_sacB erfolgte unter Verwendung der Primer pMM656_Ko_BB_fw/rev. Die einzelnen Fragmente wurden anschließend mittels NEB® Assembly Master Mix assembliert. Das Fertige Konstrukt pMM656_Δ12020-12030 (Abb. 53 A) wurde mittels Elektroporation in *E. coli* β2155 transferiert.

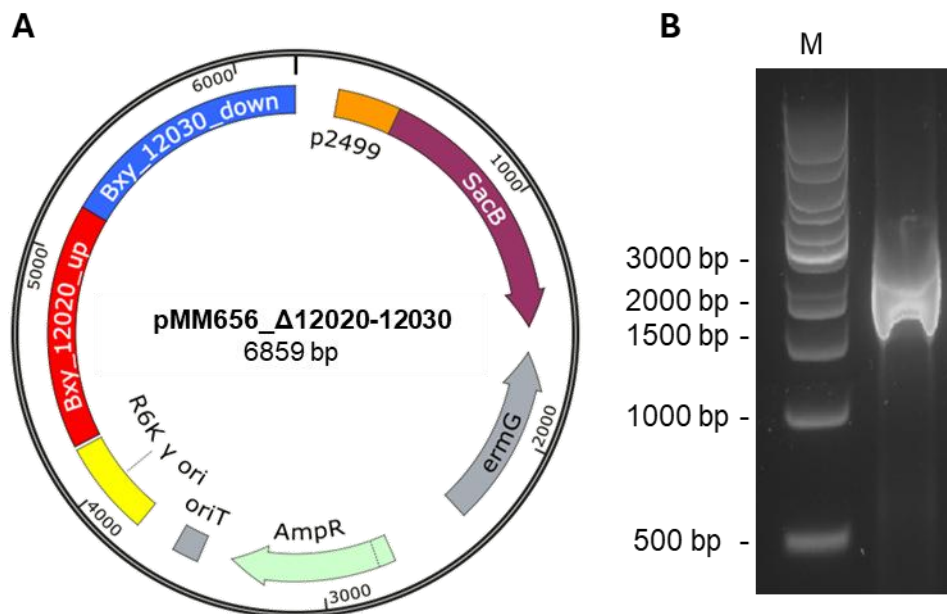


Abbildung 53: Konstruktion des Plasmids pMM656_Δ12020-12030. (A) Plasmidkarte des konstruierten Vektors pMM656_Δ12020-12030 zur Deletion der Gene *bxy_12020* und *bxy_12030* in *B. xylanisolvens*. Auf dem Plasmid befinden sich die 1000 bp *upstream*-Region von *bxy_12020* sowie die 1025 bp *downstream*-Region von *bxy_12030* für die homologe Rekombination. Außerdem befindet sich auf dem Plasmid der Promotor des Gens *bvu_2499* (p2499). Dieser initiiert die Transkription des *sacB*-Gens, welches als Gegenselektionsmarker dient. Die Ampicillin-Resistenzkassette (*AmpR*) dient der Selektion von *E. coli* und die Erythromycin-Resistenzkassette (*ermG*) der Selektion von *Bacteroides*-Spezies. OriT = *Origin of transfer*; Ori = *Origin of replication* für *E. coli*. (B) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der korrekten Assemblierung der *up*- und *downstream*-Region von *bxy_12020-12030* in pMM656_Δ12020-12030. Die verwendeten Primerpaare *scr-pmm656_up_fw* und *scr-pmm656_down_rev* binden jeweils in dem Plasmidrückgrat und flankieren die Gensequenz der *up*- und *downstream*-Region. M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Der korrekte Zusammenbau des erstellten Vektors wurde mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung unter Verwendung der Primer *scr-pmm656_up_fw* und *scr-pmm656_down_rev* geprüft. Auf dem Agarosegel wurde ein erwartetes Fragment von 2505 bp detektiert (Abb. 53 B) und somit die korrekte Assemblierung von pMM656_Δ12020-12030 bestätigt.

Darauf folgte das Einbringen des generierten Konstruktes in *B. xylanisolvens* mittels biparentaler Konjugation mit *E. coli* β2155 als Donor-Stamm. Über eine Kolonie-PCR sollte erst die Integration des Plasmids in das Genom des Zielorganismus (Abb. 54 A) und anschließend die Deletion von *bxy_12020-12030* (Abb. 54 B) bestätigt werden. Zum Nachweis der ersten homologen Rekombinante, wurden die Primer *pMM656sacB seq_fw/rev* verwendet. Diese

binden im Plasmidrückgrat und flankieren die für *sacB* kodierende Sequenz. Nach der Konjugation konnte das entsprechende Fragment von 1965 bp amplifiziert werden (Abb. 54A, Spur 1). Somit wurde die Integration des Plasmids in die genomische DNA des Organismus bestätigt. Nach der Initialisierung der zweiten homologen Rekombination wurde mit Hilfe der Primer *scr_Bxy_12020 up_rev* und *scr-Bxy_12030 down_fw* überprüft, ob eine Deletion stattgefunden hat. Da die Primer in der *up*- und *downstream*-Region von *bxy_12020* beziehungsweise *bxy_12030* binden und somit die Nukleotidsequenz beider Gene flankieren, ergeben diese ein Fragment von 4637 bp was auch im WT amplifiziert wurde (Abb. 54 B, Spur 1). In dem Untersuchten Klon ergab die Kolonie-PCR nur ein Fragment von 587 bp (Abb. 54 B, Spur 2). Somit wurde die Generierung von *B. xylanisolvens* $\Delta 12020-12030$ bestätigt.

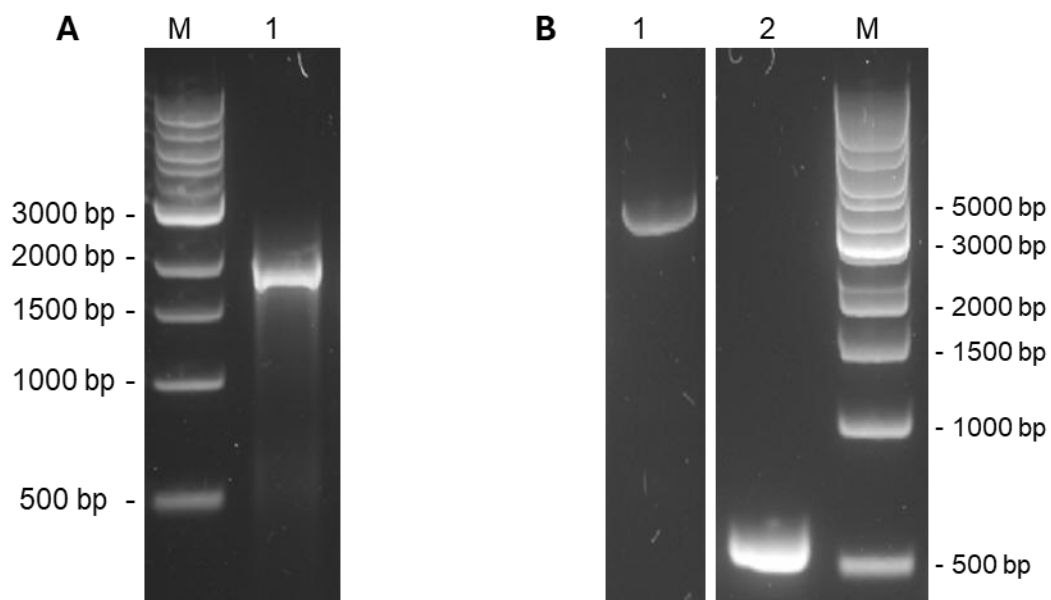


Abbildung 54: Nachweis der ersten homologen Rekombination von *pMM656_Δ12020-12030* in *B. xylanisolvens* und Nachweis der Deletion von *bxy_12020-12030* in *B. xylanisolvens*. (A) Agarosegel nach Kolonie-PCR zum Nachweis der Integration von *pMM656_Δ12020-12030* in das Genom von *B. xylanisolvens*. Die Primer *qPCR_16SBac_fw/rev* binden spezifisch im Genom von *Bacteroides*-Spezies (Spur 2). (B) Kolonie-PCR zur Untersuchung der zweiten homologen Rekombinanten. Die Primer *scr_Bxy_12020 up_rev* und *scr-Bxy_12030 down_fw* binden in der *up*- bzw *downstream*-Region von *bxy_12020* und *bxy_12030* im WT (Spur 1) und in *B. xylanisolevns* $\Delta 0523-0524$ (Spur 2). M = 1 kb DNA-Marker (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland).

Um die phänotypische Auswirkung der Deletion der für die MM-CoA-Mutase kodierenden Gene *bxy_12020* und *bxy_12030* bewerten zu können, wurde das Wachstumsverhalten der generierten Mutante *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$ mit dem Wildtypstamm verglichen (Abb. 55).

Hierfür wurden beide Stämme auf DMMX (18 mM) unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. In Abbildung 55 ist zu erkennen, dass der WT im Vergleich zur Deletionsmutante eine längere Lag-Phase hatte. Das darauffolgende Wachstum beider Stämme war allerdings vergleichbar. Der WT erreichte eine maximale OD von 0,9, während der neu generierte Stamm eine OD von 1,02 erreichte. Auch die Verdopplungszeiten waren mit $1,27 \pm 0,1$ (WT) und $1,39 \pm 0,14$ ($\Delta 12020/30$) vergleichbar. Dementsprechend hatte die Deletion von *bxy_12020* und *bxy_12030* keinen Einfluss auf das Wachstumsverhalten von *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$.

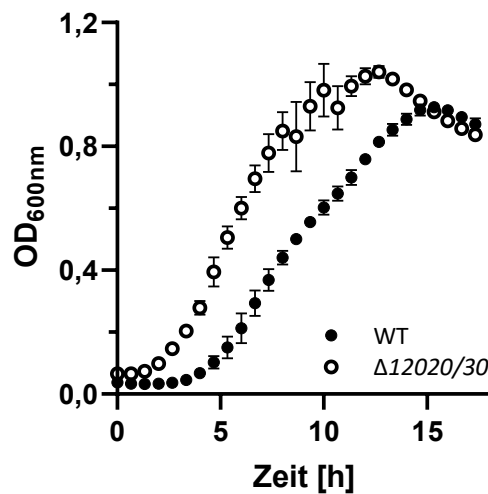


Abbildung 55: Wachstum von *B. xylanisolvens* Wildtyp und *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$ in DMMX-Medium. Die Kultivierung erfolgte in DMM-Medium mit 18 mM Xylose als Substrat. Die Kulturen wurden 5 % [v/v] in einer 48-Well-Platte angeimpft und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die OD wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (OD_{600nm}) und gegen die Zeit aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte in technischen Triplikaten.

Auf die Untersuchung des Wachstumsverhaltens folgte eine Analyse der Stoffwechselendprodukte in *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$. Hierfür wurde dieser sowie der Wildtyp-Stamm in Serumflaschen mit DMMX (18 mM) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und die Überstände mittels HPLC analysiert (Abb. 56).

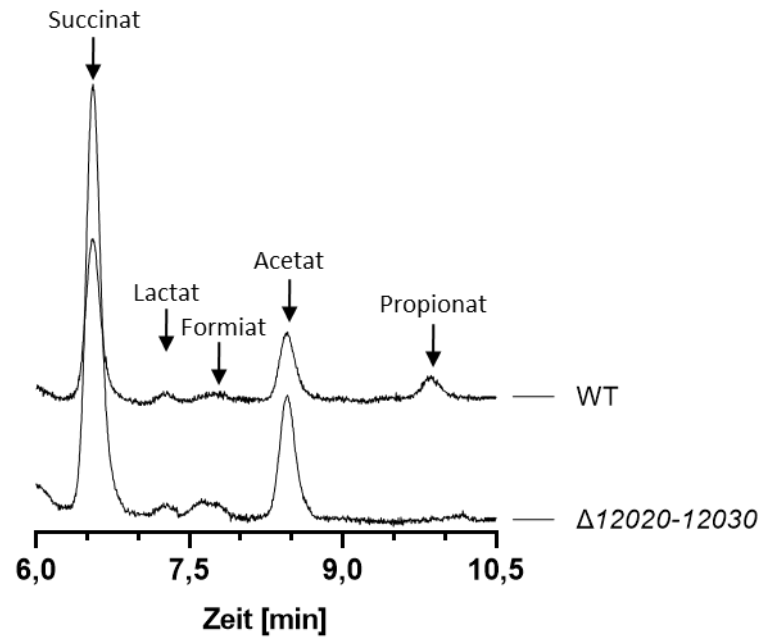


Abbildung 56: HPLC-Chromatogramm der Endprodukte von *B. xylanisolvens* WT und *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$. Beide Stämme wurden in Minimal-Medium mit Xylose (DMMX, 18 mM) unter anaeroben Bedingungen bei 37°C kultiviert. Während der exponentiellen Wachstumsphase wurden die Kulturüberstände mittels HPLC analysiert.

Wie im HPLC-Chromatogramm zusehen, wurden nur noch Succinat, Lactat, Formiat und Acetat als Stoffwechselendprodukte detektiert (Abb. 56). Somit wurde nachgewiesen, dass der Deletionsstamm nicht mehr zur Propionat-Produktion in der Lage war. Auffällig war außerdem, der Anstieg in der Succinat-Produktion im neuen Deletionsstamm. Mit $9,3 \pm 2,0$ mmol/g TG produzierte *B. xylanisolvens* $\Delta 12020-30$ 1,5-mal so viel Succinat wie der Wild-typ Stamm ($6,18 \pm 0,75$ mmol Succinat/g TG) (Abbildung 57 A und B). Die Acetatproduktion war mit $8,4 \pm 1,3$ mmol/g TG (WT) und $8,6 \pm 2,4$ mmol/g TG ($\Delta 12020/30$) in beiden Stämmen vergleichbar. In Bezug auf Lactat war die Konzentration mit $0,5 \pm 0,4$ mmol/g TG im Deletionsstamm etwas geringer als im Wild-typ-Stamm ($0,8 \pm 0,2$ mmol/g TG). Mit $2,3 \pm 1,1$ mmol Formiat/g TG war die in *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$ produzierte Menge ebenfalls geringer als im WT ($3,1 \pm 1,1$ mmol/g TG). Allerdings waren die Unterschiede in der Lactat- und Formiat- Bildung nicht signifikant. Auffällig war außerdem, dass nach der Deletion von *bxy_12020* und *bxy_12030* bereits ein 1:1 Verhältnis zwischen der Succinat- und der Acetat-Produktion vorlag (Abbildung 57 B).

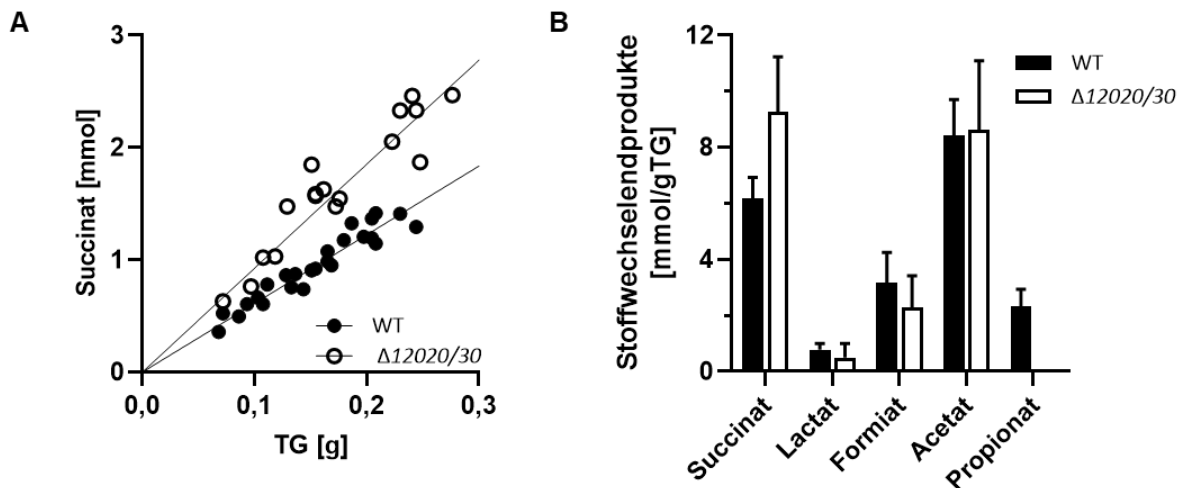


Abbildung 57: Bildung von Succinat (A) und weiteren Endprodukten (B) in *B. xylanisolvens* WT und *B. xylanisolvens* $\Delta 12020/30$. 16 Kulturen der beiden Stämme wurden auf DMMX-Medium (18 mM) kultiviert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten der exponentiellen Phase geerntet. Der Überstand der Kultur wurde mittels HPLC analysiert. (A) Die Succinat-Konzentration wurde gegen das entsprechende Trockengewicht der jeweiligen Kultur aufgetragen. Die Konzentration wurde aus der Steigung der Regressionsgerade berechnet. (B) Die Konzentrationen aller Endprodukte wurde mit dem jeweiligen Trockengewicht korreliert. Das Trockengewicht betrug 358 mg/L Kultur, bei einer OD von 1. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Aufgrund des Ausschaltens der Propionatsynthese in *B. xylanisolvens* durch die Deletion von *bxy_12020* und *bxy_12030* konnte gezeigt werden, dass das *sacB*-Deletionssystem nicht nur in *P. vulgatus* anwendbar ist, sondern auch auf *B. xylanisolvens* übertragen werden konnte. Zudem wurde mit diesem Organismus ein neuer potenzieller Kandidat zur biotechnologischen Succinatproduktion entdeckt. Um dieses Potenzial genauer zu untersuchen, wurde getestet welche nachwachsenden Rohstoffen *B. xylanisolvens* als Substrat nutzen kann.

Ein Beispiel an nachwachsenden Rohstoffen, welche bereits in der Industrie verwendet werden sind Cellulosen und Hemicellulosen, wie Xylane (Qaseem *et al.*, 2021). Die Trockenmasse von Laubhölzern (Angiospermen) besteht zu 15- 30 % aus Xylanen (Haltrich *et al.*, 1996). Aber auch in Getreiden wie Weizen, Reis oder Hafer machen Xylane bis zu 70 % der Zellwand aus (Izydorczyk & Biliaderis, 1995). Obwohl die Xylane immer aus einem Rückgrat aus Xylose-Einheiten aufgebaut sind, unterscheiden sie sich je nach Herkunft in ihrer Zusammensetzung. So enthalten Getreide-Xylane beispielsweise einen höheren Anteil an Arabinose-Monomeren (Arabinoxylan), während Xylane aus Hölzern 4-O-Methylglucuronsäure Reste (Glucuronoxylans) tragen (Polizeli *et al.*, 2005).

Neben verschiedenen Xylanen wurden zusätzlich Pektin und Carboxymethylcellulose sowie kurzkettige Xylooligosaccharide untersucht (Abb. 58). Hierfür wurden *B. xylanisolvens* in der Gegenwart der unterschiedlichen Substrate in DMM-Medium kultiviert. Um sicher zu gehen, dass die Xylane keine kurzkettigen Oligosaccharide enthielten, wurde diese vor Gebrauch mittels Ethanol-Fällung aufgereinigt (siehe Kapitel 2.5.7).

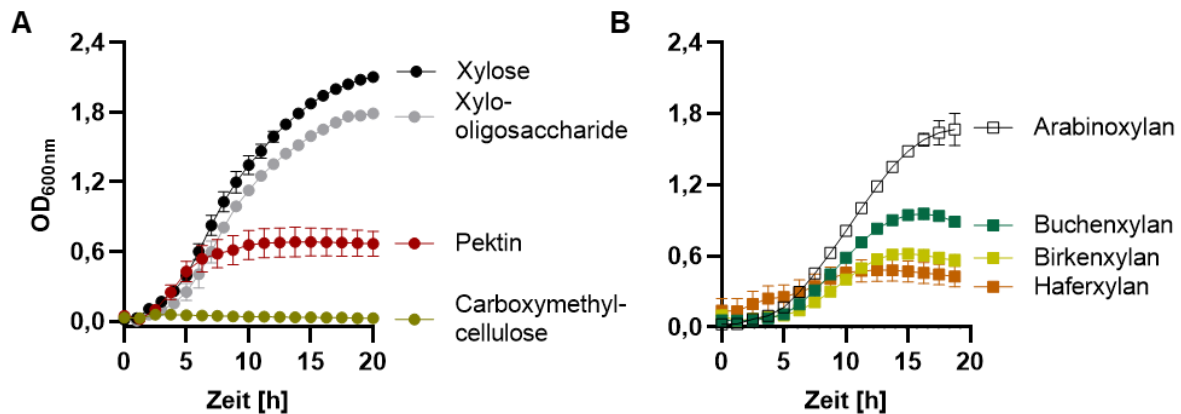


Abbildung 58: Wachstum von *B. xylanisolvens* Wildtyp auf komplexen, pflanzlichen Polysacchariden. Die Kultivierung erfolgte in DMM-Medium mit 33 mM Xylose (●), 0,5 % Xylooligosaccharide (●), 0,5 % Pektin (●), 0,5 % Carboxymethylcellulose (●), 0,5 % Arabinoxylan (□), 0,5 % Buchenxylan (■), 0,5 % Birkenxylan (■) oder 0,5 % Haferxylan (■) als Substrat. Die Kulturen wurden 5 % [v/v] in einer 48-Well-Platte angeimpft und unter anaeroben Bedingungen bei 37°C inkubiert. Die OD wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen (OD_{600nm}) und gegen die Zeit aufgetragen. Die Kultivierung erfolgte in Triplikaten.

Das Wachstum wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes festgehalten. Als Kontrolle wurde Xylose als Substrat verwendet. Hier war ein Wachstum bis zu einer maximal OD von 2,1 zu beobachten. Mit Xylooligosacchariden aus Maiskolben, war ein vergleichbares Wachstum bis zu einer OD von 1,8 zu sehen (Abb. 58 A). Die Carboxymethylcellulose konnte hingegen von *B. xylanisolvens* gar nicht als Wachstumssubstrat verwendet werden (Abb. 58 B). Auf Pektin wurde anfangs ein leichtes Wachstum bis zu einer OD von 0,3 beobachtet, allerdings war hier die stationäre Phase bereits nach 8 h erreicht (Abb. 58 B). Arabinoxylan konnte am besten verwertet werden und *B. xylanisolvens* erreichte eine maximale OD von 1,7. Auch das Xylan aus Buchenholz ermöglichte ein Wachstum bis zu einer OD von 0,95 (Abb. 58 C). Mit maximalen ODs von 0,6 und 0,45 war das Wachstum auf Birken- beziehungsweise Haferxylan deutlich schlechter (Abb. 58 C). Insgesamt ergaben die Untersuchungen, dass sich Xylane von *B. xylanisolvens* als Substrat verwenden lassen, Pektin aus Äpfeln und Carboxymethylcellulose sich hingegen nicht als Substrate eignen.

3.3 Wechselwirkung zwischen pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen und der menschlichen Darmmikrobiota

Der menschliche Dickdarm stellt mit 10^{11} Zellen/ml den am dichtesten von Prokaryoten besiedelten Bereich des menschlichen Körpers dar (Sender *et al.*, 2016). Gleichzeitig weist die Diversität der intestinalen Mikrobiota mit schätzungsweise 1000 verschiedenen Arten eine bemerkenswerte Vielfalt auf (Qin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). Die Zusammensetzung der menschlichen Darmmikrobiota zeigt allerdings eine hohe Variabilität in Abhängigkeit des Alters oder der geographischen Herkunft (Yatsunenko *et al.*, 2012). Darüber hinaus können externe Faktoren wie die Ernährungsweise oder der Einsatz von Medikamenten und Antibiotika die mikrobielle Diversität und Zusammensetzung beeinflussen (Dethlefsen & Relman, 2011; Wexler & Goodman, 2017; Subramaniam *et al.*, 2023). Die Interaktion zwischen der Darmmikrobiota und dem menschlichen Organismus ist jedoch bidirektional: Der Stoffwechsel der Mikroorganismen kann ebenfalls bedeutende Auswirkungen auf die Gesundheit des Wirtsorganismus haben. Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von Butyrat. Diese kurzkettige Fettsäure (SCFAs), welche von einer Vielzahl an Darmbakterien gebildet wird, dient als wichtige Energiequelle der Kolonozyten (Louis & Flint, 2009). Durch die mikrobielle Verstoffwechslung von Nahrungsbestandteilen im Darm können allerdings auch reaktive Verbindungen entstehen, welche die Gesundheit des Menschen negativ beeinflussen können. Ein Beispiel was zunehmend an Interesse gewinnt ist die Bildung von N-Nitroso-Verbindungen wie die N-Nitrosamine. Hierbei handelt es sich um organische Verbindungen, die sich auf natürliche Weise aus sekundären oder tertiären Aminen durch Reaktionen mit Nitrosierungsmitteln wie Nitrit (NO_2^-) oder unter oxidativen Bedingungen bilden können (Anselme, 1979) (siehe Abb. 2, Kapitel 1.5). Zusätzlich gibt es einige Berichte über Bakterien, welche durch die Katalyse bestimmter Reaktionen im Darm ebenfalls zur Bildung von N-Nitrosaminen beitragen (Suzuki & Mitsuoka, 1984). Solche Reaktionen wurden beispielsweise in *E. coli*-Stämmen sowie weiteren Enterobakterien (Calmels *et al.*, 1987; O'Donnell *et al.*, 1988), und einigen Vertretern der Gattung *Pseudomonas* beobachtet (Calmels *et al.*, 1987; Ralt *et al.*, 1988; Suzuki & Mitsuoka 1984). Während diese Gruppe nur einen geringen Anteil der Darmmikrobiota ausmacht (King *et al.*, 2019), gibt es bisher noch keine Daten zur Nitrosierung durch weitere Vertreter der Darmbakterien.

Aufgrund dessen sollte in diesem Kapitel der Arbeit die Bildung von N-Nitroso-Verbindungen ausgehend von aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API) mit sekundären Amin-Gruppen durch verschiedene Vertreter der Darmmikrobiota näher untersucht werden. Diese Untersuchungen waren Teil der *Endogenous formation of nitrosamines from drug substances* (GITox) Studie der *European medicines agency* (EMA) und wurden in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) und dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) durchgeführt.

3.3.1 Auswirkung der APIs auf das Wachstumsverhalten verschiedener Darmorganismen

Bei aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API) handelt es sich um chemisch basierte Wirkstoffe, welche eine pharmakologische Aktivität zeigen. Diese Wirkstoffe werden in unterschiedlichen Bereichen zur Behandlung von Krankheiten angewandt (Kumar *et al.*, 2022). In den letzten Jahren sind immer häufiger Berichte über N-Nitroso kontaminierte API wie Valsartan und Vareniclin (EMA, 2020; Schmidtsdorff *et al.*, 2022) aufgetaucht, was das Interesse an der Untersuchung von N-Nitroso-API erhöhte.

Die hier zu Untersuchenden Wirkstoffe (Tab. 27) wurden unter anderem aufgrund ihrer hohen Verschreibungsrate, und dem Beinhalten von sekundären Aminen auserwählt. Bei Enalapril, Propranolol und Metoprolol handelt es sich um Wirkstoffe, die gegen Bluthochdruck eingesetzt werden, über welche allerdings auch schon Berichte über Nitrosierungen vorliegen (Robbiano *et al.*, 1991; Schmidtsdorff *et al.*, 2022). Auch Fluoxetin und Methylphenidat, welche bei Patienten mit Depressionen beziehungsweise ADHS (Aufmerksamkeitsdefizit-/Hyperaktivitäts-Störung) verordnet werden, wurden bereits mit Nitrosierungsvorgänge und Mutagenität in Verbindung gesetzt (Elzein *et al.*, 2005; Schmidtsdorff *et al.*, 2022).

Da nicht bekannt ist, wo genau im Verdauungstrakt die jeweiligen Medikamente absorbiert werden und welche Menge tatsächlich im Dickdarm ankommt wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung einer möglichen Nitrosierung die einzunehmende Tageshöchstdosis, verwendet. Das Magenvolumen eines erwachsenen Menschen beträgt nach der Essensaufnahme etwa 0,5 L (Schiller *et al.*, 2005; Perlas *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2020). Aufgrund dessen wurden die entsprechenden Tageshöchstdosen der API dupliziert, um die

Konzentration für die Versuche zu berechnen. Die getesteten API mit den jeweiligen Konzentrationen sowie deren Wirkungsbereich sind in Tabelle 27 angegeben.

Tabelle 27: Verwendete API und Konzentrationen im Versuchsansatz.

Name (API)	Tageshöchst-dosis [mg]	Konzentration im Versuchsansatz ^{a)} [mg/L]	Konzentration [mM]	Quelle
Enalapril	20	40	0,08	Nationale Experteninformation (EMA)
Fluoxetin	60	120	0,34	Altamura <i>et al.</i> (1994); Nationale Experteninformation (EMA)
Methylphenidat	60	120	0,44	Kimko <i>et al.</i> (1999); Nationale Experteninformation (EMA)
Metoprolol	100	200	0,60	Nationale Experteninformation (EMA)
Propranolol	160	320	1,08	Nationale Experteninformation (EMA)

a) Konzentration berechnet anhand der Tageshöchstdosis und ausgehend von einem Magenvolumen nach Nahrungsaufnahme von 0,5 L (Shiller *et al.* 2005; Perlas *et al.* 2009; Kim *et al.* 2020)

Um eine möglichst gute Übersicht über die Wechselwirkung zwischen den API und der Darmmikrobiota zu bekommen, wurden in dieser Arbeit die nach King *et al.* (2019) elf häufigsten Vertreter der intestinalen Flora untersucht. Die entsprechenden Organismen sind mit ihrer durchschnittlichen Abundanz im menschlichen Darm in Tabelle 28 aufgelistet. Zusätzlich wurde aus diesen Vertretern, unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Häufigkeit, eine synthetische Darmmikrobiota erstellt, um so die Wechselwirkung zwischen den einzelnen Organismen ebenfalls zu berücksichtigen.

Tabelle 28: Verwendete Vertreter der Darmmikrobiota und ihr prozentuales Vorkommen im menschlichen Darm.

Spezies	Phylum	Durchschnittliche ^{a)} Abundanz [%]
<i>Phocaeicola (P.) dorei</i>	Bacteroidota	17.4
<i>Phocaeicola (P.) vulgatus</i>	Bacteroidota	15.0
<i>Agathobacter (A.) rectalis</i>	Bacillota	6.2
<i>Bacteroides (B.) xylanisolvens</i>	Bacteroidota	4.9
<i>Faecalibacterium (F.) prausnitzii</i>	Bacillota	3.5
<i>Bacteroides (B.) cellulosilyticus</i>	Bacteroidota	3.4
<i>Ruminococcus (R.) bicirculans</i>	Bacillota	2.5
<i>Escherichia (E.) coli</i> MC4100	Proteobacteria	1.9
<i>Roseburia (R.) intestinalis</i>	Bacillota	1.1
<i>Bifidobacterium (B.) longum</i>	Actinomycetota	0.7
<i>Akkermansia (A.) muciniphila</i>	Verrucomicrobia	0.7

a) Durchschnittliche Häufigkeit im Dickdarm, berechnet anhand der Analyse von Stuhlproben von mehr als 200 gesunden Menschen (King *et al.* 2019)

Zur Untersuchung der möglichen Nitrosierung an API durch Darmbakterien, wurden die einzelnen Stämme jeweils in SHIME® (Van De Wiele *et al.*, 2015) beziehungsweise BHI-Medium bei 37 °C mit der entsprechenden Konzentration an API kultiviert. Hierbei fiel auf, dass Fluoxetin und Propranolol auf alle Organismen einen Wachstumshemmenden Effekt hatten. Dieses Phänomen ist in Abbildung 59 am Beispiel von *P. dorei* dargestellt. Während die Kulturen mit Methylphenidat, Enalapril und Metoprolol ein vergleichbares Wachstum zu den Kulturen ohne API zeigten, konnte in der Anwesenheit von Fluoxetin und Propranolol kein Wachstum beobachtet werden.

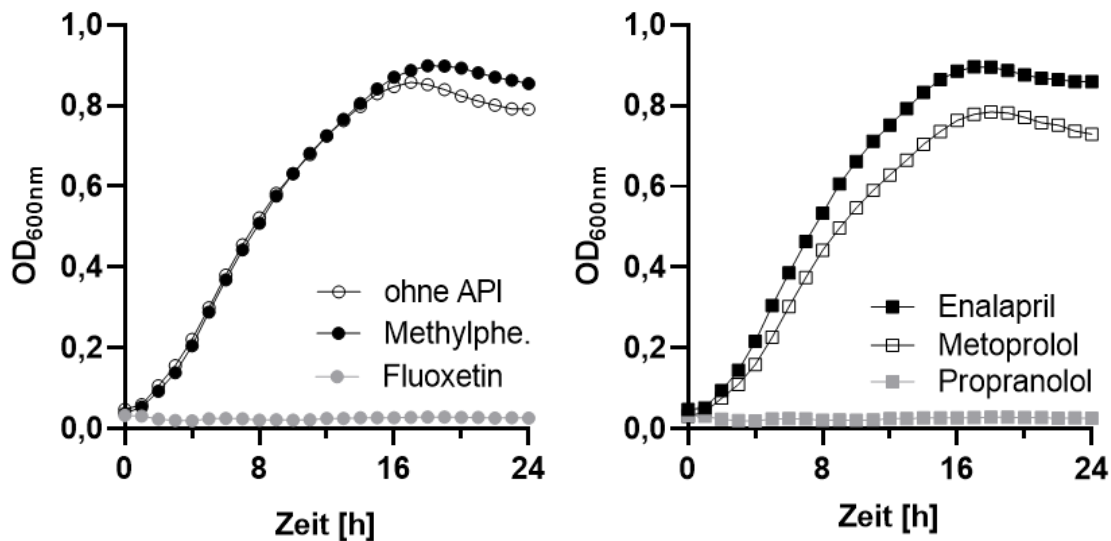


Abbildung 59: Auswirkung verschiedener Medikamente auf das Wachstumsverhalten von *P. dorei*. *P. dorei* wurde mit der entsprechenden maximalen Tagesdosis an Methylphenidat (●), Fluoxetin (●), Enalapril (■), Metoprolol (□) und Propranolol (■) unter anaeroben Bedingungen bei 37°C in einer 48-Well-Platte inkubiert. Als positiv Kontrolle diente eine Probe ohne API (○). Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Plattenlesegerätes (Tecan infinite 200Pro, Männedorf, Schweiz) erfasst und gegen die Zeit aufgetragen. Methylphe, = Methylphenidat.

Um festzustellen, ob es sich bei dieser Wachstumshemmung um eine konzentrationsabhängige Hemmung handelt, wurden die Organismen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Fluoxetin und Propranolol inkubiert. In Abbildung 60 ist beispielhaft die Auswirkung unterschiedlicher Propranolol-Konzentrationen auf das Wachstum von *P. dorei* dargestellt. Hierbei ist zu erkennen, dass die Wachstumskurve von *P. dorei* mit steigender Konzentration an Propranolol abflachte und schließlich bei 1,1 mM Propranolol gar kein Wachstum mehr gemessen wurde (Ab. 60 A).

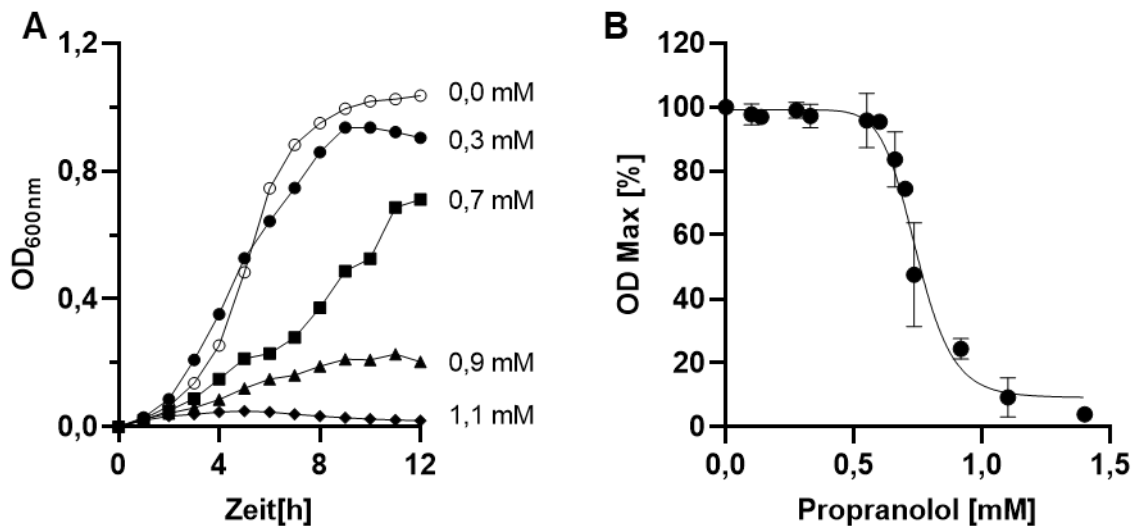


Abbildung 60: Konzentrationsabhängige Wachstumshemmung von Propranolol auf *P. dorei*. (A) *P. dorei* wurde mit Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,1 mM Propranolol inkubiert. (B) Nach der Inkubation von *P. dorei* in (A) wurden die maximal erreichten ODs in Prozent berechnet und gegen die jeweiligen Propranolol Konzentrationen aufgetragen. Die maximale OD wurde hierbei auf die OD einer Kultur ohne Propranolol (100 %) normiert. Mit Hilfe der Funktion *non linear fit [Inhibitor] vs. response* von *graph pad Prism* wurde die mittlere inhibitorische Konzentration von Propranolol bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Durch die Korrelation der maximal erreichten OD in Prozent gegen die angewandte API-Konzentration (Abb. 60 B) wurde der Zusammenhang zur Wachstumshemmung verdeutlicht. Mit Hilfe der nicht linearen Regressionsgerade und der Funktion „Hemmstoff-Antwort“ in Graph-Pad Prism wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) bestimmt. Diese wurde für alle Organismen jeweils für Fluoxetin und Propranolol in Tabelle 29 dargestellt. Für Fluoxetin lag die IC₅₀ der meisten Organismen mit 0,03 bis 0,07 mM bei etwa einem Zehntel der erlaubten Tageshöchstdosis. Als einzige Ausnahme war hier *E. coli* auffällig, für welchen eine IC₅₀ von 0,35 mM festgestellt wurde. Für Propranolol hingegen waren die detektierten IC₅₀-Werte für die einzelnen Organismen sehr unterschiedlich. *A. muciniphila* wies mit einer IC₅₀ von $0,28 \pm 0,04$ mM die größte Sensitivität gegenüber Propranolol auf. Wie auch bei Fluoxetin war es erneut *E. coli* welcher am geringsten von dem Wirkstoff gehemmt wurde. Dennoch lag auch hier die IC₅₀ mit $0,83 \pm 0,1$ mM unterhalb der maximal erlaubten Tageshöchstdosis von Propranolol (1,08 mM). Diese Ergebnisse verdeutlichten, dass sowohl Fluoxetin als auch Propranolol bereits in geringen Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der getesteten Darmorganismen hatte.

Tabelle 29: Mittlere inhibitorische Konzentration (IC50) von Fluoxetin und Propranolol in verschiedenen Darmorganismen.

Organismus	IC50 Fluoxetin [mM]	IC50 Propranolol [mM]
<i>P. dorei</i>	0,05 ± 0,01	0,76 ± 0,03
<i>P. vulgatus</i>	0,04 ± 0,01	0,37 ± 0,04
<i>A. rectalis</i>	0,04 ± 0,01	0,33 ± 0,02
<i>B. xylanisolvens</i>	0,07 ± 0,01	0,45 ± 0,03
<i>F. prausnitzii</i>	0,03 ± 0,00	0,37 ± 0,02
<i>B. cellulosilyticus</i>	0,03 ± 0,01	0,65 ± 0,08
<i>H. aceti</i>	0,03 ± 0,01	0,49 ± 0,09
<i>E. coli</i> MC4100	0,35 ± 0,00	0,83 ± 0,1
<i>R. intestinalis</i>	0,07 ± 0,01	0,39 ± 0,05
<i>B. longum</i>	0,05 ± 0,01	0,53 ± 0,03
<i>A. muciniphila</i>	0,05 ± 0,00	0,28 ± 0,04

3.3.2 Nitrosierung von APIs durch Darmbakterien

In den vorherigen Ergebnissen wurde gezeigt, dass die Anwendung der Tageshöchstdosis von Fluoxetin und Propranolol das Wachstum der Organismen beeinträchtigte, wodurch die Nitrosierung dieser API nicht mit Hilfe von wachsenden Kulturen untersucht werden konnte. Da im menschlichen Darm allerdings zum Zeitpunkt der Einnahme der API bereits eine stabile Gemeinschaft der jeweiligen Organismen vorhanden ist, wurden im Folgenden zur Untersuchung der beiden Wirkstoffe Fluoxetin und Propranolol ausgewachsene Kulturen verwendet.

3.3.2.1 Einfluss des pH-Wertes auf die chemische Nitrosierung von APIs

Bevor die biologische Nitrosierung durch Bakterien untersucht werden konnte, sollte zunächst geklärt werden, ob eine chemische Reaktion stattfindet. Hierfür wurden die einzelnen Wirkstoffe jeweils unter den gleichen Bedingungen wie die späteren Experimente inkubiert. Während im Darm ein pH-Wert von 7 herrscht, konnte diese Bedingung in den Wachstumsexperimenten nicht eingehalten werden. Durch die Freisetzung von Fermentationsprodukten kommt es bei der anaeroben Kultivierung der Darmbakterien zu einem pH-Abfall. Demnach war es wichtig zu klären, ob der pH-Wert einen Einfluss auf die

chemische Nitrosierung der Wirkstoffe hatte. Hierfür wurden die API unter anaeroben Bedingungen mit 100 μM NO_2^- und bei unterschiedlichen pH-Werten inkubiert. Nach 24 h wurde die Reaktion mit Acetonitril abgestoppt. Die Proben wurden mittels LC-MS (BfArM, Bonn, Deutschland) analysiert und die Peakfläche der gemessenen N-Nitroso-Verbindungen angegeben (Abb. 61).

Auffällig war gleich, dass für jede Substanz ein Peak für eine N-Nitroso-Verbindung detektiert werden konnte. Dies deutete darauf hin, dass bei allen API eine chemische Reaktion stattgefunden hat. Diese kann unter anderem während des Trocknungsprozesses unter hohen Temperaturen im Zuge der Probenvorbereitung für die LC-MS-Analyse auftreten (persönliche Mitteilung M. Vogel, BfArM). Wie in Abbildung 61 zu sehen, war die Peakfläche der detektierten N-Nitroso-Verbindung für Propranolol, Methylphenidat und Metoprolol innerhalb der getesteten pH-Bereiche immer vergleichbar hoch. Daraus ließ sich schließen, dass bei diesen Wirkstoffen der pH-Wert keinen Einfluss auf die chemische Reaktion hatte. Für Enalapril hingegen nahm die Peakfläche von $3,5 \times 10^4$ bei pH 7,2 in zunehmend saurem Milieu zu und erreichte bei pH 5 eine fast 100-fache Peakfläche von $1,1 \times 10^6$ (Abb. 61). Für Enalapril konnte dementsprechend ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der chemischen Reaktion und dem pH-Wert nachgewiesen werden. Auch für Fluoxetin konnte eine leichte pH-Abhängigkeit der chemischen Reaktion beobachtet werden. Hier war die Fläche mit $1,1 \times 10^5$ bei pH 5 etwa fünf-Mal größer als bei pH 7,2 ($2,5 \times 10^4$) (Abb. 61).

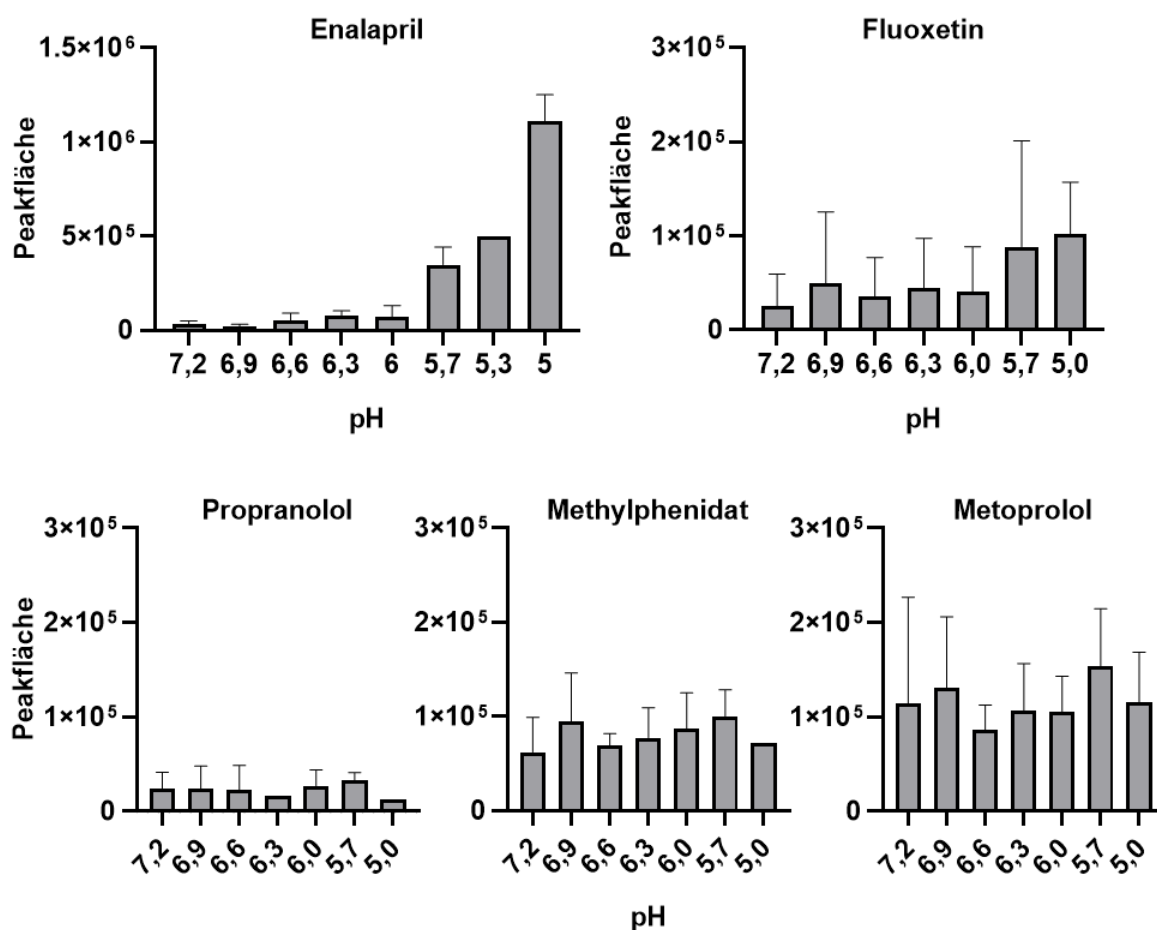


Abbildung 61: pH-Abhängigkeit der chemischen Nitrosierung von Enalapril, Fluoxetin, Propranolol, Methylphenidat und Metoprolol. Die jeweiligen Substanzen wurden während 24 h in Shime-Medium mit unterschiedlichen pH-Werten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mittels Acetonitril abgestoppt. Die Bildung von N-Nitroso-API wurde anschließend mittels LCMS ermittelt. Die gemessene Peakfläche wurden für die jeweiligen pH-Werte aufgetragen. Jeder Ansatz wurde mindestens in Duplikaten inkubiert. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

3.3.2.2 Biologische Nitrosierung von APIs durch Darmorganismen

Um das Phänomen der chemischen Reaktion in den folgenden Experimenten zu berücksichtigen, wurde basierend auf den Daten aus Abbildung 61 mit Hilfe des Programmes *SciDavis* eine Funktionsgleichung erstellt. Diese wurde später verwendet, um die Peakflächen ab pH-Werten von unter 6,5 zu korrigieren. Nachdem das Ausmaß der Hintergrundreaktion ermittelt worden war, folgten die Untersuchungen zur biologischen Nitrosierung. Hierfür wurden alle API in der Konzentration entsprechend ihrer Tageshöchstdosis eingesetzt

(Tab. 27). Die Verbindungen wurden in SHIME®- beziehungsweise BHI-Medium mit 100 μM NO_2^- sowie den jeweiligen Darmorganismen (Tab. 28) inkubiert. Für Fluoxetin und Propranolol wurden aufgrund ihrer hemmenden Wirkung (siehe Kapitel 3.3.1) keine wachsenden Kulturen, sondern Zellen in ihrer stationären Phase verwendet. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C wurden die Reaktionen mit Acetonitril gestoppt und mittels LC-MS auf die Bildung von N-Nitroso-API untersucht (BfArM, Bonn, Deutschland). Zusätzlich wurden für alle Wirkstoffe Standards zur chemischen Hintergrundreaktion ohne Bakterien inkubiert. Ansätze mit starker Ansäuerung wurden nachträglich über die zuvor bestimmte Funktionsgleichung korrigiert. Abschließend wurde das Verhältnis zwischen den Peakflächen der Proben und der Peakflächen der chemischen Reaktion bestimmt (Abb. 62). Lag dieses Verhältnis bei 1 so hat keine biologische Nitrosierung stattgefunden. War das Verhältnis über eins so war davon auszugehen, dass zusätzlich zu der chemischen- auch eine biologische Nitrosierung stattgefunden hat.

Wie aus Abbildung 62 hervorgeht, lag der Mittelwert des Verhältnisses zwischen der gesamten und der chemischen Reaktion bei den meisten Experimenten um 1 oder sogar tiefer. In vereinzelt Versuchen wurde ein erhöhtes Verhältnis beobachtet. Dies war beispielsweise der Fall für *F. prausnitzii* und *A. muciniphila* bei der Inkubation von Fluoxetin, wo Verhältnisse von 1,7 beziehungsweise 1,9 gemessen wurden. Allerdings waren diese Daten aufgrund der starken Abweichungen zwischen den einzelnen Versuchen nicht oder nur schwach signifikant. Der einzige Ansatz, welcher zu einer geringen (Verhältnis gesamt/chemische Nitrosierung von 1,16) aber statistisch signifikanten Erhöhung der gesamten und somit der biologischen Reaktion führte, war die Inkubation von *A. muciniphila* mit Methylphenidat (Abb.62).

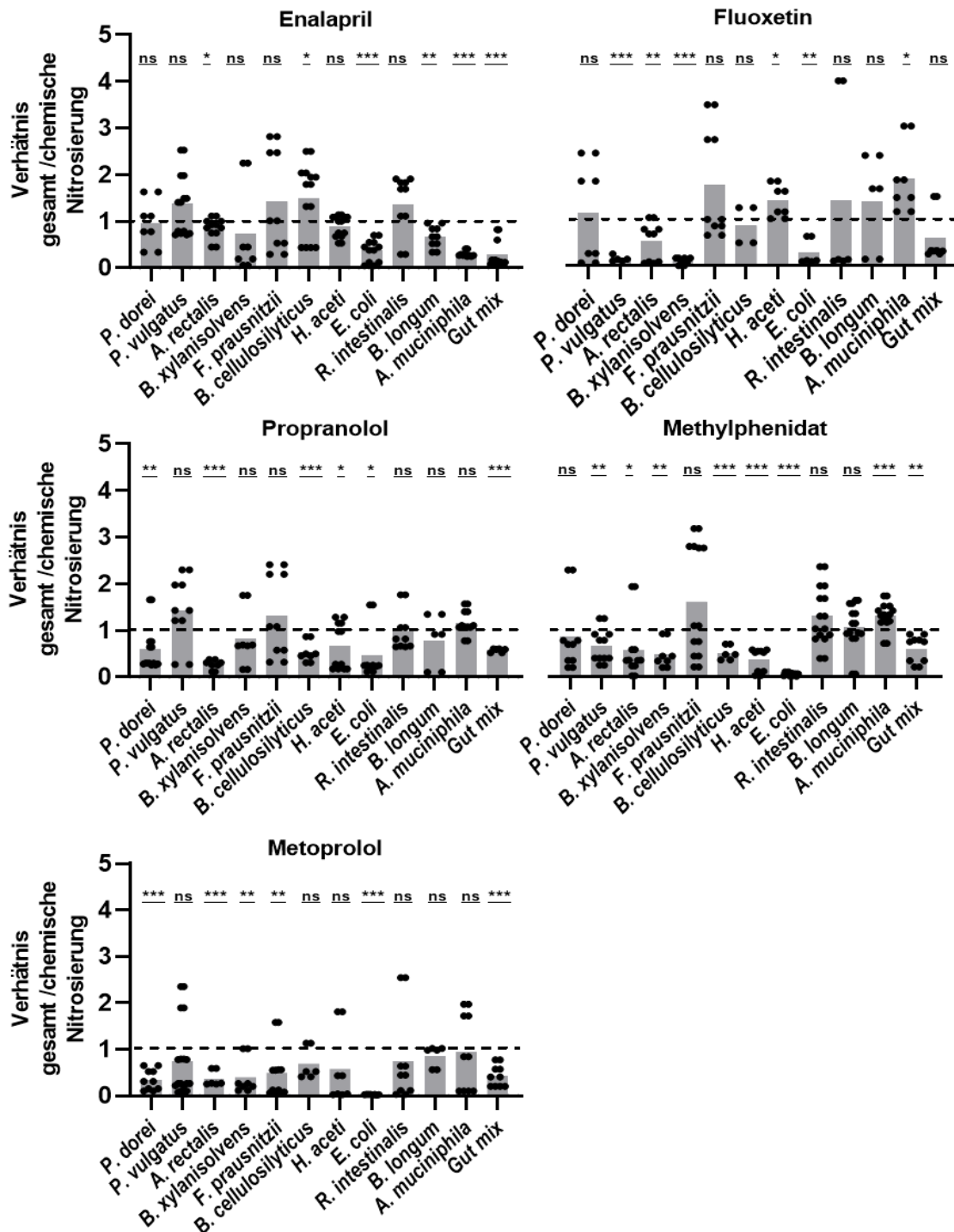


Abbildung 62: Biologische Nitrosierung von API durch Darmorganismen. Alle Inkubationen erfolgten für 24 h bei 37°C. Für Fluoxetin und Propranolol wurden ausgewachsene Kulturen verwendet. Die Inkubation von Propranolol, Metoprolol und Methylphenidat erfolgte mit wachsenden Zellen. Die Reaktionen wurden jeweils mit Acetonitril abgestoppt. Die N-Nitroso-API wurde mittels LCMS detektiert (BfArM, Bonn, Deutschland). Dargestellt ist das Verhältnis der Peakfläche der N-Nitroso-Verbindungen aus der Reaktion mit Zellen (biologisch + chemisch) im Vergleich zu der chemischen Reaktion ohne Zellen. Die einzelnen Experimente sind als Punkte dargestellt. Die Balken geben den Mittelwert an. Liegt das Verhältnis bei 1 (gestrichelte Linie) so entspricht die Gesamt-Reaktion der chemischen Reaktion. Die Signifikanz der Daten wurde mit Hilfe von Graph-Pad Prism und einem *One sample t-test* ermittelt. Die Sternchen zeigen einen P-Wert von <0,033 (*); <0,002 (**) und < 0,001 (***) an. Gut mix: synthetische menschliche Darmmikrobiota aus den elf häufigsten Vertretern.

Der Einfluss einzelner Organismen auf verschiedene Stoffe wie beispielsweise Antibiotika kann teilweise stark von ihrer Auswirkung in einer bakteriellen Gemeinschaft abweichen (Vega & Gore, 2014; Zimmermann *et al.*, 2021). Daher ist es wichtig neben der Untersuchung der Auswirkung von einzelnen Bakterien auf die Nitrosierung von APIs, die Organismen als gesamte Mikrobiota zu betrachten. Um die Zusammensetzung der humanen Kolon-Mikrobiota zu imitieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine synthetische Darmmikrobiota (*Gut Mix*) aus 11 verschiedenen Organismen (Tabelle 28) erstellt. Bei den ausgewählten Bakterien handelte es sich um die nach King *et al.* (2019) am häufigsten vorkommende Vertreter der menschlichen Darmmikrobiota. Die entsprechenden Gattungen deckten hierbei etwa 80 % aller im menschlichen Darm vorkommenden Spezies ab. Aus den Inkubationen der synthetischen Darmmikrobiota (*Gut mix*) mit den einzelnen API ging deutlich hervor, dass keine Nitroisierung stattgefunden hat, da sich alle Messwerte deutlich unter 1 befanden (Abb. 62). Auffällig war außerdem, dass einige Werte weit unter 1 lagen. Dies war zum Beispiel bei der Inkubation von Fluoxetin mit *P. vulgatus* oder Methylphenidat mit *E. coli* der Fall. Ein solches Verhältnis kann nur zu Stande kommen, wenn die Gesamtreaktion geringer war als die chemische Nitrosierung. Dieses Phänomen deutete darauf hin, dass die Organismen nicht zur Nitrosierung beitragen. Im Gegenteil könnten die Stämme möglicherweise das Nitrit so schnell reduzieren, dass es der chemischen Reaktion nicht mehr zu Verfügung steht. Eine weitere mögliche Erklärung wäre der Abbau der chemisch gebildeten N-Nitroso-API durch die Bakterien, was zu einer Verschiebung des Verhältnisses unter 1 führen würde (siehe Kapitel 4.3.2).

Neben der Bildung von N-Nitroso-Verbindungen, wurden die Reaktionsansätze nach der Inkubation zusätzlich auf verbleibendes Nitrit untersucht. Mit Hilfe der Luges-Reagenz-Methode (Kapitel 2.6.5), wurde die NO_2^- -Konzentration kolorimetrisch bestimmt und in Abbildung 63 dargestellt.

Auffällig war hier das für alle Reaktionsansätze mit *E. coli* nichts von den ursprünglichen 100 μM Nitrit wiedergefunden wurde. In den Ansätzen mit der synthetischen Darmmikrobiota (*Gut mix*) waren ebenfalls nach Reaktionsende nur noch $20,3 \pm 4,6 \mu\text{M}$ übrig. In den Reaktionsansätzen von *B. longum* und *A. muciniphila* hingegen konnten fast die kompletten 100 μM auch am Ende noch gemessen werden, während die Zahlen bei den anderen Organismen ebenfalls auf eine Abnahme der Nitrit-Konzentration hindeuteten.

Vergleicht man diese Daten mit den Nitrosierungsdaten aus Abbildung 62 so war festzustellen, dass *E. coli*, welcher die 100 μM Nitrit abzubauen schien (Abb. 63), auch in den Nitroso-API-Messungen immer einen Quotienten von weit unter 1 zeigte (Abb. 62). Ein möglicher Zusammenhang könnte hier sein, dass durch die vorhandenen Organismen und damit verbundenen Abbau von NO_2^- eine chemische Nitrosierung der APIs gar nicht erst stattfinden konnte und somit die eigentlichen Werte der chemischen Reaktion, welche in die Quotienten mit eingeflossen sind, geringer waren als zu erwarten gewesen wäre. Eine andere Möglichkeit könnte jedoch auch sein, dass die Organismen in der Lage sind die bereits gebildeten Nitroso-Verbindungen abzubauen.

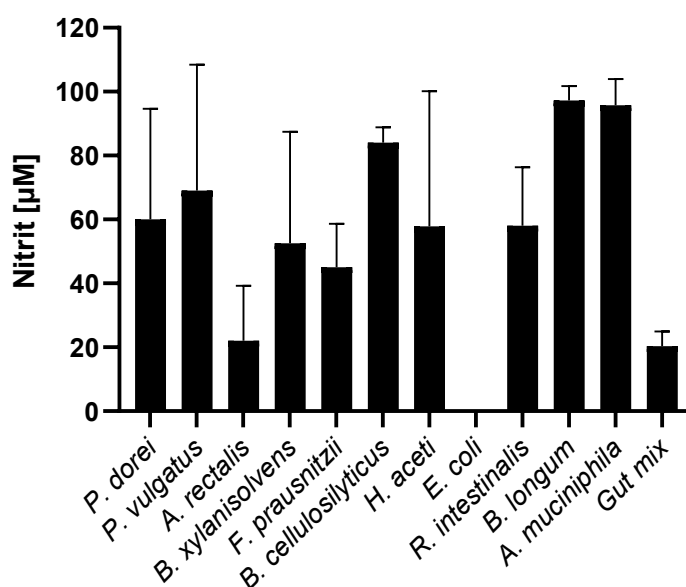


Abbildung 63: Nitrit Abbau durch Darmorganismen. Gezeigt ist der gemessene Nitritgehalt nach der Inkubation des API-Ansatzes mit den verschiedenen Darmorganismen. Der Reaktionsansatz wurde jeweils mit 100 μM Nitrit versetzt. Am Ende der Inkubation wurde die verbliebende Nitrit-Konzentration kolorimetrisch mit der Lungesreagenz-Methode ermittelt. Die Balken geben die Mittelwerte aus 12 Experimenten an. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

3.3.3 Abbau von NA-Enalapril und NA-Propranolol durch *E. coli*

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die ausgesuchten Vertreter der Darmmikrobiota in der Lage sind N-Nitroso-API abzubauen. Um diese Fragestellung genauer zu untersuchen, wurden die vorherigen Reaktionsansätze wiederholt. Dabei wurden die APIs gegen Nitroso-API ausgetauscht. Da die vorherigen Ergebnisse für *E. coli* am auffälligsten waren, wurden die folgenden Experimente nur mit diesem Organismus durchgeführt. Um

einen Abbau feststellen zu können, wurden *E. coli* Zellen in einer OD_{600} von 10 mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,5 μM ; 2 μM und 5 μM) an NA-Enalapril und NA-Propranolol versetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Reaktionsansätze mit Acetonitril abgestoppt und die N-Nitroso-API-Konzentrationen mittels LC-MS (BfArM, Bonn, Deutschland) gemessen (Abb. 64).

Für beide Verbindungen wurde in Anwesenheit von *E. coli* eine geringere Konzentration im Vergleich zu den Ansätzen ohne Zellen gemessen. In den Ansätzen mit 5 μM wurden nach 24 h für beide Verbindungen weniger als 4 μM gemessen (Abb. 64 A). Nach der Inkubation von 2 μM NA-Enalapril mit *E. coli* wurden nur noch $0,4 \mu\text{M} \pm 0,06 \mu\text{M}$ detektiert. Von den anfänglichen 0,5 μM wurde nach der Inkubation nur noch ein Zehntel ($0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$) der Anfangskonzentration von NA-Enalapril wiedergefunden (Abb. 64 A). Auch die Konzentration an NA-Propranolol war nach der Inkubation mit *E. coli* Zellen deutlich geringer. Hier wurden ausgehend von 2 μM und 0,5 μM nach 24 h nur noch $0,04 \pm 0,01 \mu\text{M}$ beziehungsweise $0,15 \pm 0,06 \mu\text{M}$ NA-Propranolol gemessen (Abb. 64 B). In den Ansätzen ohne *E. coli* hingegen, gab es keine signifikanten Veränderungen der NA-API-Konzentration. Dies deutete darauf hin, dass *E. coli* zum Abbau der Nitroso-Verbindungen beitrug.

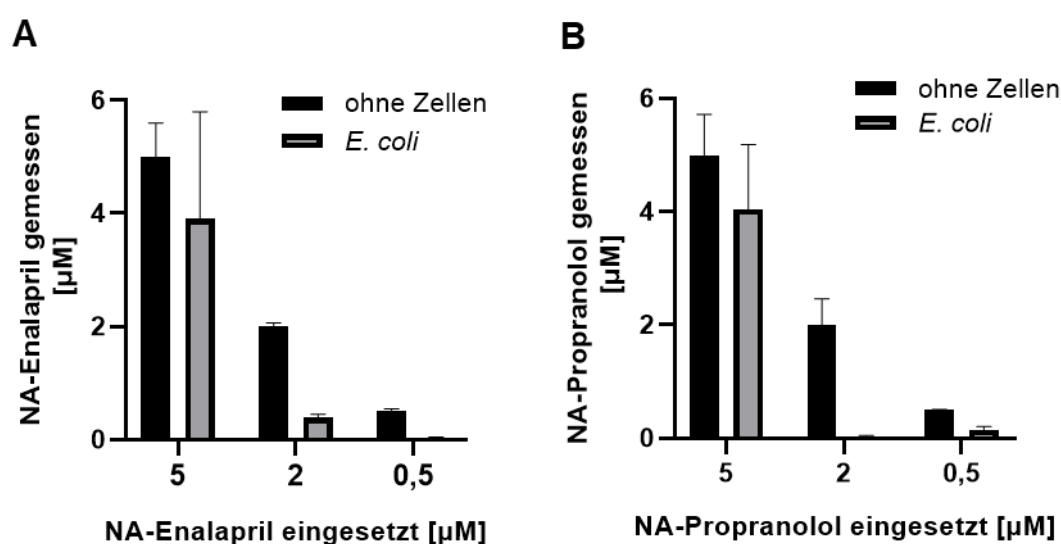


Abbildung 64: Abbau von NA-Enalapril (A) und NA-Propranolol (B) durch *E. coli*. Alle Inkubationen erfolgten während 24 h bei 37°C mit ausgewachsenen *E. coli* Zellen bei einer $OD_{600\text{nm}}$ von 10. Die Reaktionen wurden jeweils mit Acetonitril abgestoppt. Die N-Nitroso-API wurde mittels LCMS detektiert (BfArM, Bonn, Deutschland). Zum Vergleich wurden Reaktionsansätze mit und ohne Zellen durchgeführt. Die Experimente wurden in drei technischen Replikaten durchgeführt. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Zusammenfassend verdeutlichten die Ergebnisse aus Kapitel 3.3, dass Fluoxetin und Propranolol in ihren Tageshöchstdosen eine hemmende Wirkung auf die getesteten Darmorganismen haben. Zusätzlich wurde festgestellt, dass eine chemische Nitrosierung von Enalapril stark pH-Wert abhängig ist. Die Untersuchung der Bildung von N-Nitroso-Verbindungen zeigten, dass die ausgewählten Darmorganismen keine Nitrosierung durchführten. Im Gegenteil deuteten die Ergebnisse in Kapitel 3.3.3 daraufhin, dass *E. coli* möglicherweise an einem Abbau von N-Nitroso-API beteiligt sein könnte.

4. Diskussion

Der menschliche Intestinaltrakt gilt als der von Prokaryoten am dichtesten besiedelten Bereich des menschlichen Körpers (Sender *et al.*, 2016). Zusätzlich ragt dieses Organ durch eine hohe Diversität an Organismen hervor (Qin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). Die genaue Zusammensetzung der Darm-Mikrobiota ist von Mensch zu Mensch unterschiedlich und wird sowohl durch genetische Faktoren des Wirtes (Ley *et al.*, 2008) als auch durch äußere Faktoren wie dessen geografischen Herkunft (Rehman *et al.*, 2016) oder die Ernährung (David *et al.*, 2014; Wexler & Goodman, 2017) beeinflusst. Trotz der hohen Variabilität gelten die Bacillota und Bacteroidota als dominierende Phyla des menschlichen Dickdarms. Innerhalb der Bacteroidota, welche unter anderem Gattungen wie *Alistipes*, *Prevotella* und *Parabacteroides* umfasst (Wexler & Goodman, 2017), gehören die Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* zu den Hauptvertretern der menschlichen Darmmikrobiota (The Human Microbiome Project Consortium, 2012; Forster *et al.*, 2019; King *et al.*, 2019).

Bei etwa 400 verschiedenen Bakterien-Arten, die die Darmmikrobiota eines Menschen umfasst ist ein gutes Zusammenspiel zwischen den einzelnen Organismen aber auch zwischen den Bakterien und ihrem Wirtsorganismus erforderlich (Qin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). So wurde in den letzten Jahren die Bedeutung der Darmbakterien für die menschliche Gesundheit immer deutlicher. Diese Organismen spielen nicht nur eine Rolle in der Abwehr von Pathogenen (Kamada *et al.*, 2013) sowie in der Entwicklung des menschlichen Immunsystems (Tanaka & Nakayama, 2017) sondern werden mittlerweile auch mit Krankheiten wie Darm-Krebs oder dem Parkinson-Syndrom in Verbindung gebracht (Tilg *et al.*, 2018; Ternes *et al.*, 2022; Duan *et al.*, 2024).

Zusätzlich spielen die Darmorganismen eine wichtige Rolle im Abbau von für den Menschen unverdaulichen Nahrungsmitteln, wie beispielsweise komplexen Kohlenhydrate (Dodd *et al.*, 2011). Durch deren Verstoffwechselung bilden die Organismen kurzkettige Fettsäuren wie Propionat, Succinat und Acetat, sowie in kleineren Mengen auch Butyrat, was wiederum als Energiequelle für die menschlichen Kolonozyten dient (Louis & Flint, 2009; Den Besten *et al.*, 2013). In Bezug auf Kohlenhydrate, sind es besonders Spezies der Familie Bacteroidaceae, welche Enzyme zum Abbau von komplexen Polysacchariden wie z.B. Hemicellulosen besitzen (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012).

4.1 Optimierung der Succinat-Produktion in *P. vulgatus*

Die Produktion von Fettsäuren durch Mikroorganismen gewann in den letzten Jahren nicht nur aufgrund von gesundheitlichen Aspekten an Aufmerksamkeit (Mirzaei *et al.*, 2021; Ternes *et al.*, 2022; Duan *et al.*, 2024), sondern auch das Interesse an deren Nutzung zur Produktion von sogenannten Plattformchemikalien nimmt stetig zu (Varghese *et al.*, 2022). Hierbei handelt es sich um Ausgangsstoffe, welche für die Produktion einer Vielzahl an Chemikalien benötigt werden (Varghese *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2023). So wird Propionat beispielsweise für die Herstellung von Kosmetika und Pharmazeutika (Döring & Basen, 2024) verwendet. Succinat zählt ebenfalls zu einer der meistproduzierten Plattformchemikalien weltweit und spielt unter anderem in der Kosmetik- und Lebensmittel-Industrie wie auch in der Pharmazie eine wichtige Rolle (Nghiem *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2022). Aufgrund des steigenden Bedarfs an Plattformchemikalien und der begrenzten Verfügbarkeit an fossilen Rohstoffen, wächst das Interesse an biotechnologischen Herstellungsmethoden sowie eine auf erneuerbaren Ressourcen basierende Produktion (Nghiem *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Kumar *et al.*, 2022; Kim *et al.*, 2023). Besonders interessant sind für die biotechnologische Produktion dementsprechend Mikroorganismen, welche kurzkettige Fettsäuren durch den Abbau von Pflanzenbestandteilen produzieren. Neben *E. coli* und *M. succiniciproducens* (Lee *et al.*, 2006; Thakker *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2014) hat daher in den letzten Jahren auch das Interesse an Spezies der Familie Bacteroidaceae als Produzenten von Plattformchemikalien zugenommen (Isar *et al.*, 2006; Lück & Deppenmeier, 2022; Lück, 2023; Clausen *et al.*, 2024). Ein Vertreter dieser Familie ist *P. vulgatus* (Eggerth & Gagnon, 1933; García-López *et al.*, 2019).

Die Verstoffwechslung von Mono- und Di-Sacchariden läuft in *P. vulgatus* über die Glykolyse und den Pentosephosphatweg (PPW) bis hin zur Bildung von Phosphoenol-Pyruvat (PEP) (Abb. 65 a). Hier spaltet sich der Stoffwechsel von PEP in den fermentativen (Abb 65 b) und den respiratorischen (Abb. 65 c) Zweig. Für die Succinat-Produktion spielt vor allem der reduktive Teil des Citratzyklus eine ausschlaggebende Rolle. Hierbei katalysiert die PEP-Carboxykinase (BVU_0983 und BVU_0976) in einem ersten Schritt unter dem Verbrauch von CO₂ und der Freisetzung von ATP die Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat. Dieses Produkt wird wiederum von der Malat-Dehydrogenase (BVU_0462) zu Malat und dann über die Fumarase (BVU_1859) weiter zu Fumarat umgewandelt. Dieses Intermediat dient wiederum als terminaler

Elektronenrezeptor in der Atmungskette von *P. vulgatus*. Eine membranständige Fumarat-Reduktase (BVU_1239-1241) katalysiert hierbei die Reduktion von Fumarat zu Succinat. Die letztgenannte Verbindung akkumuliert zum Teil als Endprodukt, kann aber auch weiter zu Propionat verstoffwechselt werden. Hierfür wandelt erst eine CoA-Transferase (BVU_1163) Succinat zu Succinyl-CoA um. Anschließend erfolgt die Bildung von Methylmalonyl-CoA über die Methylmalonyl-CoA-Mutase (BVU_0309-0310). Nach einer Konfigurationsänderung von (R)- zu (S)-Methylmalonyl-CoA durch die Methylmalonyl-CoA-Epimerase (BVU_2792) erfolgt die Decarboxylierung zu Propionyl-CoA durch die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (BVU_1465, BVU_2491 und BVU_3102). Abschließend wird Propionyl-CoA zu Propionat umgewandelt, wobei die CoA-Transferase (BVU_1163) CoA zur Bildung von Succinyl-CoA auf Succinat transferiert.

Parallel zum respiratorischen Ast verläuft in *P. vulgatus* ausgehend von PEP der fermentative Zweig. Dieser beginnt mit der Umwandlung von PEP zu Pyruvat. Dieser Schritt wird durch die Pyruvat-Kinase (BVU_0876) katalysiert und führt zur Generierung von ATP. Pyruvat wird dann einerseits durch eine Lactat-Dehydrogenase (BVU_2499) zu Lactat reduziert oder durch die Pyruvat:Formiat-Lyase (BVU_2880) zu Formiat und Acetyl-CoA gespalten. Zusätzlich katalysiert die Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787) die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA unter der Freisetzung von CO₂ und Reduktionsäquivalenten in Form von reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}). Über die Phosphotransacetylase (BVU_0523) und die Acetatkinase (BVU_0524) wird Acetyl-CoA in zwei abschließenden Schritten zu Acetat umgewandelt. Diese Reaktion führt zusätzlich zur Generierung von einem ATP.

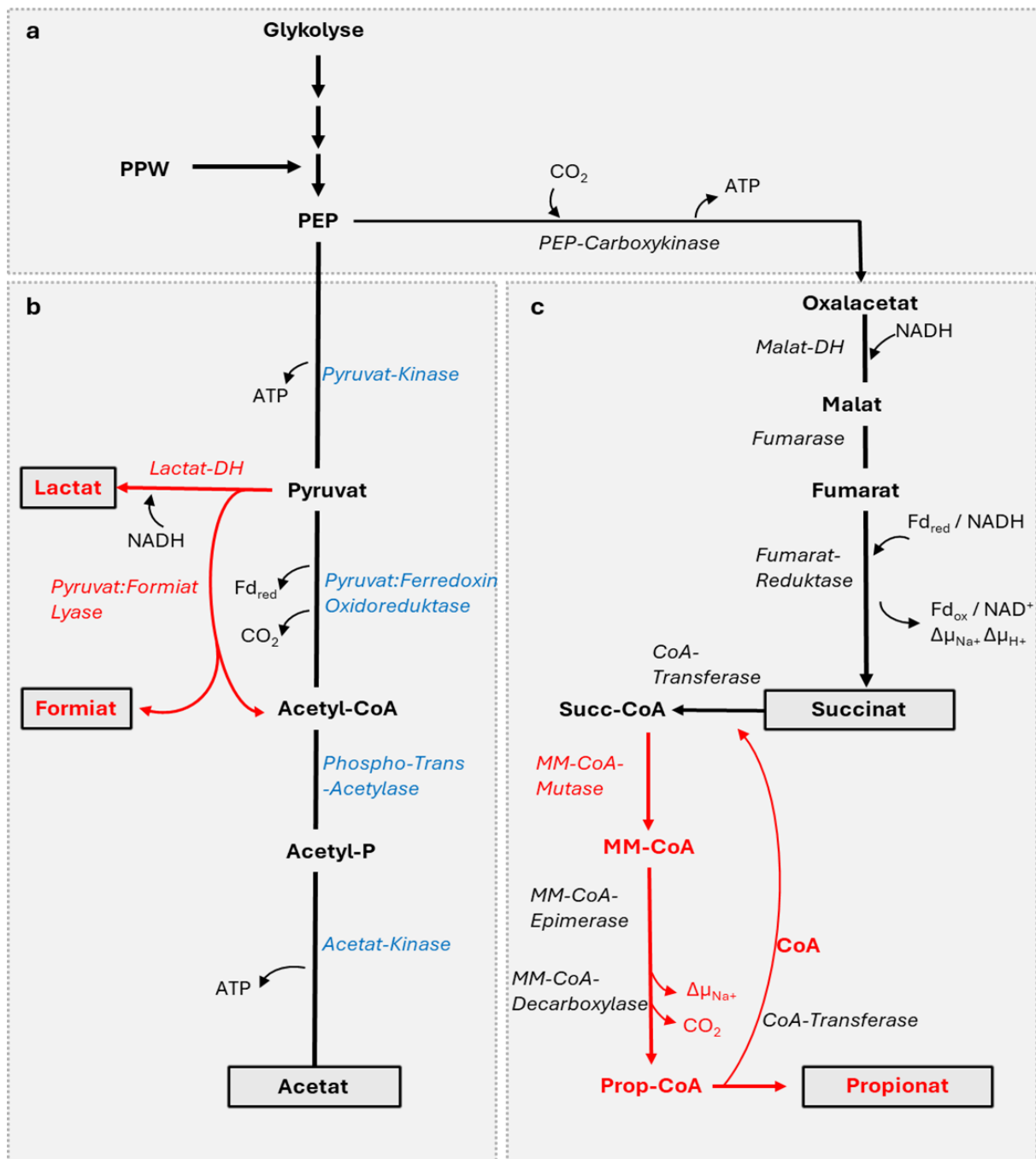


Abbildung 65: Schematische Darstellung des zentralen Kohlenstoff-Metabolismus von *P. vulgatus*.

Dargestellt sind die Abbau-Wege von Monosacchariden zu PEP (a) sowie die Aufteilung des Kohlenstoff-Flusses in den fermentativen (b) und reduktiven (c) Ast. Freigesetzte Endprodukte sind schwarz umrahmt. Die jeweilig benötigten Enzyme sind kursiv dargestellt. Die in *P. vulgatus* 3xKO (Lück., 2023) bereits ausgeschalteten Stoffwechselwege sind in rot markiert. Die blau markierten Enzyme stellen die in dieser Arbeit gewählten Angriffsziele dar. PPW: Pentose-Phosphat-Weg; PEP: Phosphoenol-Pyruvat; DH: Dehydrogenase; MM: Methyl-Malonyl; CoA: Coenzym-A; Fd: Ferredoxin; ox: oxidiert; red: reduziert; ATP: Adenosin-tro-Phosphat; NAD(H): Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid.

4.1.1 Markerlose Deletion von Genen aus dem zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. vulgatus* zur Steigerung der Succinat-Produktion

In Bezug auf die Succinat-Produktion in *P. vulgatus* konnten in den letzten Jahren schon einige Erfolge verzeichnet werden. Vor allem durch die Etablierung eines markerlosen Deletionssystems basierend auf dem *sacB*-System (Neff *et al.*, 2023) wurden neue Türen geöffnet. Durch die Deletion der Methylmalonyl-CoA-Mutase konnte somit bereits die Verstoffwechslung von Succinat zu Propionat unterbunden werden (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024). Neben der Eliminierung von Propionat als unerwünschtem Nebenprodukt wurde so fast eine Verdopplung der Succinat-Produktion erreicht (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024). Zusätzlich konnten die für die Lactat-Dehydrogenase und Pyruvat-Formiat-Lyase kodierenden Gene bereits aus dem Genom von *P. vulgatus* deletiert werden was zur Unterbindung der Lactat- und Formiat-Synthese führte (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024). Zu Beginn dieser Arbeit lag somit bereits ein Stamm vor, welcher neben Succinat nur noch Acetat als Nebenprodukt bildete (*P. vulgatus* 3xKO, Abb. 65).

Da aus industrieller Sicht die Entfernung von unerwünschten Nebenprodukten erhebliche Kosten mit sich bringt, wäre ein Homo-Succinat-Produzent wünschenswert. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht auch die Bildung von Acetat als letztes Nebenprodukt zu unterbinden.

4.1.1.1 Deletion der Pyruvat-Kinase in *P. vulgatus*

Da die Produktion von Acetat im fermentativen Ast über mehrere Schritte erfolgt, sollte in einem ersten Ansatz das für die Pyruvat-Kinase kodierende Gen *bvu_0876* deletiert werden (siehe Kapitel 3.1.1). Ziel war hierbei die Unterbindung der Verstoffwechslung von PEP zu Pyruvat. Dadurch sollte PEP komplett für den respiratorischen Ast und folglich für die Succinat-Produktion zur Verfügung stehen.

Obwohl die Deletion von *bvu_0876* auf Genotyp-Ebene erfolgreich war (Abb. 5) produzierte der resultierende Stamm *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ weiterhin Acetat (Abb. 6).

Während die meisten zur Glykolyse befähigten Bakterien die Pyruvat-Kinase (PK) zur Umwandlung von PEP in Pyruvat nutzen, gibt es auch einige Organismen wie *Bacteroides symbiosus* oder *Asteroleplasma anaerobium* denen dieses Enzym fehlt (Petzel *et al.*, 1989; Reeves, 1971). In diesen Bakterien wurde eine Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK) beschrieben, welche die Rolle der PK bei der Umwandlung von PEP zu Pyruvat übernimmt (Reeves, 1968; Petzel *et al.*, 1989). Hauptsächlich ist die PPDK allerdings für ihre Rolle in der Gluconeogenese bekannt, wo das Enzym die Reaktion von Pyruvat zu PEP katalysiert (Hutchins *et al.*, 2001; Tjaden *et al.*, 2006). Dennoch konnte der PPDK aus einigen Organismen wie beispielsweise den Propionibakterien eine reversible Reaktion nachgewiesen werden (Evans & Wood, 1968).

Basierend auf diesen Daten wurde bioinformatisch analysiert, ob *P. vulgatus* ebenfalls über eine PPDK verfügt. Tatsächlich wurde für den Organismus eine annotierte PPDK (BVU_3358) gefunden. Über eine Transkriptanalyse wurde gezeigt, dass das für die PPDK kodierende Gen *bvu_3358* unter normalen Wachstumsbedingungen in *P. vulgatus* 3xKO exprimiert wird (Abb. 7 a). Interessanterweise war die Expression von *bvu_3358* in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0876$ sogar um 50 % erhöht (Abb. 7 b), was darauf hindeuten könnte, dass die PPDK auch in *P. vulgatus* in der Lage ist die Aufgabe der PK zu übernehmen. Um diese Fragestellung näher zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit erstmals BVU_3358 in *E. coli* produziert, aufgereinigt und die Enzymaktivität über einen diskontinuierlichen, kolorimetrischen Assay bestimmt. Die Messung der Enzymreaktion nach Putnins und Yamada (1975) basierte hierbei auf der Freisetzung beziehungsweise dem Verbrauch von PPi (Abb.9).

In dieser Arbeit konnte eine spezifische Aktivität der PPDK von 3 U/mg Protein in Richtung PEP und 157,6 U/mg Protein in Richtung Pyruvat festgestellt werden, woraus abgeleitet werden konnte, dass das Enzym in beide Richtungen aktiv ist. Dies ist ebenso der Fall in *Acetobacter aceti* bei dem eine höhere spezifische Aktivität der PPDK in Richtung Pyruvat (5,8 U/mg Protein) als in Richtung PEP (1,8 U/mg Protein) festgestellt wurde (Schwitzgubel & Ettlinger, 1979). Obwohl die Bildung von Pyruvat durch die PK thermodynamisch günstiger ist (Thauer *et al.*, 1977) und somit meistens bevorzugt genutzt wird, gibt es also Organismen, in denen die PPDK statt der PK vorliegt oder aber beide Enzyme aktiv sind. In *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* beispielsweise sind sowohl die PPDK als auch die PK in der

Glykolyse aktiv. Die Regulation der beiden Enzyme erfolgt über die Präsenz von PPI, AMP und ADP (Bielen *et al.*, 2010).

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.1.3 sowie die Literaturrecherche also darauf hin, dass BVU_3358 durchaus die Generierung von Pyruvat in der Deletionsmutante *P. vulgatus* 3xKO Δ 0876 übernehmen kann und deshalb kein Unterschied in der Produktion von Acetat festgestellt wurde.

Dass die Aufgabe der PK übernommen wird, deutet darauf hin, dass die Pyruvat-Synthese für das Überleben von *P. vulgatus* von essenzieller Bedeutung ist. Dies liegt möglicherweise daran, dass Pyruvat ein wichtiger Baustein zur Herstellung von Aminosäuren wie beispielsweise Alanin darstellt (Fairhurst *et al.*, 1956; Catlett *et al.*, 2020). Zusätzlich werden im fermentativen Ast von *P. vulgatus* ausgehend von Pyruvat weitere wichtige Produkte wie Acetyl-CoA, CO₂ aber auch Reduktionsäquivalente gebildet (Abb. 65). Dementsprechend war es wichtig die für den Organismus lebensnotwendigen Zwischen- oder Neben-Produkt der Acetat-Bildung zu detektieren, und dessen Produktion aufrecht zu erhalten. Hierfür sollten die Gene des fermentativen Astes sukzessiv deletieren werden.

4.1.1.2 Deletionsversuch der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (BVU_3787), Phosphotransacetylase (BVU_0523) und der Acetatskinase (BVU_0524) in *P. vulgatus*

Da die Deletion der PK nicht zum gewünschten Phänotyp geführt hat sollte das im Stoffwechsel folgende Enzym Pyruvat:Ferredoxin Oxidoreduktase (PFOR) inaktiviert werden. Dieses Enzym ist für die Umwandlung von Pyruvat zu Acetyl-CoA verantwortlich ist. Die gestörte Produktion von Acetyl-CoA sollte somit zur Unterbindung der nachfolgenden Acetyl-Phosphat- und Acetat-Generierung führen. Allerdings war die Deletion des für die PFOR kodierenden Gens *bvu_3787* in dieser Arbeit nicht erfolgreich (Kapitel 3.1.2.1). Die PFOR scheint somit eine zentrale Rolle im Stoffwechsel von *P. vulgatus* zu spielen. Ähnliche Beobachtungen wurden in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* gemacht (Zhou *et al.*, 2015). Die Deletion des für die PFOR kodierenden Gens führte in diesem Organismus zu erheblichen Wachstumseinschränkungen. Zudem wurde beobachtet, dass die Inaktivierung der PFOR zu einer erhöhten Expression der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) sowie einer einhergehenden Steigerung der Formiat-Freisetzung führten (Zhou *et al.*, 2015). Die Autoren gingen davon aus,

dass die Verstoffwechslung von Pyruvat zu Acetyl-CoA in der PFOR-Deletionsmutante über die PFL umgeleitet wurde. Da in dem hier genutzten Stamm *P. vulgatus* 3xKO das Gen der PFL bereits in einer früheren Studie deletiert wurde (Lück, 2023) (Abb. 65) hat dieser Organismus keine weitere Möglichkeit Pyruvat zu Acetyl-CoA zu verstoffwechseln. Acetyl-CoA ist allerdings ein essentielles Zwischenprodukt für die Bildung von ATP durch Substratkettenphosphorylierung (Schütze *et al.*, 2020) und wird zudem in der Fettsäurebiosynthese (Fujita *et al.*, 2007) sowie in der Herstellung von Aminosäuren (Zhu *et al.*, 2022) benötigt. Möglicherweise ist der letale Effekt der Deletion von *bvu_3787* also auf die fehlende Produktion von Acetyl-CoA zurückzuführen.

Um die Acetat-Bildung zu verringern und gleichzeitig die Produktion von Acetyl-CoA zu gewährleisten, sollten in einem nächsten Schritt die Gene der Phospho-Trans-Acetylase (PTA; BVU_0523) und der Acetatkinase (ACK; BVU_0524) deletiert werden. Dies sollte der Unterbindung der Verstoffwechslung von Acetyl-CoA zu Acetyl-Phosphat und weiter zu Acetat dienen (Kapitel 3.1.2.2). Allerdings schienen auch diese Mutationen für *P. vulgatus* 3xKO letal zu sein da aus der zweiten homologen Rekombination zur Deletion nur Wild-Typ-Revertanten hervorgingen. Für *E. coli* konnte gezeigt werden, dass eine Deletion der Gene *pta* und *ack* das Wachstum unter anaeroben Bedingungen hemmt, während das aerobe Wachstum nicht beeinflusst wird (Hasona *et al.*, 2004). Eine ähnliche Beobachtung wurde von Murray *et al.* (1983) in *Clostridium saccharolyticum* gemacht, wo die Deletion von *ack* eine verringerte Wachstumsrate zur Folge hatte. Die Autoren erklärten das Phänomen über die fehlende Umwandlung von Acetyl-Phosphat, wodurch ein Teil der ATP-Produktion als Energieträger unterbrochen wird (Murray *et al.*, 1983; Hasona *et al.*, 2004). Da *P. vulgatus* allerdings weitere Möglichkeiten zur ATP-Produktion hat, musste hier ein anderes Phänomen Grund für die letale Auswirkung sein.

Möglicherweise lässt sich der letale Effekt mit dem Zusammenbruch des Stoffwechsels der jeweiligen Deletionsmutanten in *P. vulgatus* erklären. Durch die Deletion des Gene *ack* und *pta* kommt es zu einem Rückstau der zuvor im Stoffwechselweg gebildeten Produkte Acetyl-Phosphat und Acetyl-CoA. Das folglich vorliegende Ungleichgewicht aus Edukt und Produkt führt zur Hemmung der Funktionalität der PFOR und demnach zu einer Anhäufung von Pyruvat. Um einen weiteren Rückstau der Metabolite zu verhindern, müssten somit Lactat und Pyruvat ausgeschieden werden. Dieses Phänomen wurde beispielsweise in

Clostridium beijerinckii nach der Inaktivierung der PTA beobachtet (Wang *et al.*, 2013). Auch in *Corynebakterium glutamicum* führte die Deletion der Gene für die Acetat-Produktion sowie der LDH zu einer erhöhten Pyruvat-Freisetzung (Litsanov *et al.*, 2012).

In dem in dieser Arbeit verwendeten Stamm *P. vulgatus* 3xKO wurde das Gen zur LDH Produktion deletiert und somit müsste das überschüssige Pyruvat direkt freigesetzt werden. Der hier beobachtete letale Effekt der Deletion, der Gene *ack* und *pta*, deuten demnach darauf hin, dass das Bakterium über keine Möglichkeit der Pyruvat-Freisetzung verfügt. Folglich könnte der Stoffwechsel des Organismus durch einen Überschuss an Pyruvat und einen weiteren Rückstau der Metabolite zusammenbrechen.

4.1.1.3 Regulation der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase

Da die Deletion der einzelnen Gene des fermentativen Astes von *P. vulgatus* nicht möglich war (Kapitel 4.1.1.2) sollte die Acetat-Produktion reguliert werden. Ziel hierbei war die Generierung eines Stammes, welcher bei minimaler Acetat-Bildung ausreichende Mengen Acetyl-CoA zur Biosynthese generiert.

Hierzu sollte das durch Rhamnose induzierbare System von Mimee *et al* (2015) angepasst werden. Dieses System der positiven Regulation wurde innerhalb der Bacteroidota erstmals in *B. thetaiotaomicron* verwendet. Der Aktivator RhaK aktiviert hierbei in Anwesenheit von Rhamnose den Promotor $P_{RhaKIPAO}$ des Rhamnulo-Kinase Gens (*bt_3763*) und somit die Transkription der für die Verstoffwechslung von Rhamnose notwendigen Gene (Patel *et al.*, 2008; Mimee *et al.*, 2015). Durch die Nachschaltung eines Nanoluc Gens, welches für eine Nanoluc-Luciferase kodiert, konnte gezeigt werden, dass das System eine regulierte Expression eines Zielgens in *B. thetaiotaomicron* erlaubte (Mimee *et al.*, 2015). Auch in *P. vulgatus* konnte gezeigt werden, dass die Nanoluc Aktivität mit zunehmender Rhamnose-Konzentration steigt und dass das System somit zur Regulation der Genexpression geeignet ist (Lück & Deppenmeier, 2022). Allerdings kann *P. vulgatus*, wie *B. tehtaiotaomicron*, Rhamnose auch als Kohlenstoff-Quelle verwerten (Pudlo *et al.*, 2022). Für *B. tehtaiotaomicron* wurde sogar eine erhöhte Acetat-Produktion durch die Nutzung von Rhamnose als C-Quelle beschrieben (Xie *et al.*, 2024). Da das übergeordnete Ziel dieser Arbeit die Verringerung der Acetat-Produktion über die Promotorregulation war, musste erst die Verwertung von Rhamnose in *P. vulgatus*

unterbunden werden. Zusätzlich wurde überprüft, ob dies zu einer Optimierung des Nanoluc-Systems in *P. vulgatus* führt.

Bioinformatische Analysen ergaben, dass in *P. vulgatus* der L-Rhamnose-H⁺-Symporter (RS, BVU_0597) für die spezifische Aufnahme von Rhamnose zuständig ist. Die L-Rhamnose-Isomerase (RI, BVU_0596) wandelt das Substrat zu Rhamnulose um. Diese wird dann über die Rhamnulokinase (RK, BVU_0595) zu L-Rhamnulose-1-Phosphat phosphoryliert, bevor das Intermediat von der Rhamnulose-1-phosphat-Aldolase weiter verstoffwechselt wird.

Die für die Enzyme kodierenden Gene liegen in *P. vulgatus* in der gleichen Anordnung wie bei *B. thetaiotaomicron* vor. Hier befinden sich *rhaK* (Rhamnulokinase), *rhaI* (L-Rhamnose-Isomerase), *rhaP* (L-Rhamnose-H⁺-Symporter), *rhaA* (rhamnulose-1-phosphat-Aldolase) und *rhaO* (lactaldehyd reductase) innerhalb eines Operons (Patel *et al.*, 2008). Aufgrund der Nähe der einzelnen Gene zueinander, wurde davon ausgegangen, dass auch in *P. vulgatus* diese Gene in einem Operon vorliegen. Im Gegensatz zu *B. thetaiotaomicron* liegt in *P. vulgatus* kein homologes Gen zu *rhaO* in unmittelbarer Nähe des Rhamnose-Operons. Der Promotorbereich der katabolischen Enzyme liegt in *B. thetaiotaomicron* stromaufwärts von *rhaK* und wird durch den Aktivator RhaR aktiviert (Patel *et al.*, 2008). RhaR wird hierbei von einem eigenständigen Promotor transkribiert (Patel *et al.*, 2008). Mittels Blast-Analyse konnte für *P. vulgatus* ein homologes Gen (*bvu_0604*) zu *rhaR* (*bt_3768*) ermittelt werden, welches als Transkriptions-Regulator annotiert ist. Aufgrund der Distanz von 11648 bp zum Rhamnose-Operon, war davon auszugehen, dass auch in *P. vulgatus* die Regulation des Aktivators über einen eigenständigen Promotor stattfindet.

Um also zu testen, ob eine Optimierung der Regulation über den P_{RhaKIPAO} in *P. vulgatus* möglich ist, wurden der Symporter (BVU_0597), die Rhamnulokinase (BVU_0595) und die L-Rhamnose-Isomerase (BVU_0596) deletiert. In einem parallelen Ansatz wurden nur die Kinase und Isomerase deletiert (Kapitel 3.1.3.1). In beiden Fällen zeigten die generierten Stämme *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0596 und *P. vulgatus* 3xKO Δ0595-0597 mit Rhamnose als Substrat kein Wachstum mehr (Abb. 18). *P. vulgatus* besitzt somit keinen alternativen Weg zur Verstoffwechslung von Rhamnose.

Als nächstes wurde die Regulierbarkeit der Genexpression über den Promotor P_{RhaKIPAO} der Stämme mit Hilfe des Nanoluc-Reporter-Gens getestet und mit der Aktivität in *P. vulgatus* 3xKO verglichen (Abb. 22). Hierbei stellte sich heraus, dass die maximale Aktivität der Nanoluc-

Luciferase und somit die maximale Expression des *nanoluc* Gens in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0597$ deutlich geringer war als in den anderen beiden Stämmen, welche noch über den Rhamnose-Symporter verfügten. Da es trotz fehlendem Symporter zu einer Aktivität kam lässt sich vermuten, dass Rhamnose in geringen Mengen unspezifisch in die Zelle gelang. Dennoch war wartungsgemäß für eine optimale Aufnahme und Regulation der Symporter von entsprechender Bedeutung. Zusätzlich zeigten die Daten, dass gerade bei geringen Konzentrationen an Rhamnose die Regulation in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ sensibler reagierte und die Nanoluc Aktivität höher war als in dem Ausgangsstamm, welcher Rhamnose verstoffwechseln konnte. Eine Untersuchung der verbleibenden Rhamnose im Medium zeigte, dass in *P. vulgatus* 3xKO erst ab einer Konzentration von 0,6 mM zum Zeitpunkt des Nanoluc Assay noch Rhamnose im Überstand vorhanden war. Diese Daten passten zu der Nanoluc-Aktivität, wo ab der gleichen Konzentration die Aktivität dieses Stammes mit der von *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ vergleichbar war (Abb. 22). Aus diesen Daten ließ sich ableiten, dass die Induktion des Promotors durch die schnelle Verstoffwechslung von Rhamnose in *P. vulgatus* 3xKO verringert wurde.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in *E. coli* gemacht (Wilms *et al.*, 2001). Hier wurde durch die Deletion des für die Rhamnulo-Kinase kodierenden Gens *rhaB* ebenfalls die Verstoffwechslung von Rhamnose verhindert, was zu einer besseren Regulation des Rhamnose-induzierbaren Promotors P_{rhaBAD} führte (Wilms *et al.*, 2001). Durch die Unterbrechung der Rhamnose-Verstoffwechslung in *E. coli* war die Aktivität Enzyms Carbamoylase, welches durch den Promotor P_{rhaBAD} reguliert wurde, bei geringen Rhamnose Konzentrationen etwa 10-mal höher als in dem Stamm, welcher Rhamnose als Wachstumssubstrat nutzen konnte (Wilms *et al.*, 2001). Auch in dem hier generierten Stamm *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ unterschied sich die Aktivität der Nanoluc zu *P. vulgatus* 3xKO um den Faktor 10.

Zusammenfassend führte die Deletion der Gene zur Verstoffwechslung von Rhamnose zu einer sensibleren Regulation des Promotors. Der Rhamnose-Symporter hingegen erwies sich als unverzichtbar für die ausreichende Aufnahme von Rhamnose und somit für ein sensibles Regulationssystem. Da die Regulation des Rhamnose-Promotors mit dem neu generiertem Stamm *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ also am sensitivsten war, wurde dieser für den weiteren Verlauf der Arbeit genutzt.

Als nächstes wurde eine Kopie des für die PFOR kodierenden Gens in *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596$ unter der Kontrolle des Promotors $P_{RhaKIPAO}$ über das Integrations-Plasmid pMM656 in *P. vulgatus* eingebracht. Mit Hilfe einer Transkriptanalyse konnte gezeigt werden, dass die Induktion des Promotors mit 4 mM Rhamnose zu einer erhöhten Transkriptmenge von *bvu_3787* führte (Abb. 26). Dies war der Nachweis, dafür, dass das Regulationssystem ebenfalls für das Gen der PFOR funktional war.

Da durch die Induktion von Rhamnose nun die Expression von *bvu_3787* und somit die Produktion von Acetyl-CoA, ATP und Acetat regulierbar war, konnte in einem nächsten Schritt die chromosomale Kopie von *bvu_3787* deletiert werden (Abb. 28). Entgegen den Erwartungen zeigte der generierte Stamm *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596 \Delta 3787$ pMM656_RP_3787 allerdings auch ohne die Induktion von *bvu_3787* Wachstum und auch die Acetat-Produktion wurde nicht gehemmt. Da die Expression von *bvu_3787* in dem neu generierten Stamm nur über den Promotor $P_{RhaKIPAO}$ induziert werden konnte, muss hier die Erklärung für das beobachtete Phänomen liegen.

Negativ regulierte Expressionssysteme wie beispielsweise IPTG regulierte Promotoren sind bekannt dafür, dass sie *leaky* sein können und dies auch in Abwesenheit des Induktors zu einer basalen Expression des Zielgens führt (Bhavsar *et al.*, 2001; Fieseler *et al.*, 2012; Parker & Smith, 2012). Da es sich bei $P_{RhaKIPAO}$ um einen positiv regulierten Promotor handelt, ist hier ein bessere Regulierbarkeit gegeben. Während in *E. coli* keine Carbamoylase Aktivität in Abwesenheit von Rhamnose beschrieben wurde (Wilms *et al.*, 2001), konnte in *B. thetaiotaomicorn* auch ohne die Anwesenheit von Rhamnose eine leichte Aktivität des Aktivators RhaR sowie ein erhöhtes Expressionslevel der Gene des Rhamnose-Stoffwechsels beobachtet werden (Patel *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde kürzlich gezeigt, dass *B. thetaiotaomicron* auch ohne den Aktivator RhaR in der Lage ist, Rhamnose zu verstoffwechseln (Xie *et al.*, 2024), was darauf hindeutet, dass die Aktivierung von $P_{RhaKIPAO}$ nicht vollständig vom Aktivator RhaR abhängig ist. Dies ist möglicherweise eine Erklärung für das Wachstum von *P. vulgatus* 3xKO $\Delta 0595-0596 \Delta 3787$ pMM656_RP_3787 auch ohne die Induktion durch Rhamnose. Allerdings konnte sowohl in früheren Studien (Lück & Deppenmeier, 2022) sowie in der vorliegenden Arbeit, ohne Induktion keine Aktivität der Nanoluc-Luciferase detektiert werden, was demnach für die Funktionalität des Systems spricht.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass auf dem Plasmid eine basale Expression von *bvu_3787* vorliegt. Dieses Phänomen wurde in Cyanobakterien beobachtet (Kelly *et al.*, 2018). Hier wurde unabhängig von dem Vorhandensein des Rhamnosepromotors eine leichte plasmidkodierte YFP-Fluoreszenz detektiert (Kelly *et al.*, 2018). Die Autoren schlossen daraus, dass die Integration des Plasmids in das Chromosom von *Synechocystis* sp. zu einem chromosomalen *read-through* und somit zu einer basalen Expression des YFP-Gens führte (Kelly *et al.*, 2018).

Um zu ermitteln, wie die Acetat-Produktion in dem vorliegenden Stamm doch ermöglicht wird, müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Zum einen könnte das für den Aktivator kodierende Gen (*bvu_0604*) sequenziert werden, um mögliche Mutationen, welche zu einer stetigen Aktivierung führen könnten, auszuschließen. Die Ergebnisse des Nanoluc-Luciferase Assay deuteten nicht darauf hin, dass der Promotor *leaky* ist, da die gemessene Lumineszenz in den Stämmen mit dem pMM656_*nanoluc* nicht eindeutig von den Werten des Stammes ohne *nanoluc* Gen abwichen. Ein Ansatz, um diese Möglichkeit zu überprüfen wäre die für die Methyl-Malonyl-CoA-Mutase kodierenden Gene (*bvu_0309-0310*) auf das Plasmid hinter den Promotor $P_{RhaKIPAO}$ zu klonieren und in *P. vulgaris* 3xKO einzubringen. Wäre der Promotor *leaky* so müsste hier die Propionat-Produktion wieder hergestellt werden.

Zusammenfassend wurden in Kapitel 4.1.1 mehrere Ansätze verfolgt, um die Acetat-Produktion in *P. vulgaris* 3xKO zu unterbinden oder zu minimieren. Allerdings schien die Deletion der für die PFOR kodierenden Gene aufgrund der fehlenden Acetyl-CoA-Synthese letal zu sein. Da in dem verwendeten Stamm auch das für die PFL kodierende Gen bereits deletiert war, hatte der Organismus keine Möglichkeit den für die Biosynthese notwendige Baustein zu synthetisieren. Die Deletion der Gene *pta* und *ack* hatte ebenfalls einen letalen Effekt auf *P. vulgaris* 3xKO, welcher wahrscheinlich auf den Zusammenbruch des Stoffwechselweges durch die Akkumulation von Pyruvat zurückzuführen war. Auch die Reduktion der Acetat-Freisetzung über die Regulation von *bvu_3787* war in der vorliegenden Arbeit nicht erfolgreich. Allerdings konnte in Kapitel 4.1.1.3 das Regulationssystem über den Rhamnose-induzierbaren-Promotor durch die Deletion der Rhamnose-Isomerase und Rhamnose-Kinase optimiert werden. Neben der Verwendung der Nanoluc Luciferase konnte zusätzlich über das Einbringen einer plasmidkodierten Kopie von *bvu_3787* dessen Regulation auf Transkriptebene über die Rhamnose-Induktion gezeigt werden. Zudem ermöglichte das

Einbringen der plasmidkodierten Kopie von *bvu_3787* die Deletion der chromosomalen Kopie von *bvu_3787*. Auch wenn das hier entwickelte Regulationssystem noch nicht vollständig einsetzbar ist und weitere Optimierungen notwendig sind, handelt es sich bei den hier erzielten Ergebnissen um wichtige Erkenntnisse für die Entwicklung von genetischen Tools in *P. vulgatus*.

4.1.2 Homologe Überexpression der Gene aus dem PPW in der dreifach Deletionsmutante *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310$ $\Delta 2499$ $\Delta 2880$

Wie sich in Kapitel 4.1.1 herausstellte, bringt die Generierung eines Homosuccinat-Produzenten viele Herausforderungen mit sich, die bisher nicht alle bewältigt werden konnten. Dennoch birgt *P. vulgatus* als Spezies der Familie Bacteroidaceae gegenüber anderen Succinat-Produzenten einen Vorteil zur Produktion von Succinat. Spezies dieser Familie sind für ihre Fähigkeit zum Abbau von pflanzlichen Stoffen wie Hemicellulosen bekannt (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012) und bieten somit eine Möglichkeit zur nachhaltigen Produktion von Plattformchemikalien aus erneuerbaren Rohstoffen.

Mit 20-40 % der gesamten Pflanzenbiomasse, sind die Hemicellulosen neben den Cellulosen der zweithäufigste Bestandteil der pflanzlichen Zellwand (McKendry, 2002; Chassard *et al.*, 2007). Der häufigste Vertreter der Hemicellulosen ist hierbei das Xylan (Dodd & Cann, 2009; Hespell & Whitehead, 1990). Hierbei handelt es sich um ein Heteropolymer mit einem Rückgrat aus β -1,4-verbundenen Xylose-Einheiten. Über eine Maschinerie an Enzymen (siehe Kapitel 4.2) können die Seitenketten abgespalten und die langkettigen Xylane über Xylooligosaccharide bis hin zu den einzelnen Xylose- Monomeren abgebaut und anschließend von den Mikroorganismen verstoffwechselt werden (Dodd & Cann, 2009).

Die Verstoffwechslung von Xylose und anderen Pentosen verläuft in den Bakterien grundsätzlich über den Pentosephosphatweg (PPW). Dieser wird zur Umwandlung von Hexosen zu Pentosen genutzt und dient als Quelle von Glykolyse- Zwischenprodukten wie Fructose-6-Phosphat und Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Eine weitere wichtige Aufgabe des PPW ist die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten in Form von [H].

Der PPW dient allerdings nicht nur als Energie- und Kohlenstoff-Quelle, sondern auch der Bildung von wichtigen Vorläufermolekülen verschiedener Biosynthesewege. So wird Ribose-5-

Phosphat beispielsweise für die Nukleotid-Synthese benötigt (Wood, 1986; Stincone *et al.*, 2015) während Erythrose-4-phosphat zusammen mit Phosphoenolpyruvat in die Synthese von aromatischen Aminosäuren einfließt (Wood, 1986; Shende *et al.*, 2024).

Grundsätzlich wird der PPW in einen oxidativen und einen nicht oxidativen Teil aufgegliedert (Abb. 66). Allerdings gibt es Organismen wie beispielsweise einige thermophile Clostridien (Hungateiclostridiaceae) oder auch das dem Phylum Bacteroidota zugehörigen Bakterium *Segatella copri*, welche nicht alle Gene des oxidativen Abschnittes besitzen (Koendjibiharie *et al.*, 2020). Für *P. vulgatus* konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass alle Gene des PPW vorhanden sind, und bei Wachstum auf Glukose und Xylose exprimiert werden (Franke, 2020; Lück, 2023).

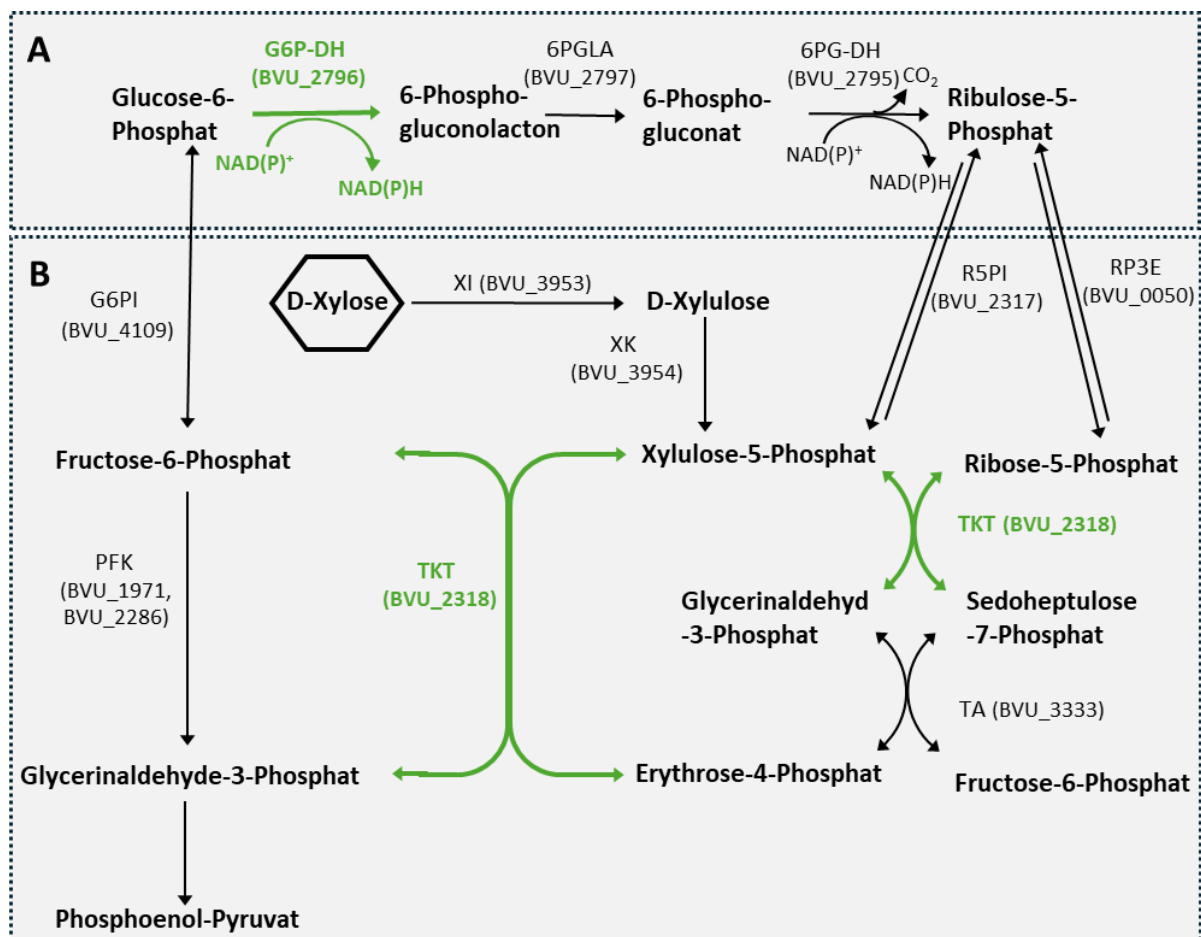


Abbildung: 66: Schematische Darstellung des oxidativen (A) und nicht oxidativen (B) Abschnittes des Pentosephosphatwegs in *P. vulgatus*. Die in dieser Arbeit homolog exprimierten Enzyme sind in grün dargestellt. G6P-DH: Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase; 6PGLA: 6-Phospho-Gluconolactonase; 6PG-DH: 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase; R5PI: Ribulose-5-Phosphat-Isomerase; RP3E: Ribulose-Phosphat-3-Epimerase; TKT: Transketolase; TA: Transaldolase; G6PI: Glukose-6-Phosphat-Isomerase; PFK: Phospho-Frukto-Kinase; XI: Xylose-Isomerase; XK: Xylose-Kinase

Die Aufnahme von Xylose in die Zelle erfolgt über einen Xylose-Protonen-Symporter (BVU_0751). Das Einbringen in den PPW erfolgt in zwei Schritten über die Isomerisierung zu D-Xylulose und die anschließende Phosphorylierung zu Xylulose-5-Phosphat. Die einzelnen Schritte werden jeweils von den Enzymen Xylose-Isomerase (XI, BVU_3953) beziehungsweise Xylulosekinase (XK, BVU_3954) katalysiert.

Wird Glukose nach der Phosphorylierung zu Glukose-6-Phosphat in den PPW eingeschleust, so durchläuft diese als erstes den oxidativen Teil des PPW (Abb. 66 A). In diesem Abschnitt wird Glukose-6-Phosphat in zwei aufeinander folgenden, irreversiblen Reaktionen, und unter der Freisetzung von CO₂ zu Ribulose-5-Phosphat umgewandelt. Diese beiden Schritte werden von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH, BVU_2796) und der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (BVU_2795) katalysiert und gehen mit der Reduktion von NADP⁺/NAD⁺ zu NADPH/NADH einher. Da die G6PDH für das Einschleusen von Glukose-6-Phosphat in den PPW verantwortlich ist, gilt diese als geschwindigkeitslimitierendes Enzym für den oxidativen PPW (Stanton, 2012; Stincone *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2020). Nach der Bildung von Ribulose-5-Phosphat (Ru5P) geht es weiter mit dem nicht oxidativen PPW. Hierbei wird die reversible Umwandlung von Ru5P zu Xylulose-5-Phosphat (Xu5P) und Ribose-5-Phosphat (R5P) von den Enzymen Ribulose-5-Phosphat-Isomerase (R5PI, BVU_2317) und Ribulose-5-Phosphat-Epimerase (R5PE, BVU_0050) katalysiert (Ge *et al.*, 2020; Stincone *et al.*, 2015). Ausgehend von Xu5P und R5P katalysieren die Enzyme Transketolase (TKT, BVU_2318) und Transaldolase (TA, BVU_3333) die reversible Umlagerung von C-Atomen zwischen C3, C5, C6 und C7 Zuckern. Hierbei ist die TKT gleich für zwei unterschiedliche Reaktionen im PPW verantwortlich (Stincone *et al.*, 2015). Das Enzym verwendet den C5 Zucker Xu5P als Ketose-Donor und S7P oder Erythrose-4-Phosphat (E4P) als Aldose-Akzeptor. Dies führt zur Bildung von Sedoheptulose-5-Phosphat (S7P) oder Fruktose-6-Phosphat (F6P) sowie Glycerinaldehyd-3-Phosphat (GA3P) (Schenk *et al.*, 1998; Stincone *et al.*, 2015). Die Transaldolase katalysiert die Umlagerung von C3-Einheiten zwischen S7P und GA3P zu E4P und F6P (Stincone *et al.*, 2015). An diesem Punkt können F6P und GA3P in den EMP-Weg eingeschleust werden. Über die Bereitstellung von F6P und GA3P spielen die TKT und die Transaldolase also eine Schlüsselrolle in der Regulation des C-Fluxes zwischen dem nicht oxidativen PPW und der Glykolyse sowie Gluconeogenese (Wood, 1986; Stanton, 2012; Stincone *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2020).

Über die G6P-Isomerase (BVU_4109), welche eine reversible Umlagerung von F6P zu G6P katalysiert, kann G6P erneut in den oxidativen PPW eingeschleust werden (Acharit *et al.*, 1981), was zu einer weiteren NADH-Bildung führen würde.

Da NADH eine Schlüsselkomponente für die Succinat-Produktion durch den reduktiven Teil des Citratzyklus darstellt, ist davon auszugehen, dass eine Erhöhung der Bildung von Reduktionsäquivalenten durch die Optimierung des PPW die Succinat-Produktion positiv beeinflussen könnte. Tatsächlich wurde in *E. coli* gezeigt, dass eine Überproduktion der Transketolase den Succinat-Ertrag um 13 % erhöht (Zhu *et al.*, 2014). Auch in *P. vulgaris* wurde bereits gezeigt, dass eine homologe Expression der Transketolase (BVU_2318) über den Shuttle-Vektor pG106 die Succinat-Produktion um 35 % erhöhte (Lück, 2023). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Überexpression des für die TKT kodierenden Gens in der dreifach-Deletionsmutante durchgeführt. Wie im Wildtyp-Stamm führte auch hier die homologe Expression zu einer erhöhten Transkriptmenge (Abb. 31 B).

In Bezug auf Succinat wurde, durch die Überproduktion der TKT, in *P. vulgaris* 3xKO pG106_p2499_tkt ein Ertrag von 10,9 mmol Succinat/g TG erzielt (Abb. 33). Dies entsprach im Vergleich zu *P. vulgaris* 3xKO (8,1 mmol Succinat/g Tg) einer Steigerung von 35 %. Somit wurde gezeigt, dass die homologe Expression des *tkt*-Gens in *P. vulgaris*, unabhängig zu den Deletionen im fermentativen Ast und im Propionat-Stoffwechsel, die Succinat-Produktion erhöhte. Ähnlich wie im Wildtyp-Stamm (Lück, 2023), konnte auch hier durch die Überexpression der TKT eine geringe Erhöhung des Substrat-Verbrauchs festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass die erhöhte Aktivität des PPW zu einem verbesserten Flux der Xylose in Richtung des Kohlenstoffmetabolismus führte. Interessanterweise wurde in dieser Arbeit für *tkt* die geringste Transkriptmenge gemessen (Abb. 32), was darauf hindeutet, dass die Transketolase-Abundanz in *P. vulgaris* tatsächlich limitierend für den Flux im PPW sein könnte.

Zhu *et al.* (2014) begründeten die höhere Succinat-Ausbeute durch die *tkt*-Überexpression mit der Aktivierung des oxidativen PPW, und der damit einhergehenden NADH-Produktion, welche eine Schlüsselrolle in der Succinat-Produktion spielt. Als Schlüsselenzym des oxidativen PPW gelten allerdings, wie bereits erwähnt, die Enzyme G6PDH und 6PGDH, da diese zur Bildung von NADPH und NADH beitragen (Stanton, 2012; Stincone *et al.*, 2015; Ge *et al.*, 2020). Zusätzlich wurde in einer früheren Studie gezeigt, dass die Transkriptabundanz von G6PDH und

6PGDH in *P. vulgatus* bei Wachstum auf Xylose im Vergleich zu Wachstum auf Glukose erhöht ist (Lück, 2023). Da die G6PDH zusätzlich die Einschleusung von G6P in den oxidativen PPW bestimmt, bietet dieses Enzym einen vielversprechenden Angriffspunkt zur Regulation des PPW, und somit zur NADH und folglich der Succinat-Produktion in *P. vulgatus*. Aus diesem Grund wurde die G6PDH (BVU_2796) für eine homologe Produktion in *P. vulgatus* 3xKO gewählt.

Die Überexpression von *g6pdh* konnte bereits durch die Bereitstellung größerer Mengen an NADPH in *Corynebacterium glutamicum ssp. lactofermentum* die L-Isoleucin Synthese (Shi *et al.*, 2013) und in *Bacillus licheniformis* die Aminosäure-Synthese (Zhu *et al.*, 2019) verstärken. Auch für die Succinat-Produktion wurde die Strategie der G6PDH-Überexpression bereits eingesetzt (Kim *et al.*, 2017). In *Mannheimia (M.) succinoproducens* führte die parallele Überexpression des für die G6PDH kodierenden Gens (*zwf*) und der Malatdehydrogenase zu einer erhöhten Succinat-Produktion. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte der Succinat-Ertrag durch die Überexpression von *g6pdh* in *P. vulgatus* 3xKO von 8,1 mmol/gTG auf 11,8 mmol/gTG erhöht werden, was einer Steigerung um 45 % entsprach (Abb. 37 A). Somit war die Ausbeute nochmal 10 % größer als bei der *tkt*-Überexpression. Der Substrat-Verbrauch von *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_*g6pdh* war wie in *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_*tkt* ebenfalls leicht erhöht was auf einen gesteigerten Kohlenstoff-Flux schließen lässt. Zusätzlich zeigte eine Transkriptanalyse, dass die homologe Expression von *g6pdh* nicht nur zu einer erhöhten Transkriptabundanz von *bvu_2796*, sondern auch von *bvu_2795 (6pgdh)* führte (Abb. 36). Dies ist ein weiterer Hinweis, welcher auf einen vermehrten Flux über den oxidativen Teil des PPW hindeutet. In *M. succinoproducens* konnte mit Hilfe von [1-¹³C] markierter Glucose nachgewiesen werden, dass der Kohlenstoff-Flux über oxidativen PPW tatsächlich durch die Überexpression von *zwf* gesteigert wurde (Kim *et al.*, 2017).

Da sowohl die Überexpression des Schlüsselenzyms im oxidativen wie auch die des zentralen Enzyms im nicht oxidativen PPW zu einer erhöhten Succinat-Produktion in *P. vulgatus* 3xKO führten, wurden die Gene der G6PDH und der TKT in einem nächsten Schritt parallel überexprimiert. Die homologe Expression beider Gene erfolgte auf einem Plasmid jedoch war jedem Gen ein eigenständiger Promotor (p2499) vorgeschaltet. Die Transkriptanalyse zeigte, dass die parallele Expression erfolgreich war, da die mRNA-Abundanz beider Enzyme hochreguliert wurde (Abb. 40). Die Transkriptabundanz der weiteren Gene des PPW wurden

hierdurch nicht beeinflusst. Die mit dem Stamm *P. vulgatus* 3xKo pG106_tkt_g6pdh erzielte Succinat-Ausbeute lag bei 11,9 mmol/gTG (Abb. 41 A) was keine signifikante Verbesserung zum Stamm *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh darstellte (Abb. 37). Auch der Xylose-Verbrauch wurde durch die doppelte Überexpression nicht mehr erhöht als durch die einzelnen Überexpressionen. Da die gemessenen Stoffwechselendprodukte sowie der Substrat-Verbrauch zwischen *P. vulgatus* 3xKo pG106_p2499_g6pdh und *P. vulgatus* 3xKo pG106_tkt_g6pdh vergleichbar waren und beide Stämme die höchste Succinat-Ausbeute zeigten, konnte davon ausgegangen werden, dass die G6PDH das Schlüsselenzym für den PPW-Flux und die NAD(P)H Produktion in *P. vulgatus* ist.

Interessanterweise wurde in den Stämmen *P. vulgatus* 3xKo pG106_p2499_tkt und *P. vulgatus* 3xKo pG106_tkt_g6pdh im Vergleich zu *P. vulgatus* 3xKO nicht nur eine erhöhte Succinat- und Acetat-Produktion detektiert, sondern es wurde ebenfalls eine erhöhte H₂-Freisetzung gemessen (Abb. 44). Da dieser Anstieg der H₂ Produktion allerdings bereits in *P. vulgatus* 3xKO im Vergleich zum WT-Stamm beobachtet wurde (Abb. 44), ist davon auszugehen, dass dieses Phänomen nicht direkt durch die Überproduktion der tkt beeinflusst wird.

Die Korrelation zwischen der gesteigerten Acetat- und H₂-Produktion lässt sich wahrscheinlich dadurch erklären, dass eine vermehrte Acetat-Produktion zu einer Anhäufung an reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}) führt (Nath & Das, 2004). Während der Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA durch die PFOR entsteht reduziertes Ferredoxin (Fd_{red}). Während Acetyl-CoA weiter zu Acetat umgewandelt wird, kann das überschüssige Fd_{red} durch eine Hydrogenase unter der Freisetzung von H₂ recycelt werden (Abb. 67) (Hallenbeck & Benemann, 2002; Nath & Das, 2004).

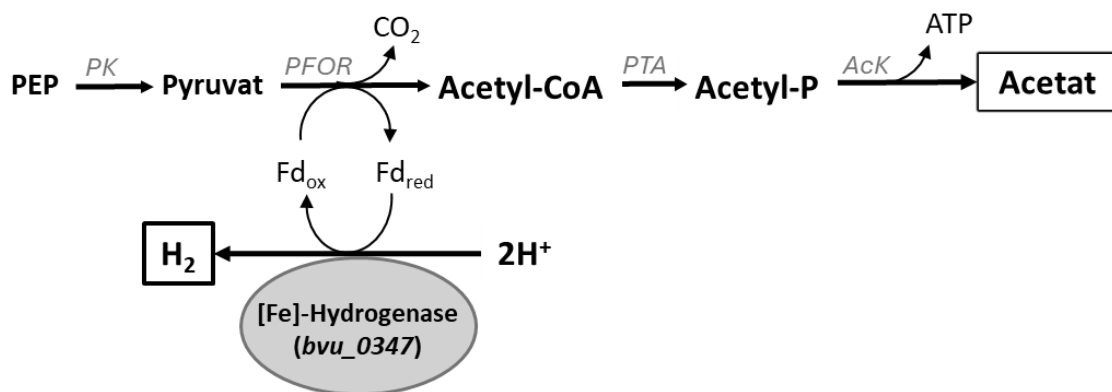


Abbildung 67: Schematische Darstellung der Re-Oxidation von Ferredoxin unter der Bildung von Wasserstoff in *P. vulgatus* 3xKO. Die freigesetzten Produkte sind umrandet. PK: Pyruvatkinase; PFOR: Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase; PTA: Phospho-Trans-Acetylase; AcK: Acetat-Kinase; Fe: Eisen

Die genauen physiologischen Aufgaben der Hydrogenasen im Phylum der Bacteroidota sind hierbei aber noch nicht vollständig geklärt (Wolf *et al.*, 2016).

In *P. vulgatus* 3xKO lässt sich der Anstieg der Acetat- und H₂-Freisetzung demnach über die gesteigerte Aktivität der PFOR erklären. Während in einer früheren Studie keine vermehrte H₂-Produktion durch die Deletion der PFL festgestellt wurde (Lück, 2023), wurde in der vorliegenden Arbeit in *P. vulgatus* 3xKO sowohl ein Anstieg in der Acetat-Freisetzung (Abb. 42) als auch in der H₂-Produktion (Abb. 44) detektiert. In diesem Stamm sind die für die PFL und LDH kodierenden Gene deletiert. Dadurch kann Pyruvat nicht über die Freisetzung von Reduktionsequivalenten in Form von Formiat umgesetzt werden, was wiederum zu einer vermehrten Aktivität der PFOR führt. Folglich wird die Produktion von Acetyl-CoA und dadurch Acetat sowie die Freisetzung von F_{dred} erhöht, was zu einer gesteigerten H₂-Produktion führt.

Da ein weiterer Anstieg beider Produkte nur in den Stämmen mit homologer Expression von *tkt*, nicht aber in den Stämmen mit einer überexprimierten *g6pdh* zu beobachten war, muss die TKT einen Einfluss auf die Acetat-Produktion haben. Durch die Überexpression von *tkt* wurde zusätzlich zum Anstieg der Endprodukte ein gesteigerter Verbrauch an Substrat festgestellt. Während rund 3 mmol/gTG Xylose zusätzlich verbraucht worden sind, wurde sowohl die Succinat als auch die Acetatproduktion um 2 mmol/gTG gesteigert (Abb. 33). Hieraus lässt sich schließen, dass die *tkt*-Überexpression ausschließlich die Geschwindigkeit des nicht oxidativen PPW gesteigert hat in dem dieser Ast prioritär abläuft. Dies führte zu einer erhöhten Produktion von Acetat und Succinat, nicht aber zu einem vermehrten Kohlenstofffluss in den respiratorischen Ast. Zusätzlich hat die vermehrte Acetat- und somit F_{dred}-Produktion zu einem Anstieg der H₂-Bildung geführt. Durch die Überproduktion der G6PDH hingegen wurde zwar auch ein leicht erhöhter Substrat-Verbrauch festgestellt allerdings war aber nur die Succinat-Ausbeute erhöht, während die Acetatproduktion und somit die H₂-Freisetzung nicht beeinflusst wurden. Hieraus lässt sich vermuten, dass die Überexpression von *g6pdh* also nicht nur die Geschwindigkeit des Flux erhöht hat, sondern hierdurch auch der C-Fluss durch den oxidativen PPW gesteigert wurde. Folglich wurde die Freisetzung von Reduktionsäquivalenten und CO₂ erhöht. Somit standen diese Produkte dem respiratorischen Ast vermehrt zur Verfügung, was eine Verschiebung des Kohlenstoffflusses in Richtung Succinat ermöglichte.

Wie bereits erwähnt werden die Reduktionsäquivalente NADH/NADPH im oxidativen PPW von den Enzymen G6PDH und 6PGDH generiert (Abb 66). Während diese beiden Enzyme in den meisten Organismen spezifisch für NADP⁺ als Co-Enzym sind (Tonouchi *et al.*, 2003), wurde für die Enzyme in *P. vulgatus* eine doppelte Coenzym-Spezifität gezeigt, wobei sowohl NAD⁺ als auch NADP⁺ genutzt werden können (Lück, 2023). Untersuchungen ergaben allerdings, dass die Spezifität der G6PDH für NADP⁺ und die von 6PGDH für NAD⁺ jeweils am höchsten ist (Lück, 2023). Da in *P. vulgatus* keine Transhydrogenase zur Umwandlung von NADPH in NADH (Jackson *et al.*, 1999) vorliegt, ist davon auszugehen, dass NADH im oxidativen PPW nur von der 6PGDH generiert wird, während die G6PDH für die Bildung von NADPH verantwortlich ist (Lück, 2023). Die Daten der Transkriptanalyse des PPW in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die homologe Expression von *g6pdh* in *P. vulgatus* 3xKO ebenfalls zu einer erhöhten Transkriptabundanz von *6pgdh* führten. Demnach wäre es möglich, dass die Überexpression der *g6pdh* zwar F6P in den oxidativen PPW einspeist, die erhöhte Succinat-Produktion durch die Vermehrte Produktion von NADH allerdings auf die gesteigerte Aktivität der 6PDDH zurückzuführen ist. Demnach wäre eine zusätzliche heterologe Expression einer Transhydrogenase, welche das von der G6PDH generierte NADPH in zusätzliches NADH umwandeln würde, ein vielversprechender Ansatz für eine zusätzliche Steigerung der Succinat-Produktion in *P. vulgatus*. In *E. coli* wurde bereits gezeigt, dass eine homologe Expression der Transhydrogenase zu einer verbesserten Succinat-Produktion beitrug (Zhu *et al.*, 2014) und auch in *Corynebacterium glutamicum* konnte der Succinat-Ertrag durch die heterologe Expression der Transhydrogenase PntAB aus *E. coli* gesteigert werden (Yamauchi *et al.*, 2014). Alternativ könnte die heterologe Expression einer NADPH abhängigen Malatdehydrogenase die Succinat-Produktion in *P. vulgatus* möglicherweise verbessern. In *M. succinogenes* wurde so bereits die Succinat-Produktion durch die heterologe Expression eines für die NADPH-abhängige Malatdehydrogenase kodierenden Gens aus *A. thaliana* erhöht (Kim *et al.*, 2017).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Überexpression des Gens der Transketolase zwar durch einen priorisierten Flux der Xylose durch den nicht oxidativen PPW die Succinat-Produktion verbessert, das Verhältnis zwischen den Produkten Acetat und Succinat allerdings unverändert bleibt. Die homologe Expression des Gens *g6pdh* hingegen ermöglichte einen gesteigerten Flux des oxidativen PPW und somit eine erhöhte Verfügbarkeit an NADH und CO₂, welche für die Succinat-Produktion erforderlich sind. Somit wurde der

C-Flux vermehrt in den respiratorischen Ast von *P. vulgatus* gelenkt und durch den Anstieg der Succinat-Produktion, nicht aber von Acetat, erstmals ein 1:1 Verhältnis beider Produkte in *P. vulgatus* erreicht. Demnach ist die G6PDH das vielversprechendere Enzym zur Verbesserung der Succinat-Ausbeute in *P. vulgatus*.

In Kapitel 3.1.4 konnte die Succinat-Produktion durch die homologe Expression der Gene *tkt* und *g6pdh* beeinflusst werden. Während *P. vulgatus* 3xKO 0,24 g Succinat/g Xylose produzierte, lag die Produktion von *P. vulgatus* 3xKO pG106_*tkt* und *P. vulgatus* 3xKO pG106_*g6pdh* bei 0,3 g Succinat/g Xylose bzw. 0,33 g Succinat/g Xylose. Für letzteren Stamm wurde somit ein Titer von 0,9 g Succinat/L Kultur erreicht. Hiermit lag die Succinat-Produktion von *P. vulgatus* allerdings noch unter den bisher beschriebenen Erträgen anderer Succinat-Produzenten wie beispielsweise *M. succiniproducens*, *A. succinogenes* oder *C. glutamicum* (McKinlay *et al.*, 2007). Um den Succinat-Ertrag zu steigern wurde daher eine Fed-batch-Fermentation im anaeroben Kleinfermenter durchgeführt. Die kontinuierliche Neutralisierung des durch die Endprodukte angesäuerten Mediums sowie die Zugabe von Substrat erlaubte einen Anstieg des Ertrags auf 0,52 g Succinat/ g Xylose. Diese Werte sind mit denen von weiteren Succinat-Produzenten vergleichbar. Wang *et al.* (2011) haben beispielsweise für *E. coli* mit Xylose als Substrat einen Ertrag von 0,56 g Succinat/ g Xylose erzielt. In *Basfia succiniciproducens* und *Actinobacillus succinogenes* wurden ebenfalls vergleichbare Werte von 0,76 bzw. 0,69 g Succinat/g Glukose beschrieben (Pateraki *et al.*, 2016). Der in dieser Arbeit mittels Fermentation erreichte Titer von 10 g Succinat/L Kultur ist auch mit den von *M. succiniproducens* und *Aanaerobiospirillum succinoproducens* minimal erzielten Werten vergleichbar (Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2010). Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass die meisten Autoren zur Succinat-Produktion Glukose, und nicht wie in der vorliegenden Arbeit Xylose, als Substrat verwenden. Dabei konnte bereits für *E. coli* gezeigt werden, dass die Nutzung von Glukose als Substrat zu höheren Succinat-Erträgen und Titer führte als Xylose (Andersson *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2011).

Dennoch konnten durch die Optimierung von Stoffwechselwegen und Kultivierungsbedingungen in anderen Organismen bereits viel höhere Succinat-Titer erreicht werden. Diese reichen von 52 bis 77 g/L in *M. succinogenes* (Lee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2017) über 60 g/L in *Vibrio natriegens* (Thoma *et al.*, 2022) bis hin zu 70-80 g/L in *Actinobacillus succinogenes* (Guettler *et al.*, 1999; McKinlay *et al.*, 2007) und fast 100 g/L in *E. coli* (McKinlay

et al., 2007). Obwohl diese Ausbeuten viel höher als der in dieser Arbeit erzielte Succinat-Titer sind, muss beachtet werden, dass es sich bei der hier durchgeführte fed-batch Fermentation um eine erste Durchführung handelte und somit Prozess-Optimierungen durchaus den Succinat-Ertrag und Titer verbessern würden. Zusätzlich ist es wichtig zu erwähnen, dass für die in der Literatur beschriebenen hohen Succinat-Titer häufig sehr hohe, unphysiologische Mengen an Zellbiomasse von bis zu 30 g Zellen/L Kultur verwendet wurden (McKinlay *et al.*, 2007). Diese hohen Zelldichten sind oftmals in der industriellen Großproduktion nicht anwendbar. Demnach sind die hohen Ausbeuten eher als artifiziell zu betrachten.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit nur während den ersten 30 h Wachstum der Zellen bis zu einer OD_{600nm} von 5,2 beobachtet (Abb. 45). Der spätere Substratverbrauch muss demnach vollständig in den Katabolismus eingeflossen sein. Auffällig war hierbei, dass ab dem Zeitpunkt des Erreichens der maximalen OD_{600nm} eine Verschiebung des Verhältnisses der Endprodukte zu beobachten war. Während die Succinat- und Acetat-Produktion zuvor in einem 1:1 Verhältnis vorlag, verschob diese sich später auf ein Verhältnis von 1,6:1 (Succinat:Acetat). Auch in *Segatella (S.) copri* wurde im fed-batch Verfahren bereits eine vergleichbare Beobachtung gemacht (Franke, 2020). Ähnlich wie bei *P. vulgatus* in der vorliegenden Arbeit wurde auch für *S. copri* trotz einer Wachstumshemmung nach 24 h ein weiterer Verbrauch von Substrat beschrieben. Hierbei kam es ebenfalls zu einer Verschiebung der Endprodukt-Verhältnisse in Richtung Succinat (Franke, 2020).

Die Verschiebung des C-Flux ist hierbei auf den Redoxgrad von Substrat und Zellbiomasse zurückzuführen. Eine Elementaranalyse von *S. copri* sowie die Analyse weiterer Bakterien ergaben als kleinste chemische Einheit, aus der die Biomasse von Bakterien aufgebaut ist, die Formel C₁H_{1,7}O_{0,4}N_{0,2} (Popovic, 2019; Franke, 2020). Die Biomasse liegt somit im Vergleich zum Substrat Xylose (C₁H₂O₁) in einem reduzierten Zustand vor. Dementsprechend werden zum Aufbau der Zellbiomasse Reduktionsäquivalente benötigt. Neben der Generierung von NADH während des Katabolismus von Xylose werden zusätzliche Reduktionsäquivalente in Form von reduziertem Ferredoxin (Fd_{red}) im Zuge der Acetat Produktion freigesetzt, während im respiratorischen Ast zur Succinat-Produktion Reduktionsäquivalente verbraucht werden. Dementsprechend spielt der fermentative Ast zur Acetat-Produktion eine wichtige Rolle während der Wachstumsphase der Bakterien. Gehen die Zellen in einen ruhenden Zustand über, so werden keine zusätzlichen Reduktionsäquivalente mehr für den Anabolismus

benötigt. Die Acetat-Produktion kann folglich verringert werden und der Kohlenstoff somit vermehrt in den reduktiven Ast fließen, was zu einer gesteigerten Succinat-Produktion führt.

Die beobachtete Wachstumshemmung ist möglicherweise auf die Akkumulierung der Endprodukte zurückzuführen. Für *A. succinogenes* wurde beispielsweise bereits eine inhibitorische Wirkung von 10-40 g/L Acetat und 60 g/L Succinat gezeigt (Li *et al.*, 2010; Pateraki *et al.*, 2016). Diese inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum und die Succinat-Produktion wurden ebenfalls für *E. coli* BL21 (Li *et al.*, 2010) und *B. succiniproducens* (Pateraki *et al.*, 2016) beschrieben. Auch für *Corynebacterium glutamicum* wurde eine Verringerung des Succinat-Titers sowie des Substrat-Verbrauchs bereits ab einer Konzentration von 62,5 mM Succinat beobachtet (Chung *et al.*, 2017). In der Gegenwart von 250 mM Succinat, wurde dessen Produktion sogar um 98 % gehemmt (Chung *et al.*, 2017). Nähere Untersuchungen ergaben hierbei, dass Succinat die Expression verschiedener Gene, unter anderem der Transkriptions-Regulation, DNA-Reparatur und des Aminosäure-Aufbaus, runterregulierte. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *NCgl0275*, ein Homolog der negativen Regulatoren der WhiB Proteinfamilie, ebenfalls durch Succinat negativ beeinflusst wurde. Durch die Überexpression dieses Gens konnte der Substratverbrauch sowie die Succinat-Produktion allerdings auch in Gegenwart von Succinat gewährleistet werden und somit der Succinat-Titer um 37,7 % erhöht werden (Chung *et al.*, 2017). Diesen Ergebnissen zufolge wäre der Entzug der Endprodukte aus dem Medium ein wichtiger Schritt zur Optimierung der Succinat-Produktion. In *M. succinogenes* wurde beispielsweise die Produktionsrate von Succinat in einem kontinuierlichen Fermentationsverfahren und unter Verwendung eines Membransystems was die Rückgewinnung der Zellen erlaubt signifikant erhöht (Lee *et al.*, 2016). Auch in *A. succinogenes* führte die Nutzung eines Membran-Bioreaktors und die kontinuierliche Abfuhr der Endprodukte sowie die Rückführung des Fettsäuren-freien Mediums in den Reaktor zu einem fünf-Fach höheren Succinat-Titer (Meynial-Salles *et al.*, 2008).

Zusammenfassend kann für dieses Kapitel festgehalten werden, dass die bisherigen genetischen Optimierungen in *P. vulgatus* sowie ein erstes Fermentationsverfahren den Succinat-Titer bereits um mehr als das 10-fache steigerten. Obwohl der Titer mit 10 g Succinat/L wirtschaftlich noch nicht konkurrenzfähig ist, birgt der Stamm durch weitere Produktionsoptimierungen wie beispielsweise kontinuierliche Fermentation Potenzial für eine umweltfreundliche und nachhaltige Succinat-Produktion.

4.2 Weitere Xylan-verwertende Succinat-Produzenten

4.2.1 Xylan-Verwertung in Spezies der Ordnung Bacteroidales

Wie bereits erwähnt wurde die Nutzung und der Abbau von Xylanen bisher hauptsächlich für Vertreter des Phylums Bacteroidota beschrieben (Chassard *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2012). Hierbei stechen vor allem die im Rinder-Pansen und im menschlichen Kolon vorkommenden Vertreter der Gattungen *Prevotella* und *Bacteroides* hervor. Durch das Vorkommen von Xylanen unter anderem in Gräsern und Getreiden, macht das Substrat sowohl für Rinder als auch für den Menschen einen großen Anteil der Nahrung aus. Schätzungen gehen davon aus, dass jeden Tag etwa 10 bis 25 g pflanzliche Zellwand-Polysaccharide den menschlichen Darm erreichen (Egert *et al.*, 2006). Während diese im Dünndarm nicht resorbiert werden können, haben sich einige Bakterien auf den Abbau des Substrates spezialisiert. Schätzungen zu Folge werden so 51 -72 % des aufgenommenen Xylans durch die Darmmikrobiota abgebaut (Slavin *et al.*, 1981; Dodd *et al.*, 2011).

Bei einigen Vertretern machen Gene zur Verwertung von komplexen Polysacchariden einen Anteil von bis zu 20 % des Gesamtgenoms aus (Xu *et al.*, 2003; McNulty *et al.*, 2013; Schwalm & Groisman, 2017). Diese spezialisierten Gene befinden sich in sogenannten *Polysaccharide utilization loci* (PULs) (Martens *et al.*, 2011). Während die spezifischen Aufgaben der PULs sich unterscheiden, sind die Grundbausteine dennoch die gleichen. Die DNA-Bereiche enthalten Gene, welche für Proteine zur Bindung von Polysacchariden kodieren sowie für CAZymes (carbohydrate active enzymes) und Transkriptionsregulatoren (Martens *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014). Zu den CAZymes zählen Glykosid-Hydrolasen (GHs), Polysaccharid-Lyasen (PLs) und Carbohydrate-Esterasen (CEs), welche beim Xylan-Abbau eine Rolle spielen (Martens *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2023).

Während der konkrete Mechanismus der Xylan-Aufnahme und des Abbaus noch nicht vollständig aufgeklärt ist, gibt es bereits einige Modelle, über den mutmaßlichen Ablauf des Xylan-Abbaus (Dodd *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2022). Diese Modelle basieren sowohl auf den Erkenntnissen zur Verwertung von Stärke in *B. thetaiotaomicron* als auf Beobachtungen zur Xylan-Verwertung in *Prevotella byrantii* (Dodd *et al.*, 2011). In *B. thetaiotaomicron* wurde das sogenannte *Starch utilization system* (Sus) beschrieben, welches die wichtigsten Proteine zur

Verwertung von Stärke zusammenfasst (Martens *et al.*, 2009). Hieran angelehnt werden an der Aufnahme, Transport und Abbau von Xylanen beteiligte Proteine als *Xylan utilization system* (Xus) bezeichnet (Dodd *et al.*, 2011). In Abbildung 68 ist die Xylan-Verwertung in *Bacteroides*-Spezies basierend auf bereits entwickelten Modellen (Dodd *et al.*, 2011; Schwalm & Groisman, 2017; Zhang *et al.*, 2022) schematisch dargestellt.

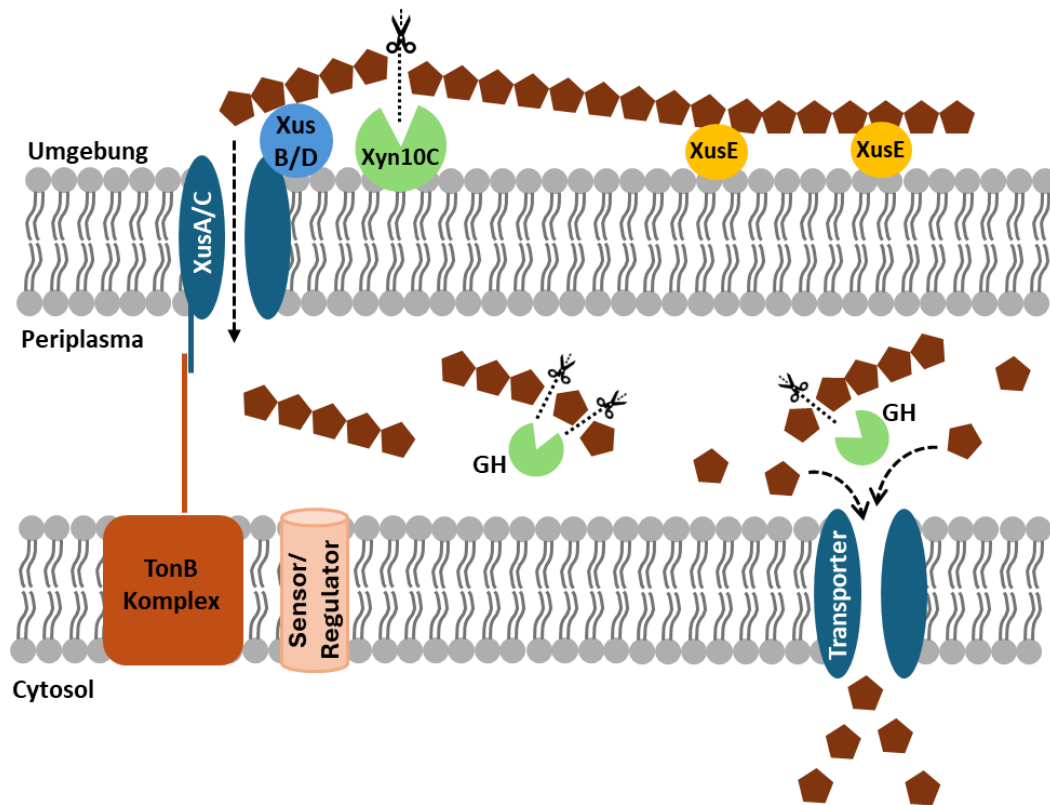


Abbildung 68: Modell zur Aufnahme und Verwertung von Xylan in Spezies der Gattung *Bacteroides* (angepasst nach Schwalm & Croisman, 2017; Zhang *et al.*, 2022). Die Xylose-Monomere sind als braune Pentagone dargestellt. Lange Ketten aus Xylose stellen das Xylan und kürzere Ketten Xylooligosaccharide dar. Zur Vereinfachung wurden die substituierten Seitenketten der Xylane nicht dargestellt. Xus: *Xylan utilization system*; GH: Glykosid-Hydrogenase; Xyn10C: membranständige Endoxylanase

Die Bindung von Xylan findet höchstwahrscheinlich über in der Membran verankerte XusE-Proteine statt. Ein ebenfalls in der äußeren Membran verankertes Protein Xyn10C ist ein Homolog zu SusG und wirkt als membranständige Endoxylanase, welche mitten im Rückgrat von Xylan schneidet und somit die Freisetzung von kurzkettigen Xylooligosacchariden bewerkstelligt (Dodd *et al.*, 2011; Schwalm & Groisman, 2017). Diese werden schließlich über die membrangebundenen XusB/D Proteine zu XusA/C geleitet. Bei Letzteren handelt es sich um TonB-abhängige Rezeptoren, welche für den Transport der Xylooligosaccharide über die äußere Membran ins Periplasma verantwortlich sind (Dodd *et al.*, 2011). Im Periplasma

befinden sich eine Vielzahl an verschiedenen Glykosid-Hydrolasen (GH), welche für den weiteren Abbau der Xylooligosaccharide bis hin zu den Monomer-Einheiten zuständig sind (Schwalm & Groisman, 2017; Zhang *et al.*, 2022). Die so generierten Monomere werden schließlich über die Cytoplasmamembran ins Cytosol transportiert und hier weiter verstoffwechselt. Zusätzlich befindet sich in der inneren Membran ein Regulator, welcher die Synthese Gene zum Xylan-Abbau reguliert. Wie diese Regulation abläuft, ist allerdings bisher noch nicht aufgeklärt (Dodd *et al.*, 2011).

Neben *P. vulgatus* (Crittenden *et al.*, 2002) wurde das Wachstum auf Xylan unter anderem bereits für *B. cellulosilyticus* (Robert *et al.*, 2007), *B. xylanisolvens* (Chassard *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2023) *B. intestinalis* (Bakir, 2006) und *B. graminisolvens* (Nishiyama *et al.*, 2009) beschrieben. Außerdem wurden in *P. dorei* etwa 200 GHs und PULs detektiert (Kaoutari *et al.*, 2013). Da diese Vertreter alle Succinat beziehungsweise Propionat als End-Produkt freisetzen (Chassard *et al.*, 2008; Robert *et al.*, 2007; Nishiyama *et al.*, 2009; Hatamoto *et al.*, 2014), stellten sie mögliche Kandidaten für eine genetische Optimierung zur biotechnologischen Herstellung von Succinat dar. Dementsprechend wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die bisher für *P. vulgatus* etablierten genetischen Werkzeuge auf weitere Spezies der Familie Bacteroidaceae übertragbar sind (Kapitel 3.2) Um eine bestmögliche, auf nachwachsenden Rohstoffen basierte, Produktion zu ermöglichen, wurde als erstes das Wachstumsverhalten auf Xylan der genannten fünf Stämme untersucht (Abb. 46).

Obwohl das Genom von *P. vulgatus* für geschätzte 200 GHs und PLs beziehungsweise etwa 300 CAZymes kodiert (Flint *et al.*, 2012; Kaoutari *et al.*, 2013) zeigten die Daten der vorliegenden Arbeit für *P. vulgatus* ein nur schwaches Wachstum auf Xylan im Vergleich zum Wachstum auf Glukose. Dieses Ergebnis deckt sich allerdings mit den Untersuchungen von Crittenden *et al.* (2002), welcher ein moderates Wachstum sowie ein unvollständiger Abbau von Xylan durch *P. vulgatus* beschrieben hat. Vergleichbar geringes Wachstum wurde in dieser Arbeit für *P. dorei* beobachtet. Während für diesen Stamm zuvor das Wachstum auf Xylan beschrieben wurde (Chassard *et al.*, 2007) konnte allerdings keine Xylanase Aktivität detektiert werden. Die Autoren erklärten diese Beobachtung mit der Vermutung, dass *P. dorei* entweder nur über eine Exoxylanase-Aktivität verfügt oder aber die geringe Expression der Endoxylanase nicht messbar war (Chassard *et al.*, 2007). Für *B. xylanisolvens* und *B. intestinalis* wurde erwartungsgemäß sehr starkes Wachstum unter Verwendung von Xylan als Substrat

beobachtet. Diese beiden Stämme besitzen nicht nur etwa 300 Gene welche für PULs und GHs kodieren, sondern zeigen zusätzlich eine größere Vielfalt in zu den CAZymes gehörenden Genen als beispielsweise *P. dorei* (Kaoutari *et al.*, 2013). Zusätzlich konnte für *B. intestinalis* bereits eine Endoxylanase-Aktivität in Gegenwart von Hafer- und Birken-Xylan nachgewiesen werden (Chassard *et al.*, 2007). Entgegen den Erwartungen und früheren Studien (Nishiyama *et al.*, 2009) konnte *B. graminisolvens* in der vorliegenden Arbeit Xylan nicht als Wachstumssubstrat verwenden. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass das zuvor beschriebene Wachstum von *B. graminisolvens* auf Birkenxylan und nicht auf Buchenxylan beschrieben wurde. Zusammengefasst konnten über die Wachstumsversuche drei neue potenzielle Kandidaten (*B. cellulossilyticus*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens*) zur Succinat-Produktion basierend auf nachwachsenden Rohstoffen identifiziert werden.

4.2.2 Übertragung der genetischen Werkzeuge aus *P. vulgatus* auf weitere Spezies der Familie Bacteroidaceae

Zur weiteren Ermittlung der Übertragbarkeit der genetischen Werkzeuge aus *P. vulgatus* in *B. cellulossilyticus*, *B. intestinalis* und *B. xylanisolvens* wurde die Verwendung der zur Selektion benötigten Resistenzkassetten geprüft. Ein Antibiotogramm hat jedoch ergeben, dass *B. intestinalis* im Gegensatz zu *P. vulgatus*, *B. cellulossilyticus* und *B. xylanisolvens* sowohl gegen Tetrazyklin als auch gegen Erythromycin resistent war (Tab. 26). Bei den untersuchten Antibiotika handelt es sich um Wirkstoffe aus unterschiedlichen Klassen. Tetrazykline hemmen die Proteinbiosynthese in dem sie an die 30S Untereinheit der Ribosomen binden und somit die Anlagerung der tRNA verhindern (Nguyen *et al.*, 2014). Als Resistenzmechanismen sind sowohl Efflux-Pumpen als auch Proteine, welche die Ribosomen vor einer Bindung mit Tetrazyklin schützen, bekannt (Nikolich *et al.*, 1992). Für letzteres wurde auch in *B. thetaiotaomicron* ein entsprechendes Gen (*tet(Q)*) beschrieben (Nikolich *et al.*, 1992). Eine bioinformatische Analyse hat ergeben, dass der in dieser Arbeit verwendete Stamm *B. intestinalis* DSM 17393 ein Protein mit 97 %-iger Übereinstimmung zu dem *tetQ*-Protein aus *B. thetaiotaomicron* besitzt (<https://img.jgi.doe.gov>), was die beobachtete Unwirksamkeit von Tetrazyklin gegenüber diesem Stamm untermauert. Auch mit Erythromycin konnte kein deutlicher Hemmhof bei *B. intestinalis* gemessen werden. Erythromycin gehört zu den Makrolid-Antibiotika und verhindert durch die Bindung an die 50S Untereinheit der

bakteriellen Ribosomen die Translokation der tRNA und somit die Proteinsynthese (Champney & Burdine, 1995). Auch wenn bisher kein Erythromycin-Resistenzgen (*erm*) in *B. intestinalis* beschrieben wurde, ist bekannt, dass die *erm*-Gene oft zusammen mit *tet*-Genen übertragen werden (Shoemaker *et al.*, 1989; Jean *et al.*, 2022). Gentamycin gehört zu der Gruppe der Aminoglykosid-Antibiotika und führt durch seine Bindung an die ribosomale 30S Untereinheit zum falschen Ablesen der mRNA und somit zur Hemmung der Proteinbiosynthese (Tangy *et al.*, 1985). Der Transport von Gentamycin in die Bakterien-Zelle ist allerdings ein Energie-abhängiger Prozess für welchen Sauerstoff benötigt wird (Bryan *et al.*, 1979; Rasmussen *et al.*, 1993). Dementsprechend kann das Antibiotikum nicht in anaerobe Spezies gelangen, was unter anderem den Spezies der Gattung *Bacteroides* eine natürliche Resistenz dem Antibiotikum gegenüber verschafft (Rasmussen *et al.*, 1993). Erwartungsgemäß wurde das Wachstum der in dieser Arbeit getesteten Organismen nicht signifikant durch die Verwendung von Gentamycin beeinträchtigt. Bei Carbenicillin hingegen handelt es sich um ein Antibiotikum aus der Gruppe der Penicilline (Wright, 1999). Durch ihre Bindung an Penicillin-Binde-Proteine, stören Penicilline die Quervernetzung von Peptidoglycan und hemmen somit die Zellwandbiosynthese (Wright, 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigte das Antibiotikum gegen alle vier getesteten Stämme eine hemmende Wirkung (Tab. 26). Da sowohl Erythromycin als auch Tetrazyklin Teil der etablierten genetischen Werkzeuge für *P. vulgaris* sind, und in *B. intestinalis* Resistenzgene gegen diese Antibiotika vorlagen, musste der Organismus, dem zu Folge, für weitere Untersuchungen ausgeschlossen werden. *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* hingegen erwiesen sich aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Erythromycin und Tetrazyklin auch weiterhin als potenzielle Kandidaten zur Anwendung von genetischen Werkzeugen mit Hinblick auf eine optimierte Succinat-Produktion.

Eines der genetischen Werkzeuge, welches sich zur Regulation des Stoffwechselweges von *P. vulgaris* eignet ist der genomintegrative Vektor pMM656 (Mimee *et al.*, 2015; Lück, 2023).

Wie oben beschrieben, wurde dieser Vektor in der vorliegenden Arbeit zur Expression der PFOR in *P. vulgaris* über den Rhamnose-induzierbaren Promotor verwendet (Kapitel 3.1.3). Das System wurde erstmals in *B. thetaiotaomicron* angewendet (Mimee *et al.*, 2015), doch seine Funktionalität zur homologen Expression in *P. vulgaris* konnte bereits in früheren Studien bestätigt werden (Lück & Deppenmeier, 2022). Die Integration des Plasmids in das Genom des Zielorganismus wird hierbei durch eine auf dem Vektorrückgrad kodierte NBU2-

Integrase in das 3'-Ende der für die tRNA^{Ser} kodierenden Gene vermittelt (Mimee *et al.*, 2015). Voraussetzung hierfür ist das Vorhandensein einer sogenannten attN-site in diesen Bereichen, welche eine Sequenz-spezifische Rekombination mit der auf dem Plasmid vorhandenen attN2-site ermöglicht. Untersuchungen zufolge sind besonders eine spezifische Sequenz von 13 bp und ein stromaufwärtsliegenden 6 bp lange Sequenz (Kapitel 3.1.2.3, Abb. 48) für die Rekombination notwendig (Wang *et al.*, 2000). Diese Sequenzen wurden ursprünglich in *B. thetaiotaomicron* (*bt_t70* und *bt_t71*) identifiziert (Mimee *et al.*, 2015) und auch in *P. vulgatus* (*bvu_2451* und *bvu_2094*) nachgewiesen (Lück., 2023). In der vorliegenden Arbeit konnten die notwendigen Sequenzen ebenfalls in den für tRNA_{Ser} kodierenden Genen von *B. cellulosilyticus* (*bcellWH2_04704* und *bcellWH2_04746*) und *B. xylanisolvens* (*bxy_T_49030*) identifiziert werden. Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des *nanoluc*-Reportergens die Regulierbarkeit der Genexpression über den Expressionsvektor pMM656 in *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* nachgewiesen. Während das *nanoluc*-Gen bereits unter einem Anhydrotetracyclin-induzierbaren *tet*-Promotor als erfolgreiches Reportersystem für die beiden Stämme bestätigt werden konnte (Lim *et al.*, 2017), wurde hier erstmals die Funktionalität des Rhamnose-abhängigen Promotor P_{RhaKIPAO} sowie die Anwendbarkeit des Integrations-Plasmids pMM656 in *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* gezeigt.

Neben der homologen und heterologen Expression stellt die Gen-Deletion ein weiteres wichtiges genetisches Tool dar. Während bereits einige Strategien zur markerlosen Deletion für Spezies der Ordnung Bacteroidales wie *B. ovatus* (García-Bayona & Comstock, 2019), *B. thetaiotaomicron* (Koropatkin *et al.*, 2008; Bencivenga-Barry *et al.*, 2020), *P. dorei* (Sakanaka *et al.*, 2018) und *P. vulgatus* (Bencivenga-Barry *et al.*, 2020; Neff *et al.*, 2023) bekannt sind, war die Generierung einer markerlosen Deletion in *B. cellulosilyticus* und *B. xylanisolvens* bisher erfolglos (Despres *et al.*, 2016 b).

Um dies zu ändern, sollte das für *P. vulgatus* optimierte SacB-System (Neff *et al.*, 2023) verwendet werden. Dieses System wurde bereits mehrfach in gram negativen Organismen wie beispielsweise *E. coli* (Blomfield *et al.*, 1991), *Pseudomonas aeruginosa* (Schweizer, 1992), *Myxococcus xanthus* (Wu & Kaiser, 1996) oder *Rhizobium leguminosarum* (Quandt & Hynes, 1993) verwendet. Es basiert auf der Gegenselektion über das *sacB*-Gen unter Nutzung des Substrats Saccharose. Das *sacB*-Gen stammt ursprünglich aus *B. subtilis* und kodiert für eine Levansuccrase, welche Succrose in ein hochgradig polymeres Levan umwandelt (Gay *et al.*,

1985; Pelicic *et al.*, 1996). Der genaue Mechanismus der Toxizität von Levan ist bisher nicht komplett aufgeklärt, allerdings wird vermutet, dass die übermäßige Levan-Synthese zu einer Akkumulation des Polymers im Periplasma führt und somit den Zelltod von plasmid-enthaltenen Bakterien mit *sacB* hervorruft (Steinmetz *et al.*, 1983; Jäger *et al.*, 1992; Pelicic *et al.*, 1996). Neben der Anwendung der *SacB*-basierten Gegenselektion in Gram-negativen Bakterien, wurde die erfolgreiche Anwendung des Systems allerdings auch in einigen gram-positiven Organismen wie *Corynebacterium glutamicum* (Jäger *et al.*, 1992) und Spezies der Gattungen *Mycobacteria* (Pelicic *et al.*, 1996) und *Rhodococcus* (Jäger *et al.*, 1992) beschrieben. Hier wurde davon ausgegangen, dass die Wirkung von *sacB* trotz fehlender äußerer Membran auf das Vorhandenseins von Mykolsäure in diesen Organismen zurückzuführen ist. Die Mykolsäure bildet dabei ähnlich zur äußeren Membran der gram-negativen Bakterien eine hydrophobe Schicht wodurch ein dem Periplasma ähnliches Kompartiment entsteht, in welchem das Levan akkumuliert (Pelicic *et al.*, 1996).

Gegenüber anderen Methoden zur markerlosen Deletion bietet das *SacB*-System den Vorteil, dass keine toxischen Substanzen zu Gegenselektion verwendet werden müssen (Neff *et al.*, 2023). Zur Nutzung des *pheS* Deletions-Systems wird beispielsweise das Substrat *p*-Chloro-Phenylalanine benötigt, was auf eine auf einige Mikroorganismen Wachstumshemmend wirkt (Kino *et al.*, 2016). Ein weiterer Vorteil des *sacB*-Systems liegt darin, dass im Gegensatz zu den etablierten Systemen unter Nutzung des Thymidin-Kinase (*tdk*) oder Thymidilat-Synthetase (*thyA*) Gens (Sakanake *et al.*, 2018), keine genetisch veränderten Ausgangstämme benötigt werden (Neff *et al.*, 2023). Wie bereits erwähnt wurde das *sacB* System für *P. vulgatus* optimiert (Neff *et al.*, 2023) und auch in dieser Arbeit zur Generierung von Deletionsmutanten verwendet (Kapitel 3.1). Basierend auf den Optimierungen für *P. vulgatus*, sollte das System in dieser Arbeit nun auch in Spezies der Gattung *Bacteroides* übertragen werden.

Interessanterweise zeigten frühere Studien, dass das *SacB*-System in *B. fragilis* nicht angewandt werden konnte, da das *sacB* Gen in diesem Organismus keinen letalen Effekt zeigte (Kino *et al.*, 2016). Dies ist vermutlich auf das Vorkommen eines homologen Proteins zu BT1760 aus *B. thetaiotaomicron* zurückzuführen (Neff *et al.*, 2023). *B. thetaiotaomicron* besitzt 88 verschiedene *polysaccharide utilization loci* (PUL) darunter auch ein PUL zur Verwertung von Fructanen (Sonnenburg *et al.*, 2010). Zu diesem Fructan-PUL gehört unter anderem das Gen *bt1760*, welches für eine Zell-Oberflächen gebundene Glykosid Hydrolase der Familie 32

gehört. Dieses Enzym wurde als β -2-6-spezifische Endo-Fructanase detektiert, dessen Deletion die Levan-Verwertung durch *B. thetaiotaomicron* verhindert (Sonnenburg *et al.*, 2010). Zusätzlich verfügt *B. thetaiotaomicron* über eine periplasmatische exo-Fructosidase welche neben Levan auch das β -2-1-verknüpfte Fructan-polymer Inulin abbaut (Sonnenburg *et al.*, 2010). Allerdings wird auch durch dieses Enzym das β -2-6 verknüpfte Levan stark bevorzugt, was dazu führt dass *B. thetaiotaomicron* Levan aber nicht Inulin als Substrat nutzen kann (Sonnenburg *et al.*, 2010). Da beide Proteine mit hoher Homologie in *B. fragilis* vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass dies die Erklärung für das Scheitern des sacB-Gegenselektions-Systems ist (Neff *et al.*, 2023). In *P. vulgatus* liegt ebenfalls eine im Periplasma aktive Exo- β -Fructosidase (BVU_1663) vor, deren Deletion sowohl den Abbau von Inulin und Inulin-Fruktooligosacchariden (FOS) sowie Levan-FOS verhindert (Neff *et al.*, 2023). Hier muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass *P. vulgatus* im Gegensatz zu anderen Spezies der Gattung *Bacteroides*, trotz BVU_1663, weder auf hochmolekularem Levan noch auf Inulin gutes Wachstum zeigt (Bolam & Sonnenburg, 2011; Neff *et al.*, 2023). Im Gegensatz zu *B. thetaiotaomicron* verfügen *B. uniformis* und weitere *Bacteroides*-Stämme über einen PUL welcher zum Abbau von β 2-1 polymerem Inulin befähigt, das β 2-6 Fructan-Polymer, Levan, jedoch nicht abbauen kann (Sonnenburg *et al.*, 2010; Schwalm & Groisman, 2017). Auch *B. ovatus*, welches Enzyme mit großer Homologie zu BT_1760 besitzt, (Neff *et al.*, 2023) ist auf den Abbau von Inulin und nicht Levan spezialisiert (Sonnenburg *et al.*, 2010). Basierend auf diesen Erkenntnissen wäre es, wie von den Autoren Neff *et al.* (2023) bereits erwähnt, denkbar, dass die vorhanden PULs in den einzelnen Organismen jeweils nur auf eines der beiden Polymeren spezialisiert sind. Wenn dem so wäre, könnte eine Wachstums-Analyse mit den Substraten Levan und Inulin bereits klarstellen, ob das sacB-System für den jeweiligen Organismus anwendbar ist. Aus diesem Grund wurde versucht *B. cellulosilyticus* sowohl auf Inulin als auch auf Levan zu kultivieren (Abb. 51). Dabei stellte sich heraus, dass dieser Organismus Levan verstoffwechseln und als Wachstumssubstrat verwerten kann. Auf Inulin hingegen konnte für *B. cellulosilyticus* kein Wachstum beobachtet werden. Aus einer früheren Studie (Wienberg, 2023) war bereits bekannt, dass *B. xylanisolvens* anders als *B. cellulosilyticus* Inulin als Wachstumssubstrat verwerten konnte, allerdings kein Wachstum auf Levan beobachtet wurde. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Organismus *B. xylanisolvens* für den weiteren Verlauf der Arbeit und die die Übertragung des genetischen SacB-Sytsems gewählt.

4.2.2.1 *B. xylanisolvens*, ein vielversprechender Kandidat zur umweltfreundlichen Succinat-Produktion

Der zentrale Kohlenstoffwechsel von *B. xylanisolvens* ist grundsätzlich mit dem von *P. vulgatus* (Abb. 65) vergleichbar. Nach der Glykolyse spaltet sich auch in diesem Organismus der Weg ausgehend von Phosphoenol-Pyruvat in einen fermentativen und einen respiratorischen Ast. Im Laufe der Fermentation von PEP zum Endprodukt Acetat entstehen hierbei, wie in *P. vulgatus*, Formiat und Lactat als weitere Endprodukte. Ebenfalls vergleichbar zu *P. vulgatus* setzt *B. xylanisolvens* im reduktiven Zweig Succinat als Endprodukt frei. Zusätzlich wird dieses teilweise zu Propionat weiter verstoffwechselt. Diese Umwandlung erfolgt in mehreren Schritten. Ausgehend von Succinat entsteht durch die Übertragung eines CoA-Restes durch die CoA-Transferase (BXY_23310) Succinyl-CoA. Eine Umlagerung der C-Atome durch die Methylmalonyl (MM)-CoA-Mutase (BXY_12020 und BXY_12030) führt zur Bildung von (R)-MM-CoA. Anschließend folgen eine durch die MM-CoA-Epimerase (BXY_46850) katalysierte Konfigurationsänderung und nachfolgend eine Decarboxylierung zu Propionyl-CoA durch die Enzyme BXY_14020 und BXY_44570. In einem letzten Schritt überträgt die bereits erwähnte CoA-Transferase den CoA-Rest auf Succinat, wodurch Propionat freigesetzt wird.

In *P. vulgatus* hatte die Deletion der für die MM-CoA-Mutase kodierenden Gene eine Unterbrechung der Propionat Produktion zu Folge (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024). Dies führte nicht nur zur Eliminierung von Propionat als Neben-Produkt, sondern zusätzlich zu einer Verdopplung der Succinat-Ausbeute (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024). In *B. xylanisolvens* liegen die zu *bvu_0309* und *bvu_0310* homologen Gene *bxy_12020* und *bxy_12030* vor, welche für die große (*bxy_12020*) beziehungsweise kleine (*bxy_12030*) Untereinheit der Methylmalonyl-CoA Mutase kodieren. Aufgrund dessen boten die Gene *bxy_12020* und *bxy_12030* ein vielversprechendes Ziel, um nicht nur die Funktionsweise des *sacB*-Deletions-System in *B. xylanisolvens* zu untersuchen, sondern zusätzlich die Succinat-Produktion in diesem Organismus zu erhöhen. Nachdem gezeigt wurde, dass *B. xylanisolvens* Levan nicht verstoffwechselt, wurde also das *sacB*-System zur Deletion der für die MM-CoA-Mutase kodierenden Gene angewendet. Mit Hilfe einer PCR und anschließender Gelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass das Deletions-Plasmid pMM656_Δ12020-12030 erst in das Genom von *B. xylanisolvens* integriert (Abb. 54 A) und anschließend wieder entfernt (Abb. 54 B) wurde. In anschließenden HPLC-Chromatogrammen von Wachstumskulturen wurde im Gegensatz zum WT-Stamm für die generierte Deletionsmutante

B. xylanisolvens $\Delta 12020-12030$ erwartungsgemäß kein Propionat detektiert (Abb. 56). Soweit bekannt, wurde somit in dieser Arbeit zum ersten Mal eine markerlose Deletion in *B. xylanisolvens* durchgeführt.

Die Autoren Despres *et al.* (2016 b) beschrieben, dass eine markerlose-Deletionsmethode für *B. thetaiotaomicron*, welcher eine Thymidin-Kinase-Deletionsmutante zugrunde liegt (Koropatkin *et al.*, 2008) nicht auf *B. xylanisolvens* übertragbar war, weswegen auf eine Insertions-Mutation zurückgegriffen wurde (Despres *et al.* 2016 b). Die Autoren begründeten das Fehlschlagen der Deletion mit einer schlechten Konjugationseffizienz von *B. xylanisolvens* (Despres *et al.*, 2016 b). Dieses Problem wurde in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. Allerdings erfolgte die Konjugation hier unter Nutzung von *E. coli* $\beta 2155$, welcher eine Konjugation unter anaeroben Bedingungen ermöglicht, während vorherige Versuche mit dem *E. coli* Stamm WM3064 aerob erfolgten (Despre *et al.*, 2016 b). Ein weiterer Vorteil des *sacB*-Deletionssystems ist wie in Kapitel 4.2.2 bereits erwähnt, dass im Gegensatz zu der von Koropaktin *et al.*, (2008) beschriebenen Methode keine Deletions-Mutanten als Ausgangsstamm notwendig sind (Neff *et al.*, 2023). Neben der Übertragung des *sacB*-Systems in *B. xylanisolvens*, wurde zusätzlich die Produktion von Propionat in dem Organismus unterbrochen und die Succinat-Produktion erhöht (Abb. 57). Während der WT-Stamm $6,1 \pm 0,8$ mmol Succinat/gTG produzierte, waren es für *B. xylanisolvens* $\Delta 12020-12030$ $9,3 \pm 1,9$ mmol Succinat/gTG. Dies entsprach einem Anstieg der Succinat-Ausbeute um 50 %. Da Succinat in dem neu generierten Stamm nicht mehr weiter zu Propionat verstoffwechselt wird wäre zu erwarten, dass die nun gebildete Menge an Succinat der Summe aus Succinat und Propionat des WT-Stammes entsprechen würde. Da dieser $2,3 \pm 0,6$ mmol Propionat/gTG bildet wäre für *B. xylanisolvens* $\Delta 12020-12030$ eine Succinat-Produktion von $8,4 \pm 0,8$ mmol Succinat/g TG zu erwarten gewesen. Der erwartete Wert war somit mit dem tatsächlich gemessenen Wert von $9,3 \pm 1,9$ mmol Succinat/gTG vergleichbar. Auf die Produktion der restlichen Nebenprodukte, Formiat, Lactat und Acetat, hatte die Deletion der Gene *bxy_12020* und *bxy_12030* erwartungsgemäß und wie bereits in *P. vulgatus* beschrieben (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024) keine Auswirkung (Abb. 57). Auch das Wachstum von *B. xylansisolvens* wurde durch die Deletion von *bxy_12020* und *bxy_12030* nicht beeinträchtigt (Abb. 55).

Vergleicht man die Mengen der gebildeten Endprodukte von *B. xylanisolvens* mit denen von *P. vulgatus* nach Wachstum auf Minimalmedium mit Xylose als Substrat, so wird deutlich, dass

der Wildtyp-Stamm von *B. xylanisolvens* etwa die Doppelte Menge an Succinat/gTG produziert als der Wildtyp-Stamm von *P. vulgatus* (Tab. 30). Dies sind gute Ausgangsbedingungen für *B. xylanisolvens* als Succinat-Produzent.

Tabelle 30: Vergleich der gebildeten Endprodukte (g/TG) im Wildtyp- und im Deletions-Stamm für die MM-CoA-Mutase in *P. vulgatus* und in *B. xylanisolvens*

	<i>P. vulgatus</i>		<i>B. xylanisolvens</i>	
Endprodukte [mmol/gTG]	WT	$\Delta 0309/10^A$	WT	$\Delta 12020/30$
Succinat	$3,96 \pm 0,14$	$7,6 \pm 0,13$	$6,12 \pm 0,8$	$9,3 \pm 2,0$
Acetat	$9,73 \pm 0,40$	$9,96 \pm 0,19$	$8,40 \pm 1,3$	$8,6 \pm 2,5$
Lactat	$0,15 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,13$	$0,78 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,4$
Formiat	$2,90 \pm 0,34$	$1,75 \pm 0,13$	$3,10 \pm 1,1$	$2,3 \pm 1,1$
Propionat	$2,10 \pm 0,10$	0 ± 0	$2,30 \pm 0,6$	0 ± 0

^A Lück, 2023 und Gindt *et al.*, 2024

Auch die Nebenprodukte Lactat und Formiat werden von *B. xylanisolvens* in etwas größeren Mengen gebildet (Tab. 30). Da in *P. vulgatus* die Produktion von Lactat und Formiat bereits unterbunden werden konnte (Lück, 2023; Gindt *et al.*, 2024) und das gleiche Deletions-System in dieser Arbeit auf *B. xylanisolvens* übertragbar war, ist es sehr wahrscheinlich, dass die genannten Stoffwechselwege auch in diesem Organismus ausgeschaltet werden könnten. Somit würde neben Succinat nur noch Acetat als weiteres Endprodukt verbleiben. Allerdings ist die Produktion hiervon in *B. xylanisolvens* mit 8,4 mmol/gTG im Vergleich zu *P. vulgatus* (9,7 mmol/gTG) etwas geringer, was bereits im WT-Stamm zu einem besseren Succinat:Acetat Verhältnis führt. Betrachtet man das Succinat:Acetat Verhältnis etwas genauer so beträgt dieses für *P. vulgatus* $\Delta 0309-0310$ 1:1,3 und 1:0,9 für *B. xylanisolvens* $\Delta 12020-12030$ (Tab. 30). Dieser Vergleich zeigt, dass *B. xylanisolvens* im Gegensatz zu *P. vulgatus* ein besseres Ausgangsverhältnis zwischen den beiden Produkten hat. Ein 1:1 Verhältnis zwischen Succinat und Acetat konnte im Vergleich in *P. vulgatus* erst nach der Überexpression der G6PDH in der Dreifach-Deletions-Mutante erreicht werden (Siehe Kapitle 3.1.4.3).

Da das Vorhandensein von Nebenprodukten die industrielle Aufreinigung von Succinat erschwert (Lee *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2012) bietet *B. xylanisolvens* somit neben der

allgemein höheren Ausbeute von Succinat einen weiteren Vorteil gegenüber *P. vulgatus* als Succinat-Produzent. In *P. vulgatus* konnte die Succinat-Ausbeute durch die Überexpression der G6PDH zusätzlich um 45 % gesteigert werden (siehe Kapitel 3.1.4.2) was dieses Gen ebenfalls zu einem interessanten Kandidaten für eine homologe Expression in *B. xylanisolvens* macht. Wäre der Effekt hier gleich, so wäre durch die Überexpression bereits ein Ertrag von 13,5 mmol Succinat/ gTG möglich.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass *B. xylanisolvens* ebenfalls genetisch zugänglich und, wie in diesem Kapitel gezeigt wurde, das *sacB*-Deletions-System anwendbar ist. Dies erlaubte zum ersten Mal eine markerlose Deletion in dem Organismus erlaubt hat. Zudem bietet *B. xylanisolvens* aufgrund des besseren Succinat: Acetat Verhältnisses im Vergleich zu *P. vulgatus* sowie der Fähigkeit zur Verwertung von Xylanen verschiedener Herkunft (siehe Kapitel 4.2.2.2) gute Rahmenbedingungen für eine biobasierten, biotechnologische Produktion von Succinat.

4.2.2.2 Die Xylan-Verwertung in *B. xylanisolvens*

Ein weiterer Punkt, welcher *B. xylanisolvens* zu einem interessanten Kandidaten als Succinat-Produzent macht, ist wie oben beschrieben seine Fähigkeit zum Abbau von pflanzlichen Bestandteilen wie zum Beispiel Xylanen.

Wie bereits erwähnt gehören die Xylane zu den Hemicellulosen und besitzen ein Rückgrat aus Xylose-Monomeren. Je nach Vorkommen ist dieses Rückgrat allerdings mit unterschiedlichen Seitenketten verknüpft (Dodd & Cann, 2009). Homoxylane beispielsweise tragen keine Seitenketten und sind auch nur selten in höheren Pflanzen zu finden (Ebringerová & Heinze, 2000). Arabinoxylane (AX), der Hauptbestandteil aus Getreidekörnern, hingegen beinhaltet neben dem Xylose-Rückgrat eine Vielzahl an verknüpften Arabinose-Einheiten (Ebringerová & Heinze, 2000). Selbst innerhalb der Gehölze gibt es Unterschiede. Zwar sind sowohl Xylane aus Hart- als auch Weich-Hölzern mit 4-O-Methylglucuronsäure (MeGA) Einheiten verknüpft (Glucurono-Xylan (GX), allerdings enthält Xylan aus Weichholz zusätzliche Arabinose-Verknüpfungen und wird daher als Arabino-Glucurono-Xylan (AGX) bezeichnet (Ebringerová & Heinze, 2000). Hinzu kommt ein größerer Anteil an Acetyl-Gruppen in Weichhölzern (alle 5-6 Xylose-Einheiten) im Vergleich zum Xylan aus Hartholz (alle 9-12 Xylose-Einheiten) (Bastawde,

1992). Zusätzlich ist der Polymerisierungsgrad zwischen den Xylanen sehr variabel und kann Berichten zufolge zwischen 110 und 220 liegen (Teleman *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Xylane als mögliches Substrat für *B. xylanisolvens* getestet (Kapitel 3.2.2). Das beste Wachstum neben Xylose zeigte *B. xylanisolvens* unter Nutzung von Xylooligosacchariden (XOS) (Ab. 58 A). Die in dieser Arbeit verwendeten XOS wurden aus Maiskolben isoliert. XOS aus Maiskolben enthalten typischerweise Arabinose und Glucuronsäure als Seitenketten (Buruiana *et al.*, 2017). Zusätzlich findet man in XOS aus Maiskolben Ester-Verknüpfungen mit Essig- und Ferulasäure (Buruiana *et al.*, 2017; Van Dongen *et al.*, 2011). Allerdings besitzen XOS ein deutlich geringen Polymerisierungsgrad (6 und 29 Xylose-Einheiten) (Buruiana *et al.*, 2017) als Xylane, was eine leichtere Verstoffwechslung durch *B. xylanisolvens* erklärt. Aufgrund der Beschreibung einer Aktivität der Endoxylanase Xyn10A aus *B. xylanisolvens* mit Carboxymethyl-Cellulose (Mirande *et al.*, 2010) wurde dieses Substrat in der vorliegenden Arbeit ebenfalls untersucht. Allerdings konnte hier kein Wachstum des Organismus festgestellt werden (Ab. 58,A).

Innerhalb der getesteten Xylane wurde das beste Wachstum auf Arabinoxylan gemessen. Dieses Ergebnis passt zu der Beobachtung der Autoren Centanni *et al.*, (2017), welche ebenfalls für den Organismus ein besseres Wachstum auf Arabinoxylan im Vergleich zu Xylan aus Buchenholz festgestellt haben. In dieser Arbeit wurde eine vergleichbare maximale OD von *B. xylanisolvens* auf Arabinoxylan zum Wachstum auf XOS erreicht (Abb. 58, B). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die verknüpften Arabinose-Einheiten aus dem Arabinoxylan im Gegensatz zu den MeGA-Verknüpfungen ebenfalls als C-Quelle genutzt werden können. In einer früheren Studie wurde jedoch gezeigt, dass *B. xylanisolvens* im Gegensatz zu anderen Spezies der Gattung *Bacteroides* ebenfalls in der Lage ist, Glucuronsäure zu verstoffwechseln (Centanni *et al.*, 2017). Neben dem Unterschied im Wachstum auf Arabino- und Buchen-Xylan, wurden auch Unterschiede zwischen Buchen- und Birken-Xylan beobachtet (Abb. 58, B). Obwohl es sich in beiden Fällen um Glucurono-Xylan handelt, wurden dennoch in der Vergangenheit Unterschiede beschrieben. Die Autoren Nieto-Domínguez *et al.* (2012) detektierten beispielsweise mit Hilfe einer NMR-Methode eine mehr als doppelt so großes Molekulargewicht für Xylan aus Birkenholz im Vergleich zum Xylan aus Buchenholz (Nieto-Domínguez *et al.*, 2019). Zusätzlich wurde beobachtet, dass die Gewinnung von Abbauprodukten durch eine Endoxylanase und eine β -Xylosidase ausgehend vom Buchenxylan

eine höhere Ausbeute ermöglichte (Nieto-Domínguez *et al.*, 2019). Im Gegensatz hierzu wurde in einer anderen Studie sehr ähnliche Molekulargewichte und Polymerisierungsgrade für beide Xylane festgestellt (Teleman *et al.*, 2002; Littunen *et al.*, 2015). Dementsprechend scheinen die Unterschiede in den Xylan-Strukturen noch nicht vollständig geklärt zu sein. Die in dieser Arbeit erreichte maximale OD von *B. xylanisolvens* mit Haferxylan als Substrat war mit dem auf Birkenxylan vergleichbar (Abb. 58). Diese Daten passen zu denen zuvor beschriebenen Xylanase-Aktivitäten, welche für Xylan aus Birkenholz und Hafer vergleichbar waren (Chassard *et al.*, 2007).

Neben Xylanen unterschiedlicher Herkunft wurde zusätzlich das Wachstum von *B. xylanisolvens* auf Pektin, einem weiteren pflanzlichen Bestandteil getestet. Pektin ist ein Polysaccharid, was ebenfalls in Pflanzen-Zellwänden vorkommt (Despres *et al.*, 2016 b). Das hoch komplexe Molekül besteht aus bis zu 17 verschiedenen Monosacchariden und kann bis zu 20 verschiedene Verknüpfungen beinhalten (Bonnin *et al.*, 2014; Despres *et al.*, 2016 b). Die drei Hauptpolysaccharide von Pektin, Homogalacturonan, Rhamnogalacturonan I und Rhamnogalacturonan II, enthalten hauptsächlich Galacturonsäure (Bonnin *et al.*, 2014; Despres *et al.*, 2016 b). In der vorliegenden Arbeit wurde Pektin aus Äpfeln verwendet und konnte von *B. xylanisolvens* verstoffwechselt werden (Abb. 58, A). Die maximal erreichte OD war hierbei mit den Werten des Wachstums auf Xylan vergleichbar. Die Verstoffwechslung von Pektin durch *B. xylanisolvens* wurde auch in früheren Studien bereits beschrieben (Despres *et al.*, 2016 b; Xu *et al.*, 2024).

Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass *B. xylanisolvens* nicht nur Xylane verschiedener Herkunft, sondern auch weitere pflanzliche Bestandteile wie Pektin verstoffwechseln kann. Dies ist wahrscheinlich auf die Vielzahl an glykolytisch aktiven Enzymen in *B. xylanisolvens* zurückzuführen.

Wie oben beschrieben sind Gene zur Verwertung von komplexen Polysacchariden in sogenannten PULs lokalisiert (Martens *et al.*, 2011). Diese Gene kodieren hauptsächlich für Glykosid-Hydrolasen, (GHs), Polysaccharid-Lyasen (PLs) und Carbohydrate-Esterasen (CEs) (Despres *et al.*, 2016 a; Martens *et al.*, 2011). In *B. xylanisolvens* wurden 74 entsprechende PULs detektiert (Terrapon *et al.*, 2015). Insgesamt kodiert das Genom von *B. xylanisolvens* für 261 GHs, 21 PLs und 19 CEs (Despres, *et al.*, 2016 a). Eine Transkriptom-Analyse hat jedoch

ergeben, dass während des Wachstums auf Xylan hauptsächlich PUL43 und PUL70 hochreguliert werden (Despres, *et al.* 2016 a).

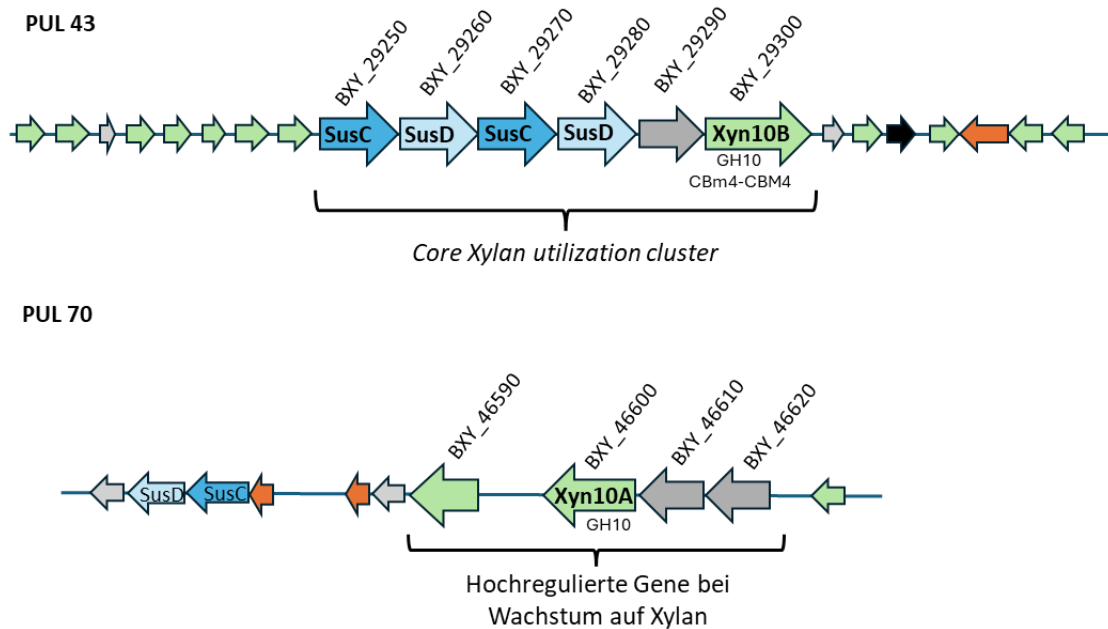


Abbildung 69: Aufbau der Polysaccharide utilization loci (PUL) 43 und 70 aus *B. xylanisolvens*. Schematische Darstellung der Anordnung der für den Abbau von Xylan kodierenden Gene in den PULs 43 und 70 von *B. xylanisolvens* (nach Despres *et al.*, 2016 a und Zhao *et al.*, 2023). Beide PULs beinhalten *susC*- und *susD*-ähnliche Gene (dunkel und hellblau). Zudem beinhalten beide PULs Gene, welche für Glykosid-Hydrolasen (grün) und Regulatoren (orange) kodieren. In PUL43 ist zusätzlich ein für Esterasen kodierendes Gen (schwarz) vorhanden. Weitere Gene die wahrscheinlich den PULs angehören sind in grau markiert.

PUL43 beinhaltet 21 verschiedene Gene (Abb. 69) wovon 13 bereits mit dem Abbau von Xylanen in Verbindung gebracht wurden (Despres *et al.*, 2016 a). Neben einigen bisher unbekannten Genen, kodieren die in PUL43 vorliegenden Sequenzen für Proteine zur Aufnahme, Regulation und Abbau von Xylanen. Hierzu zählen neben denen zu *susC* und *susD* homologen Gene auch solche die für CEs und GHs aus unterschiedlichen Familien kodieren (Despres *et al.*, 2016 a). Zudem befindet sich in PUL43 das Gen *bxy_29300*, welches für das Enzym Xyn10B kodiert. Hierbei handelt es sich um eine Endo-Xylanase, welche zur Familie der GH10 gehört und durch den Abbau von Xylan zu Xylose, Xylobiose, Xylotriose und Xylopentose eine wichtige Rolle in der Xylan-Verwertung einnimmt (Despres *et al.*, 2016 a; Zhao *et al.*, 2023). Neben der Fähigkeit zum Abbau von Xylan besitzt das Enzym aufgrund der Unterbrechung durch zwei Kohlenhydrat bindende Module CBM4 (*Carbohydrate-Binding Modules*) eine erhöhte Binde-Kapazität an das Substrat (Despres *et al.*, 2016 a).

PUL70 beinhaltet im Vergleich zu PUL43 nur 11 Gene (Abb. 69). Diese kodieren ebenfalls für SusC/D ähnliche Proteine zur Bindung von Xylan, für GHs aus unterschiedlichen Familien, regulatorische Proteine sowie vermutlich Transporter-Proteine (Despres *et al.*, 2016 a). Während bei Wachstum von *B. xylanisolvens* auf Xylan der kompletten PUL43 hochreguliert wird, sind in PUL70 nur 4 Gene betroffen (Despres *et al.*, 2016 a). Xyn10A, ein weiteres Enzym der GH10 Familie mit einer wichtigen Endoxylanase-Aktivität (Mirande *et al.*, 2010) ist in PUL70 lokalisiert (Abb. 69) (Despres *et al.*, 2016).

In Kapitel 4.2 dieser Arbeit konnte somit die genetische Zugänglichkeit des Expressionsvektors pMM656 sowie die Verwendung des *sacB*-Deletionssystems zur Generierung von markerlosen Deletions-Mutanten in *B. xylanisolvens* gezeigt werden. Zudem wurde die Verwertung unterschiedlicher Xylane durch den Organismus nachgewiesen. Die Verstoffwechslung erneuerbarer Ressourcen, zusammen mit denen im Vergleich zu *P. vulgatus* höheren Succinat-Ausbeuten, machen aus *B. xylanisolvens* einen vielversprechenden Kandidaten für zukünftige biotechnologische und nachhaltige Produktionen von Plattformchemikalien wie Succinat.

4.3 Wechselwirkung zwischen pharmazeutisch aktiven Wirkstoffen und der menschlichen Darmmikrobiota

Die Darmmikrobiota stellt mit einer Zelldichte von etwa 10^{11} Zellen/ml (Sender *et al.*, 2016) sowie einer hohen Diversität von schätzungsweise 1000 verschiedenen Arten (Qin *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010) einen wichtigen Teil des menschlichen Körpers dar. In den letzten Jahren gab es immer mehr Hinweise auf die bidirektionale Wechselwirkung zwischen der Darmmikrobiota und ihrem Wirt (Tremaroli & Bäckhed, 2012; Vernocchi *et al.*, 2020; Montagnani *et al.*, 2023). Immer öfter konnte ein Zusammenhang zwischen denen von Bakterien produzierten kurzkettigen Fettsäuren wie Butyrat, Formiat, Acetat und Propionat, und der Gesundheit des menschlichen Körpers festgestellt werden. Während Butyrat beispielsweise als wichtige Energiequelle für Kolonozyten dient (Louis & Flint, 2009), wurde die Produktion von Formiat mit der Entstehung von Kolon-Krebs (Ternes *et al.*, 2022) in Verbindung gebracht. Die Wechselwirkung beschränkt sich allerdings nicht nur auf den menschlichen Darm, sondern auch für das Nervensystem und Krankheiten wie Parkinson wurde der Einfluss der menschlichen Darmmikrobiota bereits beschrieben (Montagnani *et al.*, 2023; Duan *et al.*,

2024). Während die Darmmikrobiota also eine Rolle in der Gesundheit ihres Wirtes spielt, kann dieser wiederum die Zusammensetzung der Mikroorganismen beeinflussen. Neben geografischen (Yatsunenko *et al.*, 2012; Rehman *et al.*, 2016) und genetischen Einflüssen (Ley *et al.*, 2008), spielen hierbei externe Faktoren wie die Ernährungsweise eine große Rolle (David *et al.*, 2014; Wexler & Goodman, 2017). Zusätzlich beeinflusst die Einnahme von Antibiotika und anderen Medikamenten die Zusammensetzung der Darmmikrobiota (Dethlefsen & Relman, 2011; Vich-Vila *et al.*, 2020). So wurde beispielsweise gezeigt, dass die Einnahme des Antibiotikum Ciprofloxacin zu einer Verschiebung in der bakteriellen Zusammensetzung führt und auch Monate später der initiale Zustand nicht komplett zurückkehrt (Dethlefsen & Relman, 2011). Aber auch für nicht antibiotische Substanzen wie beispielsweise Metformin, ein gegen Typ II Diabetes eingesetztes Medikament wurden metabolische Veränderungen der Darmmikrobiota beschrieben (Vich-Vila *et al.*, 2020). Trotz der hohen Diversität gibt es einige Organismen, welche ubiquitär im Menschen vorkommen. Hierzu zählen hauptsächlich Spezies der Phyla Bacillota und Bacteroidota, wobei die Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* den größten Anteil der Darmbakterien ausmachen (Wexler & Goodman, 2017; King *et al.*, 2019; Blanco-Míguez *et al.*, 2023).

4.3.1 Auswirkung der APIs auf das Wachstumsverhalten verschiedener Darmorganismen

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von fünf aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API) auf das Wachstum verschiedener Vertreter der Darmmikrobiota untersucht. Bei API handelt es sich um chemisch basierte Wirkstoffe mit pharmakologischer Aktivität (Kumar *et al.*, 2022). Die hier untersuchten APIs Enalapril, Propranolol und Metoprolol sind Medikamente, welche zur Behandlung von Bluthochdruck eingesetzt werden (Prichard & Gillam, 1969; Regardh & Johnsson, 1980; Davies *et al.*, 1984). Fluoxetin wirkt als Anti-Depressivum (Altamura *et al.*, 1994) und Methylphenidat wird vor allem bei Kindern mit einer Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) verordnet (Kimko *et al.*, 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde für Fluoxetin und Propranolol eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung auf die 11 häufigsten Vertreter der Darmmikrobiota (King *et al.*, 2019) festgestellt (Abb. 60). Bisher wurde nur in einigen wenigen Studien eine Veränderung der

Darmmikrobiota nach Verabreichung von Propranolol untersucht, wobei diese sich auf spezifische Krankheitsfälle bezogen (Lin *et al.*, 2021; Munley *et al.*, 2025). Im Gegensatz zu Propranolol wurde Fluoxetin in früheren Studien bereits besser untersucht. Hier wurde eine anti-bakterielle Wirkung des Medikamentes auf einige Bakterien wie *E. coli*, *S. aureus* und *P. aeruginosa* beobachtet (Karine De Sousa *et al.*, 2018; Munoz-Bellido *et al.*, 2000). Dabei wurden für *E. coli* je nach Stamm sowohl eine Minimale Hemmkonzentration zwischen 32 µg/ml und 102 µg/ml (Karine De Sousa *et al.*, 2018; Foletto *et al.*, 2020) wie auch IC₅₀ Werte von 64 µg/ml (Munoz-Bellido *et al.*, 2000) beschrieben. Diese Werte entsprechen Konzentrationen zwischen 0,1 und 0,32 mM. In dieser Arbeit wurden für *E. coli* vergleichbare Werte von 0,35 mM Fluoxetin als IC₅₀ gemessen (Tab.29). Damit war die anti-bakterielle Wirkung des Anti-Depressivums allerdings für *E. coli* deutlich geringer als für die anderen Substanzen. Die Auswertung der jeweiligen Wachstumsdaten ergaben, dass für Fluoxetin bereits Konzentrationen zwischen 30 und 70 µM ausreichend waren, um das Wachstum der Organismen um 50 % zu inhibieren (IC₅₀, Tab. 29). Die in dieser Arbeit bestimmten IC₅₀ Werte von 0,03 – 0,07 mM für Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* sind mit dem ermittelten Wert für *B. fragilis* von 0,05 mM Fluoxetin (Munoz-Bellido *et al.*, 2000) vergleichbar. Die Auswirkung von Fluoxetin wurde bisher nicht auf einzelne Organismen der Darmmikrobiota untersucht. Allerdings wurde eine Veränderung der Zusammensetzung der Intestinalflora in Ratten durch die Einnahme von Fluoxetin beobachtet (Zhang *et al.*, 2021). Hier wurde eine Verschiebung von Spezies des Phylum Bacillota zu Bacteroidota festgestellt (Zhang *et al.*, 2021). In dieser Arbeit konnte kein Unterschied der antibakteriellen Wirkung auf Vertreter des Phylum Bacillota (*A. recatalis*, *F. prausnitzii*, *H. acetii* und *R. intestinalis*) im Vergleich zu Organismen des Phylum Bacteroidota (*P. dorei*, *P. vulgatus*, *B. xylanisolvens*, *B. cellulosilyticus*) festgestellt werden (Tab. 29). Die in dieser Arbeit gemessenen IC₅₀ Werte entsprachen einem Zehntel der erlaubten Tageshöchstdosis für Fluoxetin und etwa der Hälfte der Tageshöchstdosis von Propranolol (Vergleich Tab. 27 und Tab. 29). Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass ein Großteil der oral zugeführten Medikamente im Dünndarm absorbiert wird, und somit die genauen Konzentrationen, welche tatsächlich im Kolon ankommen, bisher nicht quantifizierbar sind (Zimmermann *et al.*, 2021). Zudem spielen Wechselwirkungen zwischen den Organismen eine wichtige Rolle, wodurch die Auswirkung der untersuchten API auf die einzelnen Organismen von der im tatsächlichen Lebensraum abweichen kann (Zimmermann *et al.*, 2021).

4.3.2 Nitrosierung von APIs durch Darmbakterien

Wie bereits erwähnt umfasst die menschliche Intestinalmikrobiota etwa 10^{11} Zellen/g Kolon-Inhalt (Sender *et al.*, 2016). Damit beinhaltet die Darmflora etwa 150 mal mehr Gene als das menschliche Genom (Zhu *et al.*, 2010) und bringt eine entsprechend hohe metabolische Aktivität mit sich. Aufgrund dieser hohen Aktivität wird die Darmmikrobiota auch manchmal als eigenes Organ bezeichnet (O'Hara & Shanahan, 2006) und hat durch die bestehende bidirektionalen Interaktion mit Ihrem Wirtsorganismus einen Einfluss auf die Gesundheit des Menschen (Tremaroli & Bäckhed, 2012; Vernocchi *et al.*, 2020; Montagnani *et al.*, 2023).

Neben der Verstoffwechslung von Nahrungsbestandteilen ist mittlerweile auch die Beteiligung der Mikroorganismen am Abbau von Medikamenten (Zimmermann *et al.*, 2019; Lindell *et al.*, 2022) und anderen Xenobiotika, wie Pestiziden (Harishankar *et al.*, 2013; Lindell *et al.*, 2022) bekannt. Durch diese Metabolisierung können allerdings auch reaktive Verbindungen entstehen, welche für den Menschen gesundheitsgefährdend sind. Ein Beispiel solcher Verbindungen, welche in den letzten Jahren an Interesse gewonnen haben, sind N-Nitrosamine, die schon länger mit der Bildung von Krebs in Verbindung stehen (Magee & Barnes, 1956; Bogovski & Bogovski, 1981). Diese organischen N-Nitroso-Verbindungen entstehen durch die Reaktion von sekundären und tertiären Aminen mit Nitrosierungsmitteln wie Nitrit (NO_2^-) (Anselme, 1979) oder werden unter oxidativen Bedingungen auf natürliche Art und Weise gebildet (Anselme, 1979). Berichten zufolge sind allerdings auch Mikroorganismen wie Enterobakterien an der Bildung von N-Nitrosaminen im Darm beteiligt (Calmels *et al.*, 1987; O'Donnell *et al.*, 1988).

Da allerdings bisher Daten zu weiteren Vertretern der humanen Intestinalmikrobiota fehlten, wurde in dieser Arbeit die Nitrosierung von fünf verschiedenen APIs (Abb. 70) durch elf Vertreter der menschlichen Darmmikrobiota analysiert (Abb. 62). Die untersuchten APIs verfügen alle über eine sekundäre Amin-Gruppe und somit über einen Angriffspunkt für die Nitrosierung durch Nitrit (Abb. 70). Die Untersuchungen zur Nitrosierung erfolgten sowohl für jede Spezies einzeln als auch mit Hilfe einer synthetischen Darmmikrobiota (Tab. 28), einem Gemisch der einzelnen Spezies nach deren Vorkommen im menschlichen Darm (King *et al.*, 2019).

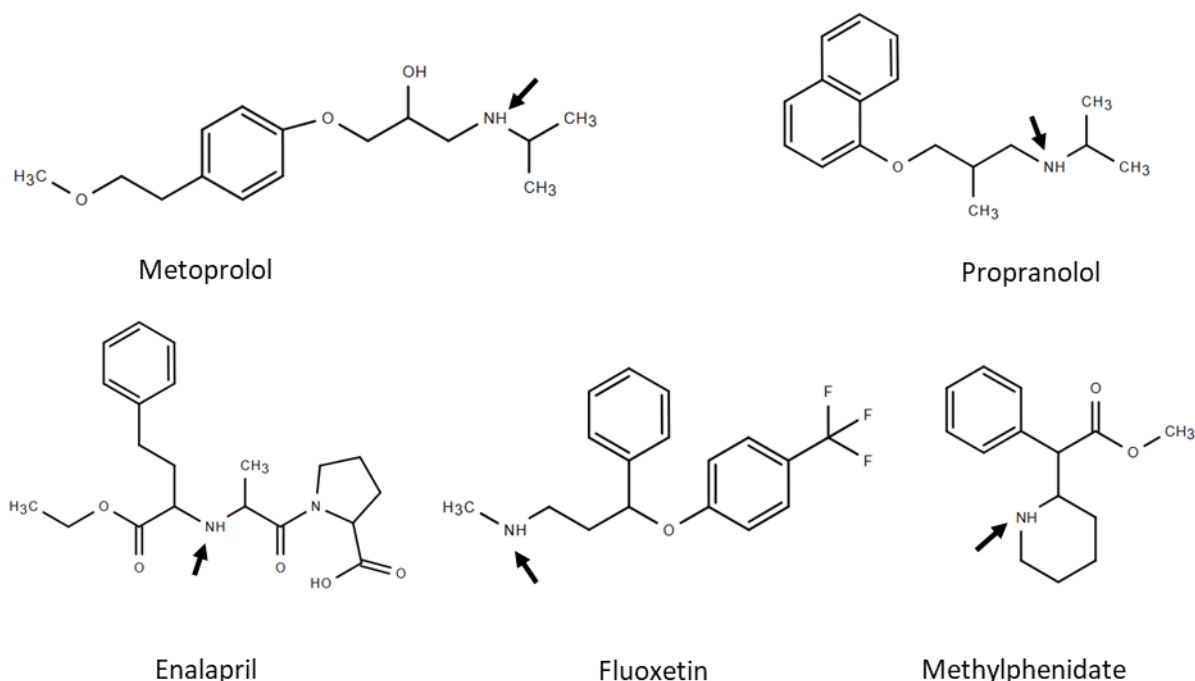


Abbildung 70: Strukturformeln der getesteten APIs. Die Pfeile markieren die Angriffsorte für Nitrit zur Bildung von N-Nitrosaminen.

Um die tatsächliche, durch die Bakterien hervorgerufene, Nitrosierung zu bestimmen, war es wichtig die während der Versuchsdurchführung auftretende chemische Reaktion zu berücksichtigen. Hierfür wurde zur Ermittlung der biologischen Reaktion der Quotient aus Gesamt- und chemischer-Nitrosierung gebildet (Kapitel 3.3.2.2).

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte nur bei vier aus 60 getesteten API-Bakterien Kombinationen eine leichte biologische Nitrosierung (Quotient > 1) festgestellt werden (Abb. 62), wobei nur die Nitrosierung von Methylphenidat durch *A. muciniphila* hoch signifikant ($p < 0,001$) war. Allerdings ist es an dieser Stelle wichtig zu betonen, dass *A. muciniphila* nur etwa 0,7 % der menschlichen Darmmikrobiota ausmacht. Zusätzlich ist es wie bereits erwähnt wichtig, die Darmbakterien in ihrer Gemeinschaft zu betrachten. In denen diesbezüglich untersuchten Ansätzen der synthetischen Darmmikrobiota (*gut mix*) konnte jedoch keine biologische Reaktion festgestellt werden (Abb. 62), was darauf hindeutet, dass *A. muciniphila* in dem bakteriellen Gemisch keinen Einfluss auf die Nitrosierung hatte. Mit Ausnahme von Fluoxetin lag der Wert der biologischen Reaktion durch *A. muciniphila* für die weiteren untersuchten APIs sogar unter eins, was ebenfalls gegen eine Nitrosierung durch den

Organismus spricht (Abb. 62). Auch für *E. coli* wurde im Widerspruch zu älteren Studien (Calmels *et al.*, 1987; O'Donnell *et al.*, 1988) keine Nitrosierung der APIs gemessen.

Die in der Literatur beschriebenen Unterschiede sind auf die Versuchsbedingungen der älteren Studien zurückzuführen. Während die Inkubationen der Bakterien mit den APIs in der vorliegenden Arbeit unter Berücksichtigung physiologischer Bedingungen erfolgte, war dies in den früheren Studien nicht der Fall. So wurde die Inkubation in vorangegangenen Untersuchungen beispielsweise, entgegen der im Darm herrschenden anaeroben Verhältnisse, in einer sauerstoffreichen Umgebung durchgeführt (Calmels *et al.*, 1988; O'Donnell *et al.*, 1988). Zudem ist die Berücksichtigung des pH-Wertes zur Untersuchung der Nitrosierung durch Darmbakterien ein ausschlaggebender Punkt, welcher in älteren Studien nicht berücksichtigt wurde (Hashimoto *et al.*, 1975). Die Produktion von kurzkettigen Fettsäuren durch die Bakterien führt zur Ansäuerung des Mediums. Dabei ist bekannt, dass der pH-Wert einen Einfluss auf die Nitrosierungen haben kann (Magee, 1971; Mirvish, 1975). Diese pH-Abhängigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit auch für Enalapril und in geringerem Maß für Fluoxetin beobachtet werden (Abb. 61). Somit ist es essenziell den pH-Wert in den Untersuchungen zu berücksichtigen. Hierfür wurde in den hier durchgeführten Versuchen von Anfang an ein stark-gepuffertes Medium verwendet, um so die Absenkung des pH-Wertes während der Inkubation möglichst gering zu halten. Da der pH-Wert im menschlichen Kolon mit pH 6,5 bis 7,5 in einem neutralen Bereich liegt, wurde in dieser Arbeit zudem die pH-abhängige chemische Reaktion für jeden Wirkstoff bestimmt und in den Berechnungen berücksichtigt.

Zusätzlich zur pH induzierten Nitrosierung der API wurde auch eine chemische Reaktion bei neutralem pH-Wert gemessen. Diese Reaktion ist möglicherweise auf die Aufreinigungsmethode zurückzuführen, bei der die mit Acetonitril versetzten Proben unter einem N₂ Strom bei 60°C eingedampft wurden. Dies führte möglicherweise zu einer erhöhten NO₂⁻ Konzentration während des Trocknungsprozesses und einer nachfolgenden Nitrosierung der APIs (persönliche Mitteilung Dr. M. Vogel, BfArM). Die gemessenen Peak-Flächen der chemischen Reaktion variierten hierbei zwischen den Proben um den Faktor 40 (persönliche Mitteilung Dr. M. Vogel, BfArM). Um diese chemische Reaktion mit einzubeziehen, wurde für jede Messung eine Kontrolle ohne Bakterienzellen mit inkubiert, gemessen und in die Berechnung mit einbezogen (Verhältnis Gesamtreaktion/chemische Reaktion, Abb. 62).

Ein weiterer wichtiger Punkt, welcher in den älteren Studien nicht berücksichtigt wurde, sind die physiologischen Nitrit-Bedingungen. Über die Nahrung nimmt der Mensch jeden Tag etwa 50-180 mg Nitrat auf (Weitzberg & Lundberg, 2013). Dieses befindet sich beispielsweise im Gemüse und Trinkwasser und wird aber auch als Konservierungsmittel oder Geschmacksverstärker eingesetzt (Weitzberg & Lundberg, 2013). Bereits in der Mundhöhle wird ein Teil des Nitrats durch die Nitratreduktasen oraler fakultativ anaerober Bakterien zu Nitrit (NO_2^-) umgewandelt (Lundberg *et al.*, 2008). Im Magen angekommen, wird das gebildete Nitrit durch den vorherrschenden sauren pH und in Gegenwart von Ascorbinsäure und Polyphenolen zum Teil zu Stickstoffmonoxid (NO) reduziert (Lundberg *et al.*, 2008). Dieses wird anschließend zusammen mit dem übergebliebenen Nitrat und Nitrit im oberen Gastrointestinaltrakt resorbiert. Etwa 75 % des aufgenommenen Nitrats wird über die Nieren im Urin ausgeschieden (Lundberg *et al.*, 2008; Weitzberg & Lundberg, 2013). Der Rest des im Blut zirkulierenden Nitrats wird über die Speicheldrüsen aufgenommen und gelangt über den Speichel wieder in die Mundhöhle, wo eine erneute Reduktion zu Nitrit stattfinden kann und der Kreislauf von vorne beginnt (Lundberg *et al.*, 2008; Weitzberg & Lundberg, 2013). Das im Blut zirkulierende NO ist für den Menschen ein wichtiges Signalmolekül, das sowohl in der Immunität sowie auch für das Cardiovasculäre- und das Zentrale Nerven-System eine bedeutende Rolle spielt (Lundberg *et al.*, 2015). Durch die schnelle Resorption von Nitrit sowie dessen Zirkulation und Umwandlung im Körper, liegen im Vergleich zu denen durch die Nahrung aufgenommenen 50-180 mg Nitrat nur geringe Konzentrationen im Darm vor. Berichten zufolge liegt die Nitrit-Konzentration im Dickdarm zwischen 0,4 und 148 μM (Hughes *et al.*, 2001; Cross *et al.*, 2003; Saul *et al.*, 1981; Kälble *et al.*, 1990). Dementsprechend wurden in der vorliegenden Arbeit 100 μM als Arbeits-Konzentration ausgewählt. In den Studien, welche die Bildung von N-Nitrosaminen durch Bakterien beschrieben haben, wurden jedoch mehr als 20-Mal höhere Konzentrationen zwischen 25 und 35 mM NO_2^- oder NO_3^- verwendet (Calmels *et al.*, 1987; O'Donnell *et al.*, 1988; Ralt *et al.*, 1988) was deutlich über den bekannten physiologischen Werten liegt. Da bereits gezeigt wurde, dass die Nitrit-Konzentration der limitierende Faktor für die Reaktion der Nitrosierung ist (Hinuma *et al.*, 1990), wurde in der vorliegenden Arbeit daher neben der Nitrosierung auch die verbleibende Nitrit-Konzentration untersucht (Abb. 63). Besonders auffällig war hierbei, dass in der Probe mit *E. coli* kein Nitrit mehr nachgewiesen werden konnte, während für *A. muciniphila* und *B. longum* keine Abnahme der Nitrit-Konzentration festgestellt wurde. Diese Beobachtung passt zu den

Ergebnissen einer Studie, in welcher der Nitrit-Abbau unterschiedlicher Darmorganismen untersucht wurde (persönlicher Mitteilung N. Hager). Demnach hat *E. coli* die höchste Aktivität der untersuchten Organismen und baut innerhalb einer Stunde 10960 μmol Nitrit/g TG ab. Im Vergleich sind Spezies der Gattungen *Bacteroides* und *Phocaeicola* 100 bis 1000-Mal langsamer und für *A. muciniphila* und *B. longum* wurde ein Abbau von weniger als 1 $\mu\text{mol/gTG}\cdot\text{h}$ berichtet (persönliche Mitteilung N. Hager).

Eine entsprechend hohe Abbaugeschwindigkeit von Nitrit könnte somit auch eine mögliche Erklärung, für die in dieser Arbeit beobachteten Verhältnisse zwischen der biologischen und chemischen Reaktion von unter eins erklären (Abb. 62). Wie bereits erwähnt fand im Hintergrund jeder Probe jeweils eine chemische Reaktion statt, weshalb für jede Messung eine interne Kontrolle ohne Bakterienzellen mitgeführt wurde. Eine Nitrit-Limitierung, durch den Abbau von Bakterien, führt allerdings zur Verringerung der chemischen Umsetzung. Dementsprechend wäre die tatsächliche chemische Reaktion in den Proben teilweise geringer als in der mitgeführten Kontrolle ohne Bakterien. Dies führt bei der Bildung des Quotienten zur bestimmung der biologischen Nitrosierung zu einem Wert kleiner als eins.

Dieser Zusammenhang zwischen der Aktivität der Nitritreduktase und Nitrosierungsvorgängen wurde bereits von Calmels *et al.* (1988) beobachtet. Hier wurde beschrieben, dass unter anaeroben Bedingungen die höchste Aktivität der Nitritreduktase in *E. coli* beobachtet wurde und gleichzeitig keine Nitrosierung stattgefunden hat (Calmels *et al.*, 1988).

Weiterhin ist es wichtig auf die Unterschiede der Daten zwischen den einzelnen Organismen und der synthetischen Darmmikrobiota hinzudeuten. Während die Ergebnisse für die einzelnen Proben variierten und die Werte für den gleichen Organismus in einzelnen Proben auf eine Nitrosierung hindeuteten (Quotient über eins bei *A. muciniphila* mit Methylphenidat), und in anderen nicht, lagen die Werte der biologischen Nitrosierung durch die synthetische Darmmikrobiota (*gut mix*) einheitlich unter eins (Abb. 62). Auch für Methylphenidat lag der Wert unter eins was gegen eine biologische Nitrosierung durch die Darmbakterien sprach (Abb. 62). Somit hatte die mögliche Nitrosierung durch *A. muciniphila* in der Gegenwart weiterer Organismen keine Auswirkung. Zusätzlich wurde ein Nitritverbrauch um 80 % durch die synthetischen Darmmikrobiota festgestellt. Dieser Verbrauch war mit Ausnahme von *E. coli* und *A. rectalis* deutlich höher als bei den restlichen Vertretern der synthetischen Darmmikrobiota (Abb. 63). Diese Daten zeigten erneut, dass durch die Organismen als

Gemeinschaft andere Ausgangsbedingungen vorliegen als in den einzelnen Kulturen. Da die Nitrosierung nur in Gegenwart von Nitrit stattfinden kann, sprechen diese Ergebnisse ebenfalls gegen eine biologische Nitrosierung.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit, außer der Nitrosierung von Methylphenidat durch *A. muciniphila*, keine weiteren Bildungen von Nitroso-APIs durch die elf häufigsten Vertreter der menschlichen Darm-Mikrobiota festgestellt. Hierbei ist zu betonen, dass *A. muciniphila* in der synthetischen Gemeinschaft ebenfalls keinen Einfluss auf die Nitrosierung hatte. Die abweichenden Ergebnisse zu älteren Studien lassen sich hierbei durch die jeweiligen Versuchsbedingungen erklären. Während in vorangehenden Untersuchungen nicht auf essenzielle Faktoren wie den pH-Wert, Nitrit-Konzentrationen und anaerobe Bedingungen geachtet wurde, fanden die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unter Berücksichtigung physiologischer Bedingungen statt. Außerdem wurde hier die chemische Hintergrundreaktion mit einberechnet. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse spiegeln somit im Gegensatz zu älteren Literaturquellen viel eher die tatsächlich im Darm stattfindenden Reaktionen wider. Allerdings muss auch darauf hingewiesen werden, dass die hier untersuchten APIs von den bisherigen verwendeten Molekülen wie Morpholin (Calmels *et al.*, 1988; O'Donnell *et al.*, 1988) und 2,3-Diaminonaphthalene (Ralt *et al.*, 1988) abweichen. Zusätzlich haben die Daten gezeigt, dass es Unterschiede zwischen den einzelnen Organismen, und einer mikrobiellen Gemeinschaft gibt. Wie oben bereits erwähnt ist es daher wichtig die Darmmikrobiota als Ganzes zu betrachten.

4.3.3 Abbau von NA-Enalapril und NA-Propranolol durch *E. coli*

In der vorliegenden Arbeit wurde für jedes getestete API in Gegenwart von *E. coli* ein Quotient der gesamt und chemischen Nitrosierung von unter 1 gemessen. Wie bereits erwähnt ist dies möglicherweise auf den schnellen Nitrit Verbrauch und somit reduzierte chemische Reaktion zurückzuführen (Kapitel 4.3.2). Eine andere Möglichkeit wäre, dass *E. coli* in der Lage ist die Nitroso-Verbindungen abzubauen. Ähnliche Beobachtungen wurden bereits für Spezies der Gattung *Lactobacillus* (L.) beschrieben (Rowland & Grasso, 1975; Duangjitcharoen & Kantachote, 2014; Kim *et al.*, 2017; Xiao *et al.*, 2018). Für *L. pentosus* liegen beispielsweise

Berichte vor, dass der Organismus die Konzentration von N-Nitrosaminen in getrockneten, fermentieren Würsten sowohl indirekt, durch den Abbau des Vorläufer-Moleküls Nitrit, als auch direkt, durch den Abbau der N-Nitrosaminen selbst, reduziert (Xiao *et al.*, 2018). Auch für Trinkwasserproben wurde der Abbau von fünf verschiedenen N-Nitrosaminen, darunter N-Nitrosodimethylamine (NDMA) und N-Nitrosodiethylamine (NDEA), durch die Spezies *Rhodococcus cercidiphylli* berichtet (Wang *et al.*, 2015). Zusätzlich beschäftigte sich eine ältere Studie mit dem Abbau von N-Nitrosaminen durch Darmbakterien (Rowland & Grasso, 1975) und zeigte, dass der Abbau vor allem durch *E. coli* und *Lactobacillus*-Spezies erfolgte.

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass eine Inkubation der Nitroso-Verbindungen N-Nitroso-Enalapril (NA-Enalapril) und N-Nitroso-Propranolol (NA-Propranolol) in Gegenwart von *E. coli* Zellen innerhalb von 24 h zu einer Abnahme, der NA-Enalapril und NA-Propranolol Konzentrationen führte (Abb. 64). So konnte beispielsweise nach 24 h Inkubation ausgehend von 0,5 µM NA-Enalapril keine Nitroso-Verbindung mehr nachgewiesen werden (Abb. 64, A). Auch die eingesetzten 2 µM NA-Propranolol wurden nach 24 h Inkubation mit *E. coli* nicht mehr detektiert (Abb. 64, B). Diese Daten passen zu vorherigen Studien, welche ebenfalls einen Abbau von NDMA und Diphenyl-Nitrosamin (DPN) bei geringeren Konzentrationen von etwa 0,5 µM zeigten (Rowland & Grasso, 1975). Hier konnte durch verschiedene *E. coli* Stämme ein Abbau von 20 – 50 % der Nitroso-Verbindung gemessen werden (Rowland & Grasso, 1975). Insgesamt deuten die vorliegenden Daten sowie einige wenige vorhandenen Studien darauf hin, dass ein Abbau von N-Nitrosaminen durch *E. coli* und einige weitere Bakterien möglich ist. Um diese Aussage zu bestätigen sind jedoch einige weitere Untersuchungen wie beispielsweise Umsetzungs-Kinetiken notwendig.

Zudem wäre es interessant nicht nur die Bildung beziehungsweise den Abbau der Nitrosamine durch Darmorganismen zu untersuchen, sondern gleichzeitig auch die Mutagenität der Nitrosoverbindungen zu ermitteln. Hierfür würde sich beispielsweise der Ames-Test anbieten. Bei diesem Test handelt es sich um einen reversen Mutationstest, welcher zur Erkennung von mutagenen Substanzen entwickelt wurde (Ames, 1971; Tejs, 2008; Thomas *et al.*, 2024). Grundlage für diesen Test bilden Stämme von *Salmonella typhimurium*, welche verschiedene Mutationen in der Histidin-Produktion aufweisen aufgrund dessen sie ohne den Zusatz der Aminosäure nicht wachsen können (Tejs, 2008; Thomas *et al.*, 2024). Durch Mutationen, welche durch die Inkubation des Bakteriums mit mutagenen Chemikalien hervorgerufen

werden, kann die fehlende Histidin-Produktion revertiert werden, was ein Wachstum des Organismus ermöglicht (Tejs, 2008; Thomas *et al.*, 2024). Diese Methode wird bereits weltweit zur Untersuchung von potenziell mutagenen Substanzen oder zur Detektion von Verunreinigungen in API angewandt (Kenyon *et al.*, 2007; Tejs, 2008; Thomas *et al.*, 2024). Würde man solche Salmonella-Stämme sowohl einzeln als auch in einer synthetischen Darmmikrobiota mit den verschiedenen NA-APIs inkubieren, oder aber die NA-APIs mit der synthetischen Darmmikrobiota vor inkubieren, und anschließend die Bildung von Kolonien beider Ansätze miteinander vergleichen, so könnte man möglicherweise sehen, ob die Mutagenität der Test-Substanzen in der Gegenwart von Darmbakterien verringert wird, was auf einen Abbau der Chemikalie durch die Darmorganismen hindeuten würde.

Zusammenfassend konnten in Kapitel 4.3 unterschiedliche Wechselwirkungen zwischen APIs und 11 Vertretern der Darmmikrobiota beobachtet werden. Zum einen wurde eine antimikrobielle Wirkung von Fluoxetin und Propranolol auf die Organismen beobachtet. Zum anderen konnte entgegen den Literaturwerten keine Nitrosierung der untersuchten APIs festgestellt werden. Im Gegenteil gab es Hinweise auf eine mögliche Inhibierung der chemischen Nitrosierung, indirekt durch die Reduktion von Nitrit und einen möglichen direkten Abbau von NA-API durch *E. coli*. Um diese Beobachtung zu bestätigen sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

5. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich sowohl mit der Nutzung von Darmbakterien zur biobasierten, biotechnologischen Succinat-Produktion als auch mit deren Rolle bei der Bildung von kanzerogenen N-Nitrosaminen.

Mit Hinblick auf eine nachhaltige biotechnologische Produktion der Plattformchemikalie Succinat, ermöglichte die Entwicklung verschiedener genetischer Systeme für *Phocaeicola (P.) vulgatus* bereits eine Verdopplung der Succinat-Produktion sowie die Eliminierung der Nebenprodukte Propionat, Lactat und Formiat (*P. vulgatus* 3xKO). Ausgehend von diesem Stamm wurden in der vorliegenden Arbeit Untersuchungen zur Minimierung von Acetat als Nebenprodukt sowie zur Steigerung der Succinat-Produktion durchgeführt. Zusätzlich wurde die Suche nach geeigneten Spezies zur biobasierten Succinat-Produktion innerhalb der Familie Bacteroidaceae erweitert.

1. In einem ersten Ansatz wurde versucht weitere Gene des fermentativen Astes von *P. vulgatus* 3xKO auszuschalten. Die Deletionen der für die Pyruvat-Kinase (BVU_0876), Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PFOR, BVU_3787), Phosphotransacetylase (BVU_0523) und Acetatkinase (BVU_0524) kodierenden Gene zeigten allerdings nicht den gewünschten Phänotypen oder führten zu einem letalen Effekt im Organismus. Daraufhin folgten Untersuchungen zur Regulation der PFOR unter Verwendung des Integrationsplasmids pMM656. Nach der Optimierung des Regulationssystems wurde eine an den Rhamnose-Promotor $P_{RhaKIPAO}$ nachgeschaltete Kopie von *bvu_3787* in das Genom von *P. vulgatus* 3xKO eingebracht. Dies ermöglichte schließlich die Deletion des genomisch kodierten Gens *bvu_3787* was vorher letale Effekte hatte. Auch wenn das System noch nicht vollends funktional ist, bietet es bereits jetzt eine vielversprechende Perspektive zur Regulation des Stoffwechsels von *P. vulgatus*.
2. Frühere Studien zeigten, dass eine Überproduktion der Transketolase (TKT) in *P. vulgatus* zu einer gesteigerten Succinat-Produktion führt. In dieser Arbeit wurde der Ertrag von Succinat durch die Überexpression der für die TKT beziehungsweise die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) kodierenden Gene *bvu_2318* und *bvu_2796* unter Verwendung des *shuttle*-Vektors pG106 in der dreifach Deletionsmutante *P. vulgatus* 3xKO um jeweils 35 % und 45 % erhöht. Die Überproduktion der G6PDH führte zusätzlich zu einem verbesserten Succinat: Acetat Verhältnis und wurde somit als Schlüsselenzym des

Pentosephosphatweg zur Erhöhung des Succinat-Ertrags identifiziert. Durch eine anschließende Kultivierung von *P. vulgatus* 3xKO pG106_p2499_g6pdh im anaeroben Kleinfermenter wurde erstmals eine Ausbeute von 10 g Succinat/L Kultur erzielt.

3. Mit Hilfe von Wachstumsversuchen wurden verschiedene Spezies der Gattungen *Phocaeicola* und *Bacteroides* auf ihre Fähigkeit zur Xylan-Verwertung untersucht. Hierbei konnte die Spezies *B. xylanisolvens* verschiedene kommerziell erhältliche Xylane als C-Quelle besonders gut nutzen. Zusätzlich wurde in dem Organismus die Funktionalität des integrativen Regulations-Plasmids pMM656 über die Expression der Nanoluc-Luciferase als auch des SacB-Deletionssystems nachgewiesen. Unter Verwendung dieses Systems wurde in *B. xylanisolvens* die für die Methylmalonyl-CoA-Mutase kodierenden Gene *bvu_12020* und *bvu_12030* deletiert und somit die Propionat-Produktion unterbunden sowie die Succinat-Ausbeute um 50 % erhöht. Der im Vergleich zu *P. vulgatus* höhere Succinat-Ertrag, das vorteilhaftere Succinat: Acetat Verhältnis sowie die effiziente Verstoffwechslung von Xylanen, machen aus *B. xylanisolvens* einen vielversprechenden Kandidaten für eine biobasierte, biotechnologische Succinat-Produktion.

Der Abbau von Antibiotika und weiteren Xenobiotika im Darm kann zu schädlichen reaktiven Molekülen führen. Besonders in den Fokus geraten ist diesbezüglich in den letzten Jahren die Entstehung von kanzerogenen Nitrosaminen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der elf häufigsten Vertreter der menschlichen Intestinalmikrobiota bei der Bildung von Nitrosaminen ausgehend von aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen (API) untersucht.

1. Wachstumsversuche mit der jeweiligen Tageshöchstdosis der APIs zeigten sowohl für Fluoxetin als auch für Propranolol eine wachstumshemmende Wirkung auf die untersuchten Organismen.
2. Die Entstehung von N-Nitroso-APIs ausgehend von Enalapril, Fluoxetin, Metoprolol, Methylphenidat und Propranolol wurde sowohl durch einzelne Spezies als auch durch eine synthetische Darmmikrobiota, bestehend aus elf Organismen, analysiert. Die Inkubation der Kulturen erfolgte hierbei unter der Berücksichtigung physiologischer Bedingungen. Mit Ausnahme von Methylphenidat durch *Akkermansia muciniphila* wurde keine Nitrosierung beobachtet. Der Nitrit-Verbrauch einzelner Organismen sowie erste Untersuchungen mit *Escherichia coli* deuteten hingegen möglicherweise auf einen Abbau von N-Nitroso-Enalapril und N-Nitroso-Propranolol hin.

6. Literaturverzeichnis

- Acharit, A., Marshall, S. E., MUIRHEAD, H., Palmieri, R. H., Noltmann, E. A. (1981). Glucose-6-Phosphate Isomerase. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 293(1063), 145–157.
- Altamura, A. C., Moro, A. R., Percudani, M. (1994). Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine: *Clinical Pharmacokinetics*, 26(3), 201–214.
- Ames, B. N. (1971). The Detection of Chemical Mutagens with Enteric Bacteria. *Chemical Mutagens* 267–282. Springer US.
- Andersson, C., Hodge, D., Berglund, K. A., Rova, U. (2007). Effect of Different Carbon Sources on the Production of Succinic Acid Using Metabolically Engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 23(2), 381–388.
- Anselme, J.-P. (1979). N -Nitrosamines, The organic chemistry of N-Nitrosamines: A Brief Review. *American chemical society* 101, 1-12. ISBN 978-0-8412-0503-1
- Bakir, M. A., Kitahara M., Sakamoto M., Matsumoto M., Benno, Y. (2006). *Bacteroides intestinalis* sp. Nov., isolated from human faeces. *International Journal of systematic and evolutionary Microbiology*, 56(1), 151–154.
- Bastawde, K. B. (1992). Xylan structure, microbial xylanases, and their mode of action. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 8(4), 353–368.
- Bencivenga-Barry, N. A., Lim, B., Herrera, C. M., Trent, M. S., Goodman, A. L. (2020). Genetic Manipulation of Wild Human Gut *Bacteroides*. *Journal of Bacteriology*, 202(3), e00544-19. <https://doi.org/10.1128/JB.00544-19>
- Bhavsar, A. P., Zhao, X., Brown, E. D. (2001). Development and Characterization of a Xylose-Dependent System for Expression of Cloned Genes in *Bacillus subtilis*: Conditional Complementation of a Teichoic Acid Mutant. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(1), 403–410.
- Bielen, A. A. M., Willquist, K., Engman, J., Van Der Oost, J., Van Niel, E. W. J., Kengen, S. W. M. (2010). Pyrophosphate as a central energy carrier in the hydrogen-producing extremely thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*. *FEMS Microbiology Letters*, 307(1), 48–54.
- Biemer, J. J. (1973). Antimicrobial Susceptibility Testing by the Kirby-Bauer Disc Diffusion Method. *Annals of clinical Laboratory science* 3(2), 135-140

- Blanco-Míguez, A., Beghini, F., Cumbo, F., McIver, L. J., Thompson, K. N., Zolfo, M., Manghi, P., Dubois, L., Huang, K. D., Thomas, A. M., Nickols, W. A., Piccinno, G., Piperni, E., Punčochář, M., Valles-Colomer, M., Tett, A., Giordano, F., Davies, R., Wolf, J., Berry, S.E., Spector, T.C., Franzosa, E.A., Pasolli E., Asnicar, F., Huttenhower C., Segata, N. (2023). Extending and improving metagenomic taxonomic profiling with uncharacterized species using MetaPhlAn 4. *Nature Biotechnology*, 41(11), 1633–1644.
- Blomfield, I. C., Vaughn, V., Rest, R. F., Eisenstein, B. I. (1991). Allelic exchange in *Escherichia coli* using the *Bacillus subtilis* *sacB* gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon. *Molecular Microbiology*, 5(6), 1447–1457.
- Bogovski, P., Bogovski, S. (1981). Special report animal species in which *n*-nitroso compounds induce cancer. *International Journal of Cancer*, 27(4), 471–474.
- Bolam, D. N., Sonnenburg, J. L. (2011). Mechanistic insight into polysaccharide use within the intestinal microbiota. *Gut Microbes*, 2(2), 86–90.
- Bonnin, E., Garnier, C., Ralet, M.-C. (2014). Pectin-modifying enzymes and pectin-derived materials: Applications and impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 519–532.
- Bozell, J. J., Petersen, G. R. (2010). Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—The US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry*, 12(4), 539. <https://doi.org/10.1039/b922014c>
- Bradford, M.M. (1976).blanco A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1– 2):248–254.
- Brunnemann, K. D., Hoffmann, D. (1991). Analytical Studies on Tobacco-Specific N-Nitrosamines in Tobacco and Tobacco Smoke. *Critical Reviews in Toxicology*, 21(4), 235–240.
- Bryan, L. E., Kowand, S. K., Van Den Elzen, H. M. (1979). Mechanism of Aminoglycoside Antibiotic Resistance in Anaerobic Bacteria: *Clostridium perfringens* and *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 15(1), 7–13.
- Buruiana, C.-T., Gómez, B., Vizireanu, C., Garrote, G. (2017). Manufacture and evaluation of xylooligosaccharides from corn stover as emerging prebiotic candidates for human health. *LWT-Food Science and Technology*, 77, 449–459.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143–155.

- Calmels, S., Ohshima, H., Bartsch, H. (1988). Nitrosamine Formation by Denitrifying and Non-denitrifying Bacteria: Implication of Nitrite Reductase and Nitrate Reductase in Nitrosation Catalysis. *Journal of General Microbiology*, 134(1), 221–226.
- Calmels, S., Ohshima, H., Rosenkranz, H., McCoy, E., Bartsch, H. (1987). Biochemical studies on the catalysis of nitrosation by bacteria. *Carcinogenesis*, 8(8), 1085–1088.
- Catlett, J. L., Catazaro, J., Cashman, M., Carr, S., Powers, R., Cohen, M. B., Buan, N. R. (2020). Metabolic Feedback Inhibition Influences Metabolite Secretion by the Human Gut Symbiont *Bacteroides thetaiotaomicron*. *mSystems*, 5(5), e00252-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00252-20>
- 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.
- Champney, W. S., Burdine, R. (1995). Macrolide antibiotics inhibit 50S ribosomal subunit assembly in *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(9), 2141–2144.
- Chassard, C., Delmas, E., Lawson, P. A., Bernalier-Donadille, A. (2008). *Bacteroides xylanisolvens* sp. Nov., a xylan-degrading bacterium isolated from human faeces. *International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 58(4), 1008–1013.
- Chassard, C., Goumy, V., Leclerc, M., Del’homme, C., Bernalier-Donadille, A. (2007). Characterization of the xylan-degrading microbial community from human faeces: Xylanolytic microbiota from human faeces. *FEMS Microbiology Ecology*, 61(1), 121–131.
- Cheng, K., Zhao, X., Zeng, J., & Zhang, J. (2012). Biotechnological production of succinic acid: Current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 302–318.
- Chung, S.-C., Park, J.-S., Yun, J., Park, J. H. (2017). Improvement of succinate production by release of end-product inhibition in *Corynebacterium glutamicum*. *Metabolic Engineering*, 40, 157–164.
- Clausen, U., Vital, S.-T., Lambertus, P., Gehler, M., Scheve, S., Wöhlbrand, L., Rabus, R. (2024). Catabolic Network of the Fermentative Gut Bacterium *Phocaeicola vulgatus* (Phylum Bacteroidota) from a Physiologic-Proteomic Perspective. *Microbial Physiology*, 34(1), 88–107.

- Cok, B., Tsiropoulos, I., Roes, A. L., Patel, M. K. (2014). Succinic acid production derived from carbohydrates: An energy and greenhouse gas assessment of a platform chemical toward a bio-based economy. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(1), 16–29.
- Correa, P. (1992). Human Gastric Carcinogenesis: A Multistep and Multifactorial Process First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer research*. 52, 6735–6740.
- Crittenden, R., Karppinen, S., Ojanen, S., Tenkanen, M., Fagerström, R., Mättö, J., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Poutanen, K. (2002). *In vitro* fermentation of cereal dietary fibre carbohydrates by probiotic and intestinal bacteria. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(8), 781–789.
- Cross, A. J., Pollock, J. R. A., & Bingham, S. A. (2003). Haem, not Protein or Inorganic Iron, Is Responsible for Endogenous Intestinal N-Nitrosation Arising from Red Meat. *Cancer Research*. 63, 2358-2360
- D’ambrosio, S., Alfano, A., Cimini, D. (2021). Production of Succinic Acid From *Basfia succiniciproducens*. *Frontiers in Chemical Engineering*, 3, 785691. <https://doi.org/10.3389/fceng.2021.785691>
- David, L. A., Maurice, C. F., Carmody, R. N., Gootenberg, D. B., Button, J. E., Wolfe, B. E., Ling, A. V., Devlin, A. S., Varma, Y., Fischbach, M. A., Biddinger, S. B., Dutton, R. J., Turnbaugh, P. J. (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505(7484), 559–563.
- Davies, R., Gomez, H., Irvin, J., Walker, J. (1984). An overview of the clinical pharmacology of enalapril. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 18(S2), 215S-229S.
- Den Besten, G., Van Eunen, K., Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D.-J., Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2325–2340.
- Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Chambon, C., Yeoman, C. J., Berg Miller, M. E., Fields, C. J., Martens, E., Terrapon, N., Henrissat, B., White, B. A., Mosoni, P. (2016 a). Xylan degradation by the human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1AT involves two distinct gene clusters that are linked at the transcriptional level. *BMC Genomics*, 17(1), 326. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2680-8>
- Despres, J., Forano, E., Lepercq, P., Comtet-Marre, S., Jubelin, G., Yeoman, C. J., Miller, M. E. B., Fields, C. J., Terrapon, N., Le Bourvellec, C., Renard, C. M. G. C., Henrissat, B., White, B. A., Mosoni, P. (2016 b). Unraveling the pectinolytic function of *Bacteroides xylanisolvens* using a RNA-seq approach and mutagenesis. *BMC Genomics*, 17(1), 147. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2472-1>

- Dessie, W., Xin, F., Zhang, W., Jiang, Y., Wu, H., Ma, J., Jiang, M. (2018). Opportunities, challenges, and future perspectives of succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(23), 9893–9910.
- Dethlefsen, L., & Relman, D. A. (2011). Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(supplement_1), 4554–4561.
- Dodd, D., Cann, I. K. O. (2009). Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. *GCB Bioenergy*, 1(1), 2–17.
- Dodd, D., Mackie, R. I., Cann, I. K. O. (2011). Xylan degradation, a metabolic property shared by rumen and human colonic Bacteroidetes. *Molecular Microbiology*, 79(2), 292–304.
- Döring, C., & Basen, M. (2024). Propionate production by Bacteroidia gut bacteria and its dependence on substrate concentrations differs among species. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 17(1), 95. <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02539-9>
- Duan, W.-X., Wang, F., Liu, J.-Y., Liu, C.-F. (2024). Relationship Between Short-chain Fatty Acids and Parkinson's Disease: A Review from Pathology to Clinic. *Neuroscience Bulletin*, 40(4), 500–516.
- Duangjitcharoen, Y., & Kantachote, D. (2014). Selection and characterization of probiotic lactic acid bacteria with heterocyclic amine binding and nitrosamine degradation properties. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(7), 14–23.
- Ebringerová, A., Heinze, T. (2000). Xylan and xylan derivatives—Biopolymers with valuable properties, 1. Naturally occurring xylans structures, isolation procedures and properties. *Macromolecular Rapid Communications*, 21(9), 542–556.
- Egert, M., De Graaf, A. A., Smidt, H., De Vos, W. M., Venema, K. (2006). Beyond diversity: Functional microbiomics of the human colon. *Trends in Microbiology*, 14(2), 86–91.
- Eggerth, A. H., Gagnon, B. H. (1933). The Bacteroides of Human Feces. *Journal of Bacteriology*, 25(4), 389–413.
- Elzein, R., Abdelrahman, S., Hay, M., Lopez, M., Bondy, M., Morris, D., Legator, M. (2005). Cytogenetic effects in children treated with methylphenidate. *Cancer Letters*, 230(2), 284–291. 3
- Ema, (2020). Lessons learnt from presence of N-nitrosamine impurities in sartan medicines, *European medicines agency*, EMA/526934/2019
- England, C. G., Ehlerding, E. B., Cai, W. (2016). NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjugate Chemistry*, 27(5), 1175–1187.

- Evans, H. J., & Wood, H. G. (1968). The mechanism of the pyruvate, phosphate dikinase reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 61(4), 1448–1453.
- Fairhurst, A. S., King, H. K., Sewell, C. E. (1956). Studies in Amino Acid Biogenesis: The Synthesis of Alanine from Pyruvate and Ammonia. *Journal of General Microbiology*, 15(1), 106–120.
- Fieseler, L., Schmitter, S., Teiserskas, J., Loessner, M. J. (2012). Rhamnose-Inducible Gene Expression in *Listeria monocytogenes*. *PLoS ONE*, 7(8), e43444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043444>
- Flint, H. J., Scott, K. P., Duncan, S. H., Louis, P., Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 3(4), 289–306.
- Foletto, V. S., Serafin, M. B., Bottega, A., Da Rosa, T. F., Machado, C. D. S., Coelho, S. S., Hörner, R. (2020). Repositioning of fluoxetine and paroxetine: Study of potential antibacterial activity and its combination with ciprofloxacin. *Medicinal Chemistry Research*, 29(3), 556–563.
- Forster, S. C., Kumar, N., Anonye, B. O., Almeida, A., Viciani, E., Stares, M. D., Dunn, M., Mkandawire, T. T., Zhu, A., Shao, Y., Pike, L. J., Louie, T., Browne, H. P., Mitchell, A. L., Neville, B. A., Finn, R. D., Lawley, T. D. (2019). A human gut bacterial genome and culture collection for improved metagenomic analyses. *Nature Biotechnology*, 37(2), 186–192.
- Franke, T. (2020). *Aufklärung des zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus des Darmbakteriums Prevotella copri*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Fujita, Y., Matsuoka, H., Hirooka, K. (2007). Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular Microbiology*, 66(4), 829–839.
- Fukuda, S., Toh, H., Taylor, T. D., Ohno, H., Hattori, M. (2012). Acetate-producing bifidobacteria protect the host from enteropathogenic infection via carbohydrate transporters. *Gut Microbes*, 3(5), 449–454.
- García-Bayona, L., & Comstock, L. E. (2019). Streamlined Genetic Manipulation of Diverse *Bacteroides* and *Parabacteroides* Isolates from the Human Gut Microbiota. *mBio*, 10(4), e01762-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01762-19>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02083>

- Gay, P., Le Coq, D., Steinmetz, M., Berkelman, T., Kado, C. I. (1985). Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 164(2), 918–921.
- 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. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00365>
- Gerlach, E. S., Altamirano, S., Yoder, J. M., Luggya, T. S., Akampurira, A., Meya, D. B., Boulware, D. R., Rhein, J., Nielsen, K. (2021). ATI-2307 Exhibits Equivalent Antifungal Activity in *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates With High and Low Fluconazole IC50. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 695240. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.695240>
- Gindt, M. E., Lück, R., Deppenmeier, U. (2024). Genetic optimization of the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus* for enhanced succinate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 108(1), 465.
- Guettler, M. W., Jain, K., & Soni, B. K. (1999). *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *International journal of Systematic Bacteriology*, 49, 207-2016
- Hallenbeck, P., John R. Benemann. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11–12), 1185–1193.
- Haltrich, D., Nidetzky, B., Kulbe, K. D., Steiner, W., & Župančič, S. (1996). Production of fungal xylanases. *Bioresource Technology*, 58(2), 137–161.
- Harishankar, M. K., Sasikala, C., Ramya, M. (2013). Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. *3 Biotech*, 3(2), 137–142.
- Hashimoto, S., Kawai, Y., Mutai, M. (1975). In Vitro N -Nitrosodimethylamine Formation by Some Bacteria. *Infection and Immunity*, 11(6), 1405–1406.
- Hasona, A., Kim, Y., Healy, F. G., Ingram, L. O., Shanmugam, K. T. (2004). Pyruvate Formate Lyase and Acetate Kinase Are Essential for Anaerobic Growth of *Escherichia coli* on Xylose. *Journal of Bacteriology*, 186(22), 7593–7600.
- Hatamoto, M., Kaneshige, M., Nakamura, A., Yamaguchi, T. (2014). *Bacteroides luti* sp. Nov., an anaerobic, cellulolytic and xylanolytic bacterium isolated from methanogenic sludge. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 1770–1774.
- 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.

- Hinuma, K., Matsuda, J., Tanida, N., Hori, S., Tamura, K., Ohno, T., Kano, M., Shimoyama, T. (1990). N-nitrosamines in the stomach with special reference to in vitro formation, and kinetics after intragastric or intravenous administration in rats. *Gastroenterologia Japonica*, 25(4), 417–424.
- Hughes, R., Cross, A. J., Pollock, J. R. A., Bingham, S. (2001). Dose-dependent effect of dietary meat on endogenous colonic. *Carcinogenesis* 22(1), 199-202
- Hutchins, A. M., Holden, J. F., Adams, M. W. W. (2001). Phosphoenolpyruvate Synthetase from the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, 183(2), 709–715.
- 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, 231–237.
- Izydorczyk, M. S., Biliaderis, C. G. (1995). Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydrate Polymers*, 28(1), 33–48.
- Jäger, W., Schäfer, A., Pühler, A., Labes, G., Wohlleben, W. (1992). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene leads to sucrose sensitivity in the gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology*, 174(16), 5462–5465.
- Jean, S., Wallace, M. J., Dantas, G., Burnham, C.-A. D. (2022). Time for Some Group Therapy: Update on Identification, Antimicrobial Resistance, Taxonomy, and Clinical Significance of the *Bacteroides fragilis* Group. *Journal of Clinical Microbiology*, 60(9), e02361-20. <https://doi.org/10.1128/jcm.02361-20>
- Jones, K. R., Belvin, B. R., Macrina, F. L., Lewis, J. P. (2020). Sequence and characterization of shuttle vectors for molecular cloning in *Porphyromonas*, *Bacteroides* and related bacteria. *Molecular Oral Microbiology*, 35(4), 181–191.
- Kälble, T., Tricker, A. R., Mähring, K., Berger, M. R., Geiss, H., Staehler, G. (1990). The role of nitrate, nitrite and N-nitrosamines in carcinogenesis of colon tumours following ureterosigmoidostomy. *Urological Research*, 18(2), 123–129.
- Kamada, N., Chen, G. Y., Inohara, N., Núñez, G. (2013). Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nature Immunology*, 14(7), 685–690.
- Kaoutari, A. E., Armougom, F., Gordon, J. 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.

- Karine De Sousa, A., Rocha, J. E., Gonçalves De Souza, T., Sampaio De Freitas, T., Ribeiro-Filho, J., Melo Coutinho, H. D. (2018). New roles of fluoxetine in pharmacology: Antibacterial effect and modulation of antibiotic activity. *Microbial Pathogenesis*, 123, 368–371.
- Kelly, C. L., Taylor, G. M., Hitchcock, A., Torres-Méndez, A., Heap, J. T. (2018). A Rhamnose-Inducible System for Precise and Temporal Control of Gene Expression in Cyanobacteria. *ACS Synthetic Biology*, 7(4), 1056–1066.
- Kenyon, M. O., Cheung, J. R., Dobo, K. L., Ku, W. W. (2007). An evaluation of the sensitivity of the Ames assay to discern low-level mutagenic impurities. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 48(1), 75–86.
- Kim, J. Y., Ahn, Y.-J., Lee, J. A., Lee, S. Y. (2023). Recent advances in the production of platform chemicals using metabolically engineered microorganisms. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 40, 100777. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2023.100777>
- Kim, S. H., Keum, B., Choi, H. S., Kim, E. S., Seo, Y. S., Jeon, Y. T., Lee, H. S., Chun, H. J., Um, S. H., Kim, C. D. (2020). Stomach Volume Assessment Using Three-dimensional Computed Tomography Gastrography for Bariatric Treatment. *Obesity Surgery*, 30(2), 401–406.
- Kim, S.-H., Kang, K. H., Kim, S. H., Lee, S., Lee, S.-H., Ha, E.-S., Sung, N.-J., Kim, J. G., Chung, M. J. (2017). Lactic acid bacteria directly degrade N-nitrosodimethylamine and increase the nitrite-scavenging ability in kimchi. *Food Control*, 71, 101–109.
- Kim, W. J., Ahn, J. H., Kim, H. U., Kim, T. Y., Lee, S. Y. (2017). Metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production based on elementary mode analysis with clustering. *Biotechnology Journal*, 12(2), 1600701. <https://doi.org/10.1002/biot.201600701>
- Kimko, H. C., Cross, J. T., Abernethy, D. R. (1999). Pharmacokinetics and Clinical Effectiveness of Methylphenidate: *Clinical Pharmacokinetics*, 37(6), 457–470.
- King, C. H., Desai, H., Sylvetsky, A. C., LoTempio, J., Ayanyan, S., Carrie, J., Crandall, K. A., Fochtman, B. C., Gasparyan, L., Gulzar, N., Howell, P., Issa, N., Krampis, K., Mishra, L., Morizono, H., Pisegna, J. R., Rao, S., Ren, Y., Simonyan, V., Smith, K., VedBrat, S., Yao, M.D., Mazumder, R. (2019). Baseline human gut microbiota profile in healthy people and standard reporting template. *PLOS ONE*, 14(9), e0206484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206484>
- Kino, Y., Nakayama-Imaohji, H., Fujita, M., Tada, A., Yoneda, S., Murakami, K., Hashimoto, M., Hayashi, T., Okazaki, K., Kuwahara, T. (2016). Counterselection employing mutated pheS for markerless genetic deletion in *Bacteroides* species. *Anaerobe*, 42, 81–88.

- Koendjibiharie, 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. *Journal of Biological Chemistry*, 295(7), 1867–1878.
- Koropatkin, N. M., Martens, E. C., Gordon, J. I., Smith, T. J. (2008). Starch Catabolism by a Prominent Human Gut Symbiont Is Directed by the Recognition of Amylose Helices. *Structure*, 16(7), 1105–1115.
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123954>
- Kumar, V., Bansal, V., Madhavan, A., Kumar, M., Sindhu, R., Awasthi, M. K., Binod, P., Saran, S. (2022). Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: A critical review of current biotechnological approaches. *Bioengineered*, 13(2), 4309–4327.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680–685.
- Laureano-Perez, L., Teymouri, F., Alizadeh, H., Dale, B. E. (2005). Understanding Factors that Limit Enzymatic Hydrolysis of Biomass. (Hrsg.), *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, Humana Press 1081–1099.
- 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, W. G., Lee, S. Y., Chang, H. N. (2001). Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology & Bioengineering*, 72(1), 41–48.
- Lee, S. J., Song, H., Lee, S. Y. (2006). Genome-Based Metabolic Engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for Succinic Acid Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1939–1948.
- Lee, S. Lee, S. Hong, H. Chang, P. (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.

- Ley, R. E., Hamady, M., Lozupone, C., Turnbaugh, P. J., Ramey, R. R., Bircher, J. S., Schlegel, M. L., Tucker, T. A., Schrenzel, M. D., Knight, R., Gordon, J. I. (2008). Evolution of Mammals and Their Gut Microbes. *Science*, 320(5883), 1647–1651.
- Li, Q., Wang, D., Wu, Y., Yang, M., Li, W., Xing, J., & Su, Z. (2010). Kinetic evaluation of products inhibition to succinic acid producers *Escherichia coli* NZN111, AFP111, BL21, and *Actinobacillus succinogenes* 130ZT. *The Journal of Microbiology*, 48(3), 290–296.
- Lim, B., Zimmermann, M., Barry, N. A., Goodman, A. L. (2017). Engineered Regulatory Systems Modulate Gene Expression of Human Commensals in the Gut. *Cell*, 169(3), 547–558.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.045>
- Lin, Y.-T., Lin, T.-Y., Hung, S.-C., Liu, P.-Y., Hung, W.-C., Tsai, W.-C., Tsai, Y.-C., Delicano, R. A., Chuang, Y.-S., Kuo, M.-C., Chiu, Y.-W., Wu, P.-H. (2021). Differences in the Microbial Composition of Hemodialysis Patients Treated with and without β -Blockers. *Journal of Personalized Medicine*, 11(3), 198. <https://doi.org/10.3390/jpm11030198>
- Lindell, A. E., Zimmermann-Kogadeeva, M., Patil, K. R. (2022). Multimodal interactions of drugs, natural compounds and pollutants with the gut microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 20(7), 431–443.
- 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.
- Littunen, K., Kilpeläinen, P., Junka, K., Sipponen, M., Master, E. R., Seppälä, J. (2015). Effect of Xylan Structure on Reactivity in Graft Copolymerization and Subsequent Binding to Cellulose. *Biomacromolecules*, 16(4), 1102–1111.
- Liu, X., Zhao, G., Sun, S., Fan, C., Feng, X., Xiong, P. (2022). Biosynthetic Pathway and Metabolic Engineering of Succinic Acid. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 843887. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.843887>
- Louis, P., Flint, H. J. (2009). Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine. *FEMS Microbiology Letters*, 294(1), 1–8.
- Lozupone, C. A., Stombaugh, J. I., Gordon, J. I., Jansson, J. K., Knight, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415), 220–230.
- Lück, R. (2023). *Biotechnologische Produktion der Plattformchemikalie Succinat durch das Darmbakterium Phocaeicola vulgatus*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

- 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.
- Lundberg, J. O., Gladwin, M. T., Weitzberg, E. (2015). Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(9), 623–641.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Cole, J. A., & Benjamin, N. (2004). Nitrate, bacteria and human health. *Nature reviews microbiology* 2(7), 593–602.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., Gladwin, M. T. (2008). The nitrate–nitrite–nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(2), 156–167.
- Magee, P. N. (1971). Toxicity of nitrosamines: Their possible human health hazards. *Food and Cosmetics Toxicology*, 9(2), 207–218.
- Magee, P. N., Barnes, J. M. (1956). The Production of Malignant Primary Hepatic Tumours in the Rat by Feeding Dimethylnitrosamine. *British Journal of Cancer*, 10(1), 114–122.
- Martens, E. C., Koropatkin, N. M., Smith, T. J., Gordon, J. I. (2009). Complex Glycan Catabolism by the Human Gut Microbiota: The Bacteroidetes Sus-like Paradigm. *Journal of Biological Chemistry*, 284(37), 24673–24677.
- Martens, E. C., Lowe, E. C., Chiang, H., Pudlo, N. A., Wu, M., McNulty, N. P., Abbott, D. W., Henrissat, B., Gilbert, H. J., Bolam, D. N., Gordon, J. I. (2011). Recognition and Degradation of Plant Cell Wall Polysaccharides by Two Human Gut Symbionts. *PLoS Biology*, 9(12), e1001221. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001221>
- McKendry, P. (2002). Energy production from biomass (part 1): Overview of biomass. *Bioresource Technology*, 83(1), 37–46.
- McKinlay, J. B., Vieille, C., Zeikus, J. G. (2007). Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 727–740.
- McNulty, N. P., Wu, M., Erickson, A. R., Pan, C., Erickson, B. K., Martens, E. C., Pudlo, N. A., Muegge, B. D., Henrissat, B., Hettich, R. L., Gordon, J. I. (2013). Effects of Diet on Resource Utilization by a Model Human Gut Microbiota Containing *Bacteroides cellulosilyticus* WH2, a Symbiont with an Extensive Glycobiome. *PLoS Biology*, 11(8), e1001637. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001637>
- 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.

- Mimee, M., Tucker, A. C., Voigt, C. A., Lu, T. K. (2015). Programming a Human Commensal Bacterium, *Bacteroides thetaiotaomicron*, to Sense and Respond to Stimuli in the Murine Gut Microbiota. *Cell Systems*, 1(1), 62–71.
- Mirande, C., Mosoni, P., Béra-Maillet, C., Bernalier-Donadille, A., Forano, E. (2010). Characterization of Xyn10A, a highly active xylanase from the human gut bacterium *Bacteroides xylanisolvens* XB1A. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), 2097–2105.
- Mirvish, S. S. (1975). Formation of N-nitroso compounds: Chemistry, kinetics, and in vivo occurrence. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 31(3), 325–351.
- Mirzaei, R., Afaghi, A., Babakhani, S., Sohrabi, M. R., Hosseini-Fard, S. R., Babolhavaeji, K., Khani Ali Akbari, S., Yousefimashouf, R., & Karampoor, S. (2021). Role of microbiota-derived short-chain fatty acids in cancer development and prevention. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 139, 111619. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111619>
- Mitreă, L., Teleky, B.-E., Nemes, S.-A., Plamada, D., Varvara, R.-A., Pascuta, M.-S., Ciont, C., Cocean, A.-M., Medeleanu, M., Nistor, A., Rotar, A.-M., Pop, C.-R., Vodnar, D.-C. (2024). Succinic acid – A run-through of the latest perspectives of production from renewable biomass. *Heliyon*, 10(3), e25551. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25551>
- Montagnani, M., Bottalico, L., Potenza, M. A., Charitos, I. A., Topi, S., Colella, M., & Santacroce, L. (2023). The Crosstalk between Gut Microbiota and Nervous System: A Bidirectional Interaction between Microorganisms and Metabolome. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(12), 10322. <https://doi.org/10.3390/ijms241210322>
- Mott, J. E., Grant, R. A., Ho, Y. S., Platt, T. (1985): Maximizing gene expression from plasmid vectors containing the λ PL promoter: strategies for overproducing transcription termination factor p. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 82, 88–92.
- Munley, J. A., Kelly, L. S., Park, G., Pons, E. E., Apple, C. G., Kannan, K. B., Bible, L. E., Efron, P. A., Nagpal, R., Mohr, A. M. (2025). Nonselective beta blockade enhances gut microbiome diversity in a rodent model of trauma, hemorrhage, and chronic stress. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 98(2), 309–318.
- Munoz-Bellido, J. L., Munoz-Criado, S., Garcia-Rodriguez, J. A. (2000). Antimicrobial activity of psychotropic drugs Selective serotonin reuptake inhibitors. *Antimicrobial agents* 14(2000), 177–180.
- Murray, W. D., Wemyss, K. B., Khan, A. W. (1983). Increased Ethanol Production and Tolerance by a Pyruvate-Negative Mutant of *Clostridium saccharolyticum*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18, 71–74.

- Nanda, K. K., Tignor, S., Clancy, J., Marota, M. J., Allain, L. R., D'Addio, S. M. (2021). Inhibition of N-Nitrosamine Formation in Drug Products: A Model Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(12), 3773–3775.
- Nath, K., Das, D. (2004). Improvement of fermentative hydrogen production: Various approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(5), 520-529.
- Nawrocki, J., Andrzejewski, P. (2011). Nitrosamines and water. *Journal of Hazardous Materials*, 189(1–2), 1–18.
- Neff, A., Lück, R., Hövels, M., Deppenmeier, U. (2023). Expanding the repertoire of counterselection markers for markerless gene deletion in the human gut bacterium *Phocaeicola vulgatus*. *Anaerobe*, 81, 102742. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2023.102742>
- Nghiem, N., Kleff, S., Schwegmann, S. (2017). Succinic Acid: Technology Development and Commercialization. *Fermentation*, 3(26), <https://doi.org/10.3390/fermentation3020026>
- Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A., Wilson, D. N. (2014). Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biological Chemistry*, 395(5), 559–575.
- Nieto-Domínguez, M., Martínez-Fernández, J. A., De Toro, B. F., Méndez-Líter, J. A., Cañada, F. J., Prieto, A., De Eugenio, L. I., Martínez, M. J. (2019). Exploiting xylan as sugar donor for the synthesis of an antiproliferative xyloside using an enzyme cascade. *Microbial Cell Factories*, 18(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1223-9>
- Nikolich, M. P., Shoemaker, N. B., & Salyers, A. A. (1992). A *Bacteroides* tetracycline resistance gene represents a new class of ribosome protection tetracycline resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(5), 1005–1012.
- Nishiyama, T., Ueki, A., Kaku, N., Watanabe, K., Ueki, K. (2009). *Bacteroides graminisolvens* sp. Nov., a xylanolytic anaerobe isolated from a methanogenic reactor treating cattle waste. *International Journal of Systematic And Evolutionary Microbiology*, 59(8), 1901–1907.
- O'Donnell, C. M., Edwards, C., Ware, J. (1988). Nitrosamine formation by clinical isolates of enteric bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 51(2–3), 193–197.
- O'Hara, A. M., Shanahan, F. (2006). The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Reports*, 7(7), 688–693.

- Olson, D. G., Hörl, M., Fuhrer, T., Cui, J., Zhou, J., Maloney, M. I., Amador-Noguez, D., Tian, L., Sauer, U., Lynd, L. R. (2017). Glycolysis without pyruvate kinase in *Clostridium thermocellum*. *Metabolic Engineering*, 39, 169–180.
- Park, J., Seo, J., Lee, J., Kwon, H. (2015). Distribution of Seven N-Nitrosamines in Food. *Toxicological Research*, 31(3), 279–288.
- Parker, A. C., Jeffrey Smith, C. (2012). Development of an IPTG inducible expression vector adapted for *Bacteroides fragilis*. *Plasmid*, 68(2), 86–92.
- Parr, M. K., Joseph, J. F. (2019). NDMA impurity in valsartan and other pharmaceutical products: Analytical methods for the determination of N-nitrosamines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164, 536–549.
- Patel, E. H., Paul, L. V., Casanueva, A. I., Patrick, S., Abratt, V. R. (2009). Overexpression of the rhamnose catabolism regulatory protein, RhaR: A novel mechanism for metronidazole resistance in *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 267–273.
- Patel, E. H., Paul, L. V., Patrick, S., Abratt, V. R. (2008). Rhamnose catabolism in *Bacteroides thetaiotaomicron* is controlled by the positive transcriptional regulator RhaR. *Research in Microbiology*, 159(9–10), 678–684.
- Pateraki, C., Almquist, H., Ladakis, D., Lidén, G., Koutinas, A. A., Vlysidis, A. (2016). Modelling succinic acid fermentation using a xylose based substrate. *Biochemical Engineering Journal*, 114, 26–41.
- Pellicic, V., Reyrat, J. M., Gicquel, B. (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on *Mycobacteria*. *Journal of Bacteriology*, 178(4), 1197–1199.
- Perlas, A., Mitsakakis, N., Hanbidge, A. (2009). Ultrasound Assessment of Gastric Content and Volume. *Anesthesiology* 111, 82-89.
- Petzel, J. P., Hartman, S. P. A., Allison, M. J. (1989). Pyrophosphate-Dependent Enzymes in Walled Bacteria Phylogenetically Related to the Wall-Less Bacteria of the Class Mollicutes. *International journal of systematic bacteriology* 39(4), 413–419.
- Polizeli, M. L. T. M., Rizzatti, A. C. S., Monti, R., Terenzi, H. F., Jorge, J. A., & Amorim, D. S. (2005). Xylanases from fungi: Properties and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 67(5), 577–591.
- Popovic, M. (2019). Thermodynamic properties of microorganisms: Determination and analysis of enthalpy, entropy, and Gibbs free energy of biomass, cells and colonies of 32 microorganism species. *Heliyon*, 5(6), e01950. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01950>

- Prichard, B. N. C., & Gillam, P. M. S. (1969). Treatment of Hypertension with Propranolol. *British Medical Journal* 1, 7-16.
- Pudlo, N. A., Urs, K., Crawford, R., Pirani, A., Atherly, T., Jimenez, R., Terrapon, N., Henrissat, B., Peterson, D., Ziemer, C., Snitkin, E., Martens, E. C. (2022). Phenotypic and Genomic Diversification in Complex Carbohydrate-Degrading Human Gut Bacteria. *mSystems*, 7(1), e00947-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.00947-21>
- Putnins, R. F., Yamada, E. W. (1975). Colorimetric determination of inorganic pyrophosphate by a manual or automated method. *Analytical Biochemistry*, 68(1), 185–195.
- Qaseem, M. F., Shaheen, H., & Wu, A.-M. (2021). Cell wall hemicellulose for sustainable industrial utilization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 144, 110996. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2021.110996>
- 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., ... Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), 59–65.
- Quandt, J., Hynes, M. F. (1993). Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in Gram-negative bacteria. *Gene*, 127(1), 15–21.
- Ralt, D., Wishnok, J. S., Fitts, R., Tannenbaum, S. R. (1988). Bacterial catalysis of nitrosation: Involvement of the nar operon of Escherichia coli. *Journal of Bacteriology*, 170(1), 359–364.
- Rasmussen, B. A., Bush, K., & Tally, F. P. (1993). Antimicrobial Resistance in *Bacteroides*. *Clinical infectious diseases* 16(S4) S390-S400
- Reeves, R. E. (1968). A New Enzyme with the Glycolytic Function of Pyruvate Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 243(11), 3202–3204.
- Reeves, R. E. (1971). Pyruvatephosphate dikinase from *Bacteroides symbiosus*. *Biochemical Journal*, 125(2), 531–539.
- Regardh, C.-G., Johnsson, G. (1980). Clinical Pharmacokinetics of Metoprolol: *Clinical Pharmacokinetics*, 5(6), 557–569.
- Rehman, A., Rausch, P., Wang, J., Skieceviciene, J., Kiudelis, G., Bhagalia, K., Amarapurkar, D., Kupcinskas, L., Schreiber, S., Rosenstiel, P., Baines, J. F., Ott, S. (2016). Geographical patterns of the standing and active human gut microbiome in health and IBD. *Gut*, 65(2), 238–248.

- Rinninella, E., Tohumcu, E., Raoul, P., Fiorani, M., Cintoni, M., Mele, M. C., Cammarota, G., Gasbarrini, A., Ianiro, G. (2023). The role of diet in shaping human gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 62–63, 101828. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2023.101828>
- Robbiano, L., Martelli, A., Allavena, A., Mazze, M., Gazzaniga, G. M., Brambilla, G. (1991). Formation of the N-NitrosoDerivatives of Six β -Adrenergic-blocking Agents and Their Genotoxic Effects in Rat and Human Hepatocytes. *Cancer research* 51, 2273–2279.
- Robert, C., Chassard, C., Lawson, P. A., Bernalier-Donadille, A. (2007). *Bacteroides cellulosilyticus* sp. Nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1516–1520.
- Rowland, I. R., Grasso, P. (1975). Degradation of N -Nitrosamines by Intestinal Bacteria. *Applied Microbiology*, 29(1), 7–12.
- Sakanaka, M., Sugiyama, Y., Nara, M., Kitakata, A., & Kurihara, S. (2018). Functional analysis of arginine decarboxylase gene speA of *Bacteroides dorei* by markerless gene deletion. *FEMS Microbiology Letters*, 365(4). <https://doi.org/10.1093/femsle/fny003>
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989): Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor*, Vol. 2, S. 1.
- Saul, R. L., Kabir, S. H., Cohen, Z., Bruce, W. R., Archer, M. C. (1981). Reevaluation of Nitrate and Nitrite Levels in the Human Intestine. *Cancear research*, 41, 2280-2283
- Saxena, R. K., Saran, S., Isar, J., Kaushik, R. (2017). Production and Applications of Succinic Acid. In *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (S. 601–630). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00027-0>
- Schenk, G., Duggleby, R. G., Nixon, P. F. (1998). Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 30(12), 1297–1318.
- Schiller, C., Fröhlich, C. -P., Giessmann, T., Siegmund, W., Mönnikes, H., Hosten, N., Weitschies, W. (2005). Intestinal fluid volumes and transit of dosage forms as assessed by magnetic resonance imaging. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 22(10), 971–979.
- Schmidtsdorff, S., Neumann, J., Schmidt, A. H., Parr, M. K. (2022). Risk assessment for nitrosated pharmaceuticals: A future perspective in drug development. *Archiv Der Pharmazie*, 355(4), 2100435. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100435>
- Schütze, A., Benndorf, D., Püttker, S., Kohrs, F., Bettenbrock, K. (2020). The Impact of ackA, pta, and ackA-pta Mutations on Growth, Gene Expression and Protein Acetylation in

- Escherichia coli K-12. *Frontiers in Microbiology*, 11, 233. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00233>
- Schwalm, N. D., Groisman, E. A. (2017). Navigating the Gut Buffet: Control of Polysaccharide Utilization in *Bacteroides* spp. *Trends in Microbiology*, 25(12), 1005–1015.
- Schweizer, H. P. (1992). Alielic exchange in *Pseudomonas aeruginosa* using novel ColE1-type vectors and a family of cassettes containing a portable *oriT* and the counter-selectable *Bacillus subtilis* *sacB* marker. *Molecular Microbiology*, 6(9), 1195–1204.
- Schwitzguebel, J.-P., Ettlinger, L. (1979). Pyruvate, orthophosphate dikinase from *Acetobacter acetii*. *Archives of Microbiology*, 122(1), 103–108.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biology*, 14(8), e1002533. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002533>
- Shende, V. V., Bauman, K. D., Moore, B. S. (2024). The shikimate pathway: Gateway to metabolic diversity. *Natural Product Reports*, 41(4), 604–648.
- Shi, F., Li, K., Huan, X., Wang, X. (2013). Expression of NAD(H) Kinase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Improve NADPH Supply and l-isoleucine Biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum* ssp. *Lactofermentum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2), 504–521.
- Shoemaker, N. B., Barber, R. D., Salyers, A. A. (1989). Cloning and characterization of a *Bacteroides* conjugal tetracycline-erythromycin resistance element by using a shuttle cosmid vector. *Journal of Bacteriology*, 171(3), 1294–1302.
- Slavin, J. L., Brauer, P. M., Marlett, J. A. (1981). Neutral Detergent Fiber, Hemicellulose and Cellulose Digestibility in Human Subjects. *The Journal of Nutrition*, 111(2), 287–297.
- Smith, K. D., Achan, B., Hullsiek, K. H., McDonald, T. R., Okagaki, L. H., Alhadab, A. A., Akampurira, A., Rhein, J. R., Meya, D. B., Boulware, D. R., Nielsen, (2015). Increased Antifungal Drug Resistance in Clinical Isolates of *Cryptococcus neoformans* in Uganda. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(12), 7197–7204.
- Sonnenburg, E. D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S. K., Firkbank, S. J., Bolam, D. N., Sonnenburg, J. L. (2010). Specificity of Polysaccharide Use in Intestinal *Bacteroides* Species Determines Diet-Induced Microbiota Alterations. *Cell*, 141(7), 1241–1252.
- Stanton, R. C. (2012). Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life*, 64(5), 362–369.

- Steinmetz, M., Le Coq, dominique, Djemia, H. B., & Gaxy, P. (1983). Analyse génétique de sacB, gène de structure d'une enzyme sécrétée, la lévane-saccharase de *Bacillus subtilis* Marburg. *Molecular genetics and genomics* 191, 138–144.
- Stincon, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., 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*, 90(3), 927–963.
- Subramaniam, S., Kamath, S., Ariaee, A., Prestidge, C., Joyce, P. (2023). The impact of common pharmaceutical excipients on the gut microbiota. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 20(10), 1297–1314.
- Suzuki, K., Mitsuoka, T. (1984). N-nitrosamine formation by intestinal bacteria. *IARC Scientific Publications*, 57, 275–281.
- Taillefer, M., Rydzak, T., Levin, D. B., Oresnik, I. J., Sparling, R. (2015). Reassessment of the Transhydrogenase/Malate Shunt Pathway in *Clostridium thermocellum* ATCC 27405 through Kinetic Characterization of Malic Enzyme and Malate Dehydrogenase. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(7), 2423–2432.
- Tanaka, M., Nakayama, J. (2017). Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergy International*, 66(4), 515–522.
- Tangy, F., Moukkadem, M., Vindimian, E., Capmau, M., Le Goffic, F. (1985). Mechanism of action of gentamicin components: Characteristics of their binding to *Escherichia coli* ribosomes. *European Journal of Biochemistry*, 147(2), 381–386.
- Tejs, S. (2008). The Ames test: A methodological short review. *Environmental Biotechnology* 4(1), 7–14.
- Teleman, A., Tenkanen, M., Jacobs, A., Dahlman, O. (2002). Characterization of O-acetyl-(4-O-methylglucurono)xylan isolated from birch and beech. *Carbohydrate Research*, 337(4), 373–377.
- Ternes, D., Tsenkova, M., Pozdeev, V. I., Meyers, M., Koncina, E., Atatri, S., Schmitz, M., Karta, J., Schmoetten, M., Heinken, A., Rodriguez, F., Delbrouck, C., Gaigneaux, A., Ginolhac, A., Nguyen, T. T. D., Grandmougin, L., Frachet-Bour, A., Martin-Gallausiaux, C., Pacheco, M., ... Letellier, E. (2022). The gut microbial metabolite formate exacerbates colorectal cancer progression. *Nature Metabolism*, 4(4), 458–475.

- Terrapon, N., Lombard, V., Gilbert, H. J., & Henrissat, B. (2015). Automatic prediction of polysaccharide utilization loci in Bacteroidetes species. *Bioinformatics*, 31(5), 647-655.
- Thakker, C., Martínez, I., San, K., & Bennett, G. N. (2012). Succinate production in *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 7(2), 213–224. <https://doi.org/10.1002/biot.201100061>
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy Conservation in Chemotrophic Anaerobic Bacteria. *Bacteriological reviews* 41(1), 100-180.
- The Human Microbiome Project Consortium. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214.
- Thoma, F., Schulze, C., Gutierrez-Coto, C., Hädrich, M., Huber, J., Gunkel, C., Thoma, R., Blombach, B. (2022). Metabolic engineering of *Vibrio natriegens* for anaerobic succinate production. *Microbial Biotechnology*, 15(6), 1671–1684.
- Thomas, D. N., Wills, J. W., Tracey, H., Baldwin, S. J., Burman, M., Williams, A. N., Harte, D. S. G., Buckley, R. A., Lynch, A. M. (2024). Ames test study designs for nitrosamine mutagenicity testing: Qualitative and quantitative analysis of key assay parameters. *Mutagenesis*, 39(2), 78–95.
- Thomas, F., Hehemann, J.-H., Rebuffet, E., Cjzek, M., Michel, G. (2011). Environmental and Gut Bacteroidetes: The Food Connection. *Frontiers in Microbiology*, 2, 93. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00093>
- Tilg, H., Adolph, T. E., Gerner, R. R., Moschen, A. R. (2018). The Intestinal Microbiota in Colorectal Cancer. *Cancer Cell*, 33(6), 954–964.
- Tjaden, B., Plagens, A., Dörr, C., Siebers, B., Hensel, R. (2006). Phosphoenolpyruvate synthetase and pyruvate, phosphate dikinase of *Thermoproteus tenax*: Key pieces in the puzzle of archaeal carbohydrate metabolism. *Molecular Microbiology*, 60(2), 287–298.
- Tonouchi, N., Sugiyama, M., Yokozeki, K. (2003). Coenzyme Specificity of Enzymes in the Oxidative Pentose Phosphate Pathway of *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 67(12), 2648–2651.
- Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489(7415), 242–249.
- Tricker, A. R., Preussmann, R. (1991). Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: Occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 259(3–4), 277–289.

- Tuesuwan, B., Vongsutilers, V. (2021). Nitrosamine Contamination in Pharmaceuticals: Threat, Impact, and Control. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 110(9), 3118–3128.
- Van De Wiele, T., Van Den Abbeele, P., Ossieur, W., Possemiers, S., Marzorati, M. (2015). The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). *The Impact of Food Bioactives on Health* (S. 305–317). Springer International Publishing.
- Van Dongen, F. E. M., Van Eylen, D., Kabel, M. A. (2011). Characterization of substituents in xylans from corn cobs and stover. *Carbohydrate Polymers*, 86(2), 722–731.
- Varela-Gómez, M., Moreno-Sánchez, R., Pardo, J. P., Perez-Montfort, R. (2004). Kinetic Mechanism and Metabolic Role of Pyruvate Phosphate Dikinase from *Entamoeba histolytica*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), 54124–54130.
- Varghese, V. K., Poddar, B. J., Shah, M. P., Purohit, H. J., Khardenavis, A. A. (2022). A comprehensive review on current status and future perspectives of microbial volatile fatty acids production as platform chemicals. *Science of The Total Environment*, 815, 152500. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152500>
- Vega, N. M., Gore, J. (2014). Collective antibiotic resistance: Mechanisms and implications. *Current Opinion in Microbiology*, 21, 28–34.
- Vermeer, I. T. M., Engels, L. G. J. B., Pachén, D. M. F. A., Dallinga, J. W., Kleinjans, J. C. S., Van Maanen, J. M. S. (2001). Intragastric volatile N-nitrosamines, nitrite, pH, and *Helicobacter pylori* during long-term treatment with omeprazole. *Gastroenterology*, 121(3), 517–525.
- Vernocchi, P., Del Chierico, F., Putignani, L. (2020). Gut Microbiota Metabolism and Interaction with Food Components. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(10), 3688. <https://doi.org/10.3390/ijms21103688>
- Vich Vila, A., Collij, V., Sanna, S., Sinha, T., Imhann, F., Bourgonje, A. R., Mujagic, Z., Jonkers, D. M. A. E., Masclee, A. A. M., Fu, J., Kurilshikov, A., Wijmenga, C., Zhernakova, A., Weersma, R. K. (2020). Impact of commonly used drugs on the composition and metabolic function of the gut microbiota. *Nature Communications*, 11(1), 362. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-14177-z>
- Wang, D., Li, Q., Yang, M., Zhang, Y., Su, Z., Xing, J. (2011). Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with ptsG mutation. *Process Biochemistry*, 46(1), 365–371.
- Wang, J., Shoemaker, N. B., Wang, G.-R., & Salyers, A. A. (2000). Characterization of a *Bacteroides* Mobilizable Transposon, NBU2, Which Carries a Functional Lincomycin Resistance Gene. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3559–3571.

- Wang, W., Guo, Y., Yang, Q., Huang, Y., Zhu, C., Fan, J., & Pan, F. (2015). Characterization of the microbial community structure and nitrosamine-reducing isolates in drinking water biofilters. *Science of The Total Environment*, 521–522, 219–225.
- Wang, Y., Li, X., Milne, C. B., Janssen, H., Lin, W., Phan, G., Hu, H., Jin, Y.-S., Price, N. D., & Blaschek, H. P. (2013). Development of a Gene Knockout System Using Mobile Group II Introns (Targetron) and Genetic Disruption of Acid Production Pathways in *Clostridium beijerinckii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(19), 5853–5863.
- Weitzberg, E., Lundberg, J. O. (2013). Novel Aspects of Dietary Nitrate and Human Health. *Annual Review of Nutrition*, 33(1), 129–159.
- Werpy, T., Petersen, G. (2004). *Top Value Added Chemicals from Biomass: Volume I -- Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas* (No. DOE/GO-102004-1992). National Renewable Energy Lab (NREL), Golden, CO (United states) <https://doi.org/10.2172/15008859>
- Wexler, A. G., Goodman, A. L. (2017). An insider's perspective: Bacteroides as a window into the microbiome. *Nature Microbiology*, 2(5), 17026. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.26>
- Wienberg, F. (2023). Enzymatische Herstellung und Reinigung von Fructooligosacchariden des Inulin-Typs und deren Verwertung durch abundante Darmbakterien. *Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*
- Wilms, B., Hauck, A., Reuss, M., Sylatk, C., Mattes, R., Siemann, M., Altenbuchner, J. (2001). High-cell-density fermentation for production of L - N -carbamoylase using an expression system based on the *Escherichia coli rhaBAD* promoter. *Biotechnology and Bioengineering*, 73(2), 95–103.
- Wolf, P. G., Biswas, A., Morales, S. E., Greening, C., Gaskins, H. R. (2016). H₂ metabolism is widespread and diverse among human colonic microbes. *Gut Microbes*, 7(3), 235–245.
- Wood, T. (1986). Physiological functions of the pentose phosphate pathway. *Cell Biochemistry and Function*, 4(4), 241–247.
- Wright, A. J. (1999). The Penicillins. *Mayo Clinic Proceedings*, 74(3), 290–307.
- Wu, S. S., Kaiser, D. (1996). Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis sacB* gene. *Journal of Bacteriology*, 178(19), 5817–5821.
- Xiao, Y., Li, P., Zhou, Y., Ma, F., Chen, C. (2018). Effect of inoculating *Lactobacillus pentosus* R3 on N-nitrosamines and bacterial communities in dry fermented sausages. *Food Control*, 87, 126–134.

- Xie, S., Ma, J., Lu, Z. (2024). *Bacteroides thetaiotaomicron* enhances oxidative stress tolerance through rhamnose-dependent mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1505218. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1505218>
- Xu, H., Wu, Q., Xuan, Y., Tan, H., & Nie, S. (2024). Utilization of pectin with various degrees of esterification by *Bacteroides xylanisolvens*. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 32, 100426. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2024.100426>
- Xu, J., Bjursell, M. K., Himrod, J., Deng, S., Carmichael, L. K., Chiang, H. C., Hooper, L. V., Gordon, J. I. (2003). A Genomic View of the Human- *Bacteroides thetaiotaomicron* Symbiosis. *Science*, 299(5615), 2074–2076.
- Yamauchi, Y., Hirasawa, T., Nishii, M., Furusawa, C., Shimizu, H. (2014). Enhanced acetic acid and succinic acid production under microaerobic conditions by *Corynebacterium glutamicum* harboring *Escherichia coli* transhydrogenase gene *pntAB*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 60(3), 112–118.
- Yatsunenkov, T., Rey, F. E., Manary, M. J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M. G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Baldassano, R. N., Anokhin, A. P., Heath, A. C., Warner, B., Reeder, J., Kuczyński, J., Caporaso, J. G., Lozupone, C. A., Lauber, C., Clemente, J. C., Knights, D., Knight, R., Gordon, J. I. (2012). Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), 222–227.
- Zhang, B., Zhong, Y., Dong, D., Zheng, Z., Hu, J. (2022). Gut microbial utilization of xylan and its implication in gut homeostasis and metabolic response. *Carbohydrate Polymers*, 286, 119271. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119271>
- Zhang, M., Chekan, J. R., Dodd, D., Hong, P.-Y., Radlinski, L., Revindran, V., Nair, S. K., Mackie, R. I., Cann, I. (2014). Xylan utilization in human gut commensal bacteria is orchestrated by unique modular organization of polysaccharide-degrading enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(35) E3708-E3717. <https://doi.org/10.1073/pnas.1406156111>
- Zhang, W., Qu, W., Wang, H., Yan, H. (2021). Antidepressants fluoxetine and amitriptyline induce alterations in intestinal microbiota and gut microbiome function in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Translational Psychiatry*, 11(1), 131. <https://doi.org/10.1038/s41398-021-01254-5>
- Zhao, T., Yue, H., Peng, J., Nie, Y., Wu, L., Li, T., Niu, W., Li, C., Zhang, Z., Li, M., Ding, K. (2023). Degradation of xylan by human gut *Bacteroides xylanisolvens* XB1A. *Carbohydrate Polymers*, 315, 121005. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121005>
- Zhou, J., Olson, D. G., Lanahan, A. A., Tian, L., Murphy, S. J.-L., Lo, J., Lynd, L. R. (2015). Physiological roles of pyruvate ferredoxin oxidoreductase and pyruvate formate-lyase

- in *Thermoanaerobacterium saccharolyticum* JW/SL-YS485. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 138. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0304-1>
- Zhu, B., Wang, X., Li, L. (2010). Human gut microbiome: The second genome of human body. *Protein & Cell*, 1(8), 718–725. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0093-z>
- Zhu, L., Zhang, J., Yang, J., Jiang, Y., Yang, S. (2022). Strategies for optimizing acetyl-CoA formation from glucose in bacteria. *Trends in Biotechnology*, 40(2), 149–165.
- Zhu, S., Cai, D., Liu, Z., Zhang, B., Li, J., Chen, S., Ma, X. (2019). Enhancement of Bacitracin Production by NADPH Generation via Overexpressing Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Zwf in *Bacillus licheniformis*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(4), 1502–1514.
- Zhu, X., Tan, Z., Xu, H., Chen, J., Tang, J., Zhang, X. (2014). Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*. *Metabolic Engineering*, 24, 87–96.
- Zimmermann, K., Lengerken, J. V. (1979). Zur Nitrat- und Nitritanalytik in Futtermitteln 1. Mitt. Spektrophotometrische Bestimmung von Nitrat mit o-Kresol. *Food / Nahrung*, 23(2), 151–157.
- Zimmermann, M., Patil, K. R., Typas, A., Maier, L. (2021). Towards a mechanistic understanding of reciprocal drug–microbiome interactions. *Molecular Systems Biology*, 17(3), e10116. <https://doi.org/10.15252/msb.202010116>
- Zimmermann, M., Zimmermann-Kogadeeva, M., Wegmann, R., Goodman, A. L. (2019). Mapping human microbiome drug metabolism by gut bacteria and their genes. *Nature*, 570(7762), 462–467.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich gerne bei den Personen bedanken, die die Fertigstellung meiner Dissertation ermöglicht und mich auf dem Weg dahin unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Ich bedanke mich für Ihre Ratschläge und Lösungsansätzen in dem spannenden, aber auch herausfordernden Thema meiner Doktorarbeit. Die intensiven Diskussionen mit Ihnen haben maßgeblich zur Entwicklung meiner wissenschaftlichen Fähigkeiten sowie zur Erweiterung einer kritischen Denkweise beigetragen.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD Dr. Christiane Dahl für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken. Auch für ihre Unterstützung gegenüber Studierenden und Promovierenden in jeglicher Fragestellung möchte ich mich bedanken.

Ich bedanke mich ebenfalls bei Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger, die sich bereit erklärt haben, als fachnahes und fachfremdes Mitglied meiner Prüfungskommission beizuwohnen.

Zusätzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Erwin Galinski bedanken. Ihre Begeisterung für die kleinsten Lebewesen der Erde war in BP09 so ansteckend, dass ich mich bereits hier für den Weg der Mikrobiologie entschieden habe.

Ein besonderer Dank geht an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Deppenmeier. Danke an Rebecca, Franzi, André, Marcel, Paulina, Natalie H., Jan, Natalie T-S, und nicht zu vergessen (wenn auch nicht direkt aus AG Deppenmeier) Marc. Auch wenn mal nicht alles so glatt lief, mit euch hatte man immer was zu lachen. Egal ob im Labor, die Mittagspausen oder die Spieleabende, ich werde die gemeinsame Zeit mit euch nicht vergessen. Ein extra Dankeschön geht an dieser Stelle an André, du hattest stets ein offenes Ohr und keine meiner Fragen war dir zu viel. Für mich warst du wissenschaftlich und freundschaftlich eine große Unterstützung.

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

Ein Dank gilt auch den Freunden, die ich in meiner Zeit in Bonn gefunden habe und die mir zwischendurch geholfen haben den Kopf freizubekommen. Besonders geht hier ein Dank an Caroline: Mit dir zusammen habe ich überhaupt die Begeisterung für die Mikrobiologie entdeckt und die Lernphasen in der "Bib" bis hin zur Masterarbeit gemeistert.

Zum Schluss möchte ich mich bei den wichtigsten Menschen in meinem Leben bedanken: Bei Claude, meiner Mutter und meinem Bruder. Ihr habt immer an mich geglaubt. Eure Liebe, Verständnis und Unterstützung sind das wertvollste, nicht nur in dieser intensiven Zeit.

Dofir soen ech iech MERCI!