

**Aufklärung des zentralen Kohlenstoff- und  
Energiemetabolismus des Darmbakteriums  
*Prevotella copri***

**Dissertation**

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Vorgelegt von

**Thomas Franke**

aus Essen

Bonn, 2020

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

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Uwe Deppenmeier  
**2. Gutachterin:** PD Dr. Christiane Dahl  
**Tag der Promotion:** 08.05.2020  
**Erscheinungsjahr:** 2020

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht.**

**Franke, T., Deppenmeier, U. (2018):** Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular microbiology*, 109: 528–540, doi: 10.1111/mmi.14058.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Einheitenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Verdauungstrakts .....	1
1.2 Die Intestinalmikrobiota des menschlichen Dickdarms .....	2
1.3 Die SCFAs der Intestinalmikrobiota.....	3
1.4 <i>Prevotella copri</i> , ein Hauptakteur des menschlichen Darms .....	4
<b>2 Zielsetzung der Arbeit</b> .....	<b>6</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>7</b>
3.1 Chemikalien, Organismen und andere Materialien .....	7
3.1.1 Chemikalien .....	7
3.1.2 Gase .....	7
3.1.3 Enzyme .....	7
3.1.4 Antibiotika .....	8
3.1.5 Organismen.....	8
3.1.6 Oligonukleotide (Primer) .....	8
3.1.7 Software und Datenbanken .....	10
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	11
3.2.1 Anzucht von <i>P. copri</i> in Serumflaschen .....	11
3.2.2 Anzucht von <i>P. copri</i> im anaeroben Kleinfermenter .....	13
3.2.3 Präparation von ruhenden Zellen zur ATP-Bestimmung .....	15
3.2.4 Anzucht von <i>B. vulgatus</i> und <i>P. johnsonii</i> .....	16
3.2.5 Stammerhaltung der verwendeten Organismen .....	16
3.2.6 Bestimmung der optischen Dichte von anaeroben Bakterienkulturen .....	16
3.2.7 Bestimmung der Zelltrockenmasse von bakteriellen Kulturen .....	17
3.2.8 Bestimmung von Wachstumsparametern .....	17

3.3	Molekularbiologische Methoden.....	18
3.3.1	RNA-Isolierung .....	18
3.3.2	Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen.....	18
3.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	19
3.3.4	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA.....	20
3.3.5	Weiterführende Qualitätskontrolle isolierter RNA.....	21
3.3.6	Quantitative RT-PCR (RT-qPCR).....	22
3.3.7	Transkriptomsequenzierung .....	23
3.3.8	Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen.....	24
3.3.9	Aktivitätsbestimmung cytoplasmatischer Enzyme und Transmembran-komplexen in Cytoplasma- und Membranfraktionen von <i>P. copri</i> .....	25
3.3.10	ATP-Bestimmung von ruhenden Zellen .....	28
3.4	Biochemische Methoden.....	29
3.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen .....	29
3.4.2	Carbonatbestimmung von menschlichen Feces.....	29
3.4.3	Glycogenbestimmung.....	30
3.4.4	Elementaranalyse von gefriergetrockneten <i>P. copri</i> -Zellen .....	30
3.4.5	Analyse von Kulturüberständen mittels HPLC .....	31
3.4.6	Ausfällung von Bernsteinsäure mittels $\text{Ca}(\text{OH})_2$ unter Anwesenheit von Medienbestandteilen .....	31
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
4.1	Wachstumsparameter von <i>P. copri</i> .....	33
4.1.1	Wachstum auf Komplex- und Minimalmedium.....	33
4.2	Der zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus von <i>P. copri</i> .....	37
4.2.1	Bioinformatische Analyse des Zentralstoffwechsels von <i>P. copri</i> .....	37
4.2.2	Transkriptionsanalysen zum Zentralstoffwechsel von <i>P. copri</i> .....	41
4.2.3	Untersuchungen zu Enzymaktivitäten des Zentralstoffwechsels von <i>P. copri</i> in Cytoplasma- und Membranfraktionen .....	51
4.2.4	$\text{H}^+/\text{Na}^+$ -abhängige ATP-Produktion in ruhenden Zellen von <i>P. copri</i> .....	52

4.2.5	Bestimmung von Speicherstoffen und Elementaranalyse .....	56
4.2.6	Kohlenstoffbilanz, Redoxbilanz und Rekonstruktion des Zentralmetabolismus von <i>P. copri</i> .....	58
4.3	Der zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus von <i>B. vulgatus</i> & <i>P. johnsonii</i> ....	65
4.3.1	Bioinformatische Analyse des Zentralstoffwechsels von <i>B. vulgatus</i> und <i>P. johnsonii</i> .....	65
4.3.2	Kohlenstoff-, Redoxbilanz und Rekonstruktion des Zentralmetabolismus von <i>B. vulgatus</i> und <i>P. johnsonii</i> .....	73
4.4	Biotechnologische Produktion von Succinat mit <i>P. copri</i> .....	81
4.4.1	Produktion von Succinat mit <i>P. copri</i> in anaeroben Serumflaschen .....	82
4.4.2	Produktion von Succinat mit <i>P. copri</i> im anaeroben Kleinfermenter .....	86
4.4.3	Löslichkeitsverhalten von Calciumsuccinat in Anwesenheit von Medienbestandteilen .....	90
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>94</b>
5.1	Die Wachstumsparameter von <i>P. copri</i> und CO <sub>2</sub> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> als Modulator der menschlichen Darmflora.....	95
5.2	Der zentrale Energie- und Kohlenstoffmetabolismus von <i>P. copri</i> .....	101
5.3	Der cytoplasmatische Zentralstoffwechsel von <i>P. copri</i> .....	101
5.4	Die Atmungskette von <i>P. copri</i> .....	106
5.5	Kohlenstoff- und Redoxbilanzen im zentralen Energie- und Kohlenstoffmetabolismus von <i>P. copri</i> .....	114
5.6	Der Zentralstoffwechsel der wichtigen Darmorganismen <i>B. vulgatus</i> und <i>P. johnsonii</i> .....	123
5.7	Biotechnologische Succinatproduktion mit Hilfe des Darmbakteriums <i>P. copri</i> .....	127
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>139</b>
	<b>Danksagung</b> .....	<b>VIII</b>
	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>X</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
[H]	Reduktionsäquivalent
[O]	Sauerstoffäquivalente
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
API	<i>Analytic Profile Index</i>
ATP	Adenosintriphosphat
A <sub>xxx</sub>	Absorption bei einer Wellenlänge von xxx nm
cDNA	in DNA transkribierte RNA
CoA	Coenzym A
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	<i>double stranded DNA</i>
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
e <sup>-</sup>	Elektron
EMP-Weg	Embden-Meyerhoff-Parnas-Weg
<i>et al.</i>	<i>et aliae/alii</i>
EtOH	Ethanol
Fd <sub>ox</sub>	oxidiertes Ferredoxin
Fd <sub>red</sub>	reduziertes Ferredoxin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
Gl.	Gleichung
GVO	Gentechnisch veränderter Organismus
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	Destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	Reinstwasser
KDPG	2-Keto-3-desoxy-6-phosphogluconat
KPP	Kaliumphosphat-Puffer
Lsg.	Lösung
MeOH	Methanol
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NDHI	H <sup>+</sup> -translozierende NADH:Chinol-Dehydrogenase I
Nqr	Na <sup>+</sup> -translozierende NADH:Chinol-Reduktase
OAA	Oxalacetic acid/Oxalacetat

## Abkürzungsverzeichnis

OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 nm
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase
PPi	Pyrophosphat
PPP	<i>pentose phosphate pathway</i> ; Pentosephosphatweg
PYG	<i>Peptone Yeast Glucose</i>
qRT-PCR	qualitative <u>R</u> everse- <u>T</u> ranscriptase- <u>P</u> olymerase <u>k</u> etten <u>r</u> eaktion
RA	<u>R</u> heumatoide <u>A</u> rthritis
Rnf	Ferredoxin:NAD <sup>+</sup> -Oxidoreduktase
RPC	<i>resting P. copri cells</i>
rRNA	ribosomale RNA
SCFAs	<i>Short-chain fatty acids</i> ; Kurzkettige Fettsäuren
spp.	<i>species pluralis</i>
sRNA	<i>small RNA</i>
ssRNA	<i>single stranded RNA</i>
Tab.	Tabelle
TG	Zelltrockenmasse
ü.N.	über Nacht
ÜS	Überstand
WT	Wildtyp
$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$	elektrochemischer Protonengradient
$\Delta\bar{\mu}_{Na^+}$	elektrochemischer Natriumionengradient

---



# Einheitenverzeichnis

Einheit	Einheitszeichen
$\%_{(v/v)}$	Volumenprozent
$\%_{(w/v)}$	Gewichtsprozent
$\%_{(w/w)}$	Gewichtsprozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{mol}$	Mikromol
A	Ampere
Bp	Basenpaare
cm	Centimeter
$F$	Farraday-Konstante $\sim 96.500$ [As mol <sup>-1</sup> ]
FU	<i>Fluorescence units</i>
g	Gramm
$g$	Gravitationskonstante $6,67 \cdot 10^{-11}$ [m <sup>3</sup> /kg s <sup>2</sup> ]
h	Stunde
J	Joule
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kJ	Kilojoule
kP	Kilopascal
l	Liter
M	[mol l <sup>-1</sup> ]
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
nm	Nanometer

## Einheitenverzeichnis

<i>R</i>	allgemeine Gaskonstante 8,314 [J mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> ]
RPKM	<i>reads per kilobase per million mapped reads</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
s	Sekunden
U	Units [μmol min <sup>-1</sup> ]
V	Volt

---

# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau und Funktion des menschlichen Verdauungstrakts

Der menschliche Verdauungstrakt besteht in seiner vereinfachten Form aus vier Organen mit sehr unterschiedlichen aber voneinander abhängenden Funktionen (Boland, 2016). Die erste Station bildet dabei die Mundhöhle, in der die Nahrung zerkleinert, eingespeichelt und enzymatisch vorverdaut wird. Der vorprozessierte Nahrungsbrei, der auch als Bolus bezeichnet wird, wandert nun zur zweiten Station, dem Magen. Hier beginnt im Magensaft mit einem pH-Wert von 0,9 bis 2 die chemische und enzymatische Hydrolyse von einfachen Polysacchariden und Proteinen. Gleichzeitig wird der Nahrungsbrei durch Muskelbewegungen des Magens durchmischt und ein letztes Mal mechanisch zerkleinert, bis Nahrungspartikel mit einer Größe von etwa 1-2 mm in den Dünndarm übergeben werden (Kong and Singh, 2008; Boland, 2016). Die nun semifluide Nahrungsmasse, auch Chymus genannt, wird zunächst vom Zwölffingerdarm neutralisiert. Anschließend werden die Nahrungspartikel im Jejunum und Ileum mit Hilfe körpereigener Enzyme und Gallensalz-haltiger Fluide weitestgehend in ihre Bestandteile zersetzt (Goodman, 2010; Boland, 2016). Die zusätzlich vorhandene große Oberfläche des Dünndarms sorgt schließlich dafür, dass die freigesetzten Nährstoffe vom Körper aufgenommen und verwertet werden können. Die übrigbleibenden Ballaststoffe, wie z.B. Xylane, resistente Stärke oder Pectine, werden zuletzt in den Dickdarm transportiert, in dem aus humanphysiologischer Sicht nur noch die Resorption des im Chymus enthaltenen Wassers und die Regulation des Elektrolythaushalts stattfindet (Sandle, 1998; Chang and Leung, 2014). Betrachtet man jedoch die mikrobielle Zelldichte innerhalb der vier Verdauungskompartimente, wird klar, dass der Dickdarm nicht nur eine weitere zentrale Verdauungsfunktion besitzt, sondern auch eine übergeordnete Rolle in der menschlichen Physiologie abseits einfacher Verdauungsprozesse spielt (Walsh *et al.*, 2014; Flint *et al.*, 2015).

Während aufgrund des pH-Werts, Gallensalzen und Sekreten des Pankreas nur geringe Mengen an Mikroorganismen im Magen und proximalen Teil des Dünndarms zu finden sind (etwa  $10^3 - 10^4$  Zellen  $ml^{-1}$ ), steigt die Zellzahl von Prokaryoten im distalen Dünndarm und Dickdarm rapide an (O'Hara and Shanahan, 2006; Sender *et al.*, 2016). Mit  $10^{11} - 10^{12}$  Zellen  $ml^{-1}$  stellt dabei der Colon eines der mit Fremdzellen am dichtesten besiedelten Oberflächen im Körper von Säugetieren dar und fungiert somit als spezialisiertes Fermentationsorgan für die Kultivierung von anaeroben Mikroorganismen (Sender *et al.*, 2016; O'Hara and Shanahan, 2006). Hierbei ernähren sich die Mikroben von den für ihren Wirt ansonsten unverdaulichen Ballaststoffen, die durch ein Netzwerk speziesübergreifender Enzymkaskaden schrittweise hydrolysiert und somit verfügbar gemacht werden (Flint *et al.*, 2008; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2014). Gärungs- und

Fermentationsprozesse hinterlassen aus den erzeugten Monosacchariden schließlich kurzkettige Fettsäuren (SCFAs), die in das Darmlumen abgegeben und von den Colonocyten des Wirts aufgenommen werden (Fischbach and Sonnenburg, 2011; Tremaroli and Bäckhed, 2012; den Besten *et al.*, 2013). Die Verstoffwechslung der SCFAs deckt hierbei einen beachtlichen Anteil von 5-10 % des täglichen Energiebedarf eines Menschen ab (McNeil, 1984). Insgesamt gehen die Mikroorganismen beim Abbau von Ballaststoffen zu SCFAs derart effektiv vor, dass das Ausscheidungsprodukt der menschlichen Verdauung (Feces) nur noch aus etwa 10 %<sub>(w/w)</sub> Nahrungsresten in Form von unverdauten Kohlenhydraten, sonstigen stickstofffreien Pflanzenmaterialien und Lipiden besteht. Weitere 15 %<sub>(w/w)</sub> setzen sich aus mikrobieller Zellmasse zusammen, der Rest ist Wasser und anorganische Verbindungen (O'Hara and Shanahan, 2006; Rose *et al.*, 2015).

### 1.2 Die Intestinalmikrobiota des menschlichen Dickdarms

Betrachtet man nicht nur die schiere Masse an Mikroorganismen, sondern auch deren taxonomische Verteilung, stellt man fest, dass die menschliche Darmmikrobiota aus über 1000 verschiedenen Spezies bestehen kann, welche wiederum hauptsächlich aus den Phyla Firmicutes, Bacteroidetes und Actinobacteria stammen (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Lloyd-Price *et al.*, 2016). Die potenzielle Biodiversität dieses Habitats wird allerdings von manchen Wissenschaftlern sogar auf einen noch höheren Wert geschätzt (Frank and Pace, 2008). Insgesamt enthält der Colon eines gesunden Menschen etwa 500 dieser Spezies gleichzeitig, wodurch das Darmmikrobiom fast 2 Millionen Gene enthält, die nicht-menschlichen Ursprungs sind (Quigley, 2013; Lloyd-Price *et al.*, 2016). Nach neuesten Schätzungen entspricht diese Zahl etwa 100 mal mehr codierenden DNA Bereichen als im menschlichen Genom enthalten sind (Quigley, 2013; Lloyd-Price *et al.*, 2016; Perteza *et al.*, 2018).

Die Auswirkungen dieses riesigen Reservoirs an genetischem Material und dem damit verbundenen metabolischen Repertoire der Darmorganismen sind dabei beachtlich. So gibt es eine Vielzahl von Korrelationen zwischen der spezifischen Zusammensetzung der Darmflora und unterschiedlichen Gesundheitszuständen des Menschen, die von der Regulation der Glucose-Homöostase und des Immunsystems bis hin zu psychischen Erkrankungen wie Schizophrenie und Depression reichen (Woting and Blaut, 2016; Wu *et al.*, 2015; Sommer and Bäckhed, 2013; Foster and McVey Neufeld, 2013; Cryan and Dinan, 2012). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch weitestgehend unverstanden, da die Kommunikation zwischen der Mikrobiota und ihrem Wirt ein hochkomplexes und interspezifisches System darstellt, das auch noch auf unterschiedlichen Signalwegen verläuft (Sommer and Bäckhed, 2013; Carabotti *et al.*, 2015; Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016). Es wurde jedoch

nachgewiesen, dass unter anderem die SCFAs, die bei der Verstoffwechslung von Polysacchariden entstehen, nicht nur von den Colonocyten aufgenommen und verstoffwechselt, sondern auch in das Blut abgegeben werden, worüber sie alle Organe des menschlichen Körpers erreichen und dort verschiedene Signalkaskaden auslösen können (Corrêa-Oliveira *et al.*, 2016; Dorrestein *et al.*, 2014; Schauber *et al.*, 2003; Flint *et al.*, 2015). Dies schließt auch das Gehirn mit ein, da SCFAs und bestimmte andere Signalmoleküle aus dem Darm die Blut-Hirn-Schranke passieren können (Vadder and Mithieux, 2018). Hier spricht man von der *gut-brain axis* (Carabotti *et al.*, 2015).

### 1.3 Die SCFAs der Intestinalmikrobiota

Die wichtigsten SCFAs, die durch mikrobielle Fermentation von Ballaststoffen im Colon akkumulieren, sind Acetat, Butyrat und Propionat (Fischbach and Sonnenburg, 2011; Morrison and Preston, 2016). Auch Succinat und Lactat, welche als Vorstufen von SCFAs ebenfalls produziert werden, sind unter bestimmten Bedingungen in größeren Mengen als Endprodukte im Darmlumen vorzufinden (Vadder and Mithieux, 2018; Vadder *et al.*, 2016; Macfarlane and Macfarlane, 2003; Koh *et al.*, 2016). Gleiches gilt für Formiat, das aber eher eine untergeordnete Rolle spielt, da es in der Regel von hydrogenotrophen Methanogenen und acetogenen Mikroorganismen, die ebenfalls Teil der Darmflora sind, weitestgehend abgebaut wird (Vanderhaeghen *et al.*, 2015; Morrison and Preston, 2016; Ríos-Covián *et al.*, 2016). Die Akkumulation von Formiat im Lumen des Colons scheint daher nur bei inflammatorischen Prozessen aufzutreten, die zu einer Dysbiose der Darmmikrobiota führen (Bereswill *et al.*, 2011; Morrison and Preston, 2016).

Während Stoffwechselwege zur Produktion von Acetat innerhalb verschiedener taxonomischer Ordnungen ubiquitär verbreitet sind, finden sich die Stoffwechselwege für Propionat und Butyrat hauptsächlich in spezifischen Ordnungen innerhalb des Darmmikrobioms (Morrison and Preston, 2016). Dies führt zu dem, dass Acetat erwartungsgemäß die häufigste SCFA innerhalb des Colons darstellt, und zum anderen, dass die immense Biodiversität des menschlichen Gastrointestinaltrakts zumindest in funktionelle Einheiten vereinfacht werden kann (Koh *et al.*, 2016; Louis *et al.*, 2007). Hierbei kristallisieren sich einige Schlüsselgattungen heraus, die den prozentualen Hauptteil der Darmflora ausmachen oder zentrale Rollen in ihr übernehmen (Flint *et al.*, 2015; Louis *et al.*, 2007). So sind z.B. vor allem Spezies der Bacteroidetes (z.B. *Bacteroides* oder *Prevotella*) und Negativicutes (z.B. *Veillonella* oder *Dialister*) für die Produktion von Propionat über den Succinat-Stoffwechselweg verantwortlich, während Butyrat ausschließlich von Gattungen innerhalb der Clostridia, wie *Roseburia*,

*Eubacterium* und *Coprococcus* produziert wird (Flint *et al.*, 2015; Ríos-Covián *et al.*, 2016; Reichardt *et al.*, 2014).

Die generelle Biodiversität des Darmmikrobioms sowie die Häufigkeit einzelner Vertreter dieser mikrobiellen Gruppen sind dabei in (gesunden) Individuen sehr variabel und schwanken z.B. aufgrund von Alter, Lebensstil, Ernährung, Medikamenteneinnahme und genetischen Faktoren (David *et al.*, 2014b; Bäckhed *et al.*, 2015). Interessanterweise existieren hierbei bestimmte Verteilungsmuster, die durch metagenomische Analysen identifiziert wurden und spezifische Zustände des Darmmikrobioms beschreiben, welche als Enterotypen bezeichnet werden (Arumugam *et al.*, 2011). Diese Enterotypen werden dabei nach der jeweiligen Habitatdominierenden Spezies benannt, bei der es sich entweder um *Bacteroides* spp., *Ruminococcus* spp. oder *Prevotella* (*P.*) *copri* handelt (Arumugam *et al.*, 2011). Auch wenn das Konzept distinkter Enterotypen in den letzten Jahren vermehrt hinterfragt und debattiert wurde, zeigt sich weiterhin uneingeschränkt, dass die (gesunde) Darmflora in der Regel von Spezies aus einer der drei folgenden Gruppen dominiert wird: *Bacteroides*, *Prevotella* oder Gram-positiven Butyratproduzenten (Gorvitovskaia *et al.*, 2016; Jeffery *et al.*, 2012; Knights *et al.*, 2014). Bemerkenswerterweise haben die beiden Gattungen *Bacteroides* und *Prevotella* in der Darmmikrobiota des Menschen ein antagonistisches Verhältnis zueinander, sodass *Bacteroides* spp. in einer *Prevotella*-dominierten Mikrobiota nur in geringen Mengen auftritt und umgekehrt (Arumugam *et al.*, 2011; Gorvitovskaia *et al.*, 2016). Die greifenden Mechanismen hinter diesem mutualistischen Antagonismus sind noch weitestgehend unverstanden, obschon es bereits verschiedene Assoziationen der Gattungen mit bestimmten Krankheiten und Ernährungsweisen gibt (Gorvitovskaia *et al.*, 2016; Johnson *et al.*, 2017; Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015). So wird eine *Bacteroides*-dominierte Darmflora vor allem mit einer protein- und fettreichen, westlichen Diät in Verbindung gebracht, während die (wenn auch etwas seltener gefundene) Prädominanz von *Prevotella* hauptsächlich bei einer pflanzenreicheren Ernährung auftritt (Johnson *et al.*, 2017; Ley, 2016; Arumugam *et al.*, 2011).

#### 1.4 *Prevotella copri*, ein Hauptakteur des menschlichen Darms

Der Genus *Prevotella* besteht aus Gram-negativen, obligat anaeroben und unbeweglichen Stäbchen innerhalb der Abteilung Bacteroidetes (Hayashi *et al.*, 2007). Human-assoziierte Vertreter der Gattung besiedeln vornehmlich die Mundhöhle, wo sie als Teil der kommensalen Flora aber auch als klinisch relevante Pathogene bei parodontalen Infektionen auftreten (Szafranski *et al.*, 2015). Ebenso wird der Gastrointestinaltrakt des Menschen von fünf derzeit bekannten *Prevotella* spp. kolonisiert, von denen jedoch *P. copri* mit Abstand die häufigste und relevanteste Art darstellt (Hayashi *et al.*, 2007; Human Microbiome Project Consortium, 2012;

Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015; Ley, 2016; Guilhot *et al.*, 2017; Efimov *et al.*, 2018). Besonders deutlich wird diese Tatsache durch Metagenomanalysen, die zeigen konnten, dass die Mikrobiota von einigen gesunden Probanden bis zu 80 % *P. copri* enthält, was einer intestinalen Fermentation entspricht, die fast ausschließlich von nur einem Organismus durchgeführt wird (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Die Auswirkungen auf den Menschen sind dabei noch völlig ungeklärt, da das vermehrte Auftreten von *P. copri* mit sehr unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Effekten in Verbindung steht. So korreliert eine erhöhte Abundanz von *P. copri* mit der Reduktion von *Bacteroides* spp. und anderen für den Wirt vorteilhaften Organismen (Arumugam *et al.*, 2011; Scher *et al.*, 2013). Zudem steht *P. copri* im Verdacht, die Manifestierung der Autoimmunerkrankung rheumatoide Arthritis (RA) zu begünstigen (Scher *et al.*, 2013; Pianta *et al.*, 2017). Gleichzeitig korreliert *P. copri* aber auch mit einer positiven Blutzuckerregulation und invers mit Autismus (Kovatcheva-Datchary *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2013). Da der Organismus außerdem vor allem bei einer positiv bewerteten, ballaststoffreichen und primär pflanzlichen Ernährungsweise die Darmflora dominiert, und daher im Besonderen mit Vegetarismus und indigenen Völkern in Verbindung gebracht wird, ist die Einstufung von *P. copri* als Pathobiont weiterhin ein kontrovers diskutiertes Thema (Ley, 2016; Yatsunenko *et al.*, 2012).

Während die Relevanz von *P. copri* eine unbestreitbare Rolle in der aktuellen Forschung der gastrointestinalen Mikrobiota spielt, ist abseits metagenomischer Studien bis dato nur relativ wenig über das Bakterium selbst bekannt. Die meisten verfügbaren Informationen stammen aus *Analytic Profile Index* (API) Tests und wenigen Wachstumsexperimenten (Hayashi *et al.*, 2007). Zusätzlich ist das Genom in *contigs* sequenziert und mit vorwiegend automatischen Annotationen versehen (NCBI BioProject Accession: PRJNA30025). *P. copri* ist hiernach in der Lage eine große Anzahl verschiedener Zucker, aber kaum Aminosäuren und Peptide aufzunehmen und zu verstoffwechseln, wobei hauptsächlich Succinat und Acetat als fermentative Endprodukte entstehen (Hayashi *et al.*, 2007). Außerdem besitzt der Organismus ein großes Repertoire an Enzymen zur Verstoffwechslung verschiedener Polysaccharide, was ihn vergleichbar mit *Prevotella* spp. aus dem Pansen von Wiederkäuern oder darmbewohnenden *Bacteroides* spp. macht.

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Um die Prädominanz von *P. copri* innerhalb der menschlichen Darmflora besser einordnen zu können, sowie die bisher verfügbaren Daten mit biochemischen Ergebnissen abzugleichen und zu erweitern, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit der zentrale Energie- und Kohlenstoffmetabolismus des Organismus detailliert untersucht werden. Hierfür sollten zunächst die grundlegenden Wachstumseigenschaften von *P. copri* bestimmt und ein bioinformatisches Stoffwechselmodell erstellt werden. Anschließend sollte das Modell mit Hilfe von Transkriptomanalysen, Enzym-Assays und Fermentationsversuchen verifiziert und analysiert werden. Zum Vergleich sollte eine Rekonstruktion des Zentralstoffwechsels auch bei weiteren Vertretern dominanter Darmspezies durchgeführt werden. Schlussendlich sollte außerdem überprüft werden, ob sich *P. copri* für die biotechnologische Produktion der Plattformchemikalie Succinat einsetzen lässt.



## 3 Material und Methoden

### 3.1 Chemikalien, Organismen und andere Materialien

#### 3.1.1 Chemikalien

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

#### 3.1.2 Gase

Gase wurden im technischen Reinheitsgrad von der Firma Air Liquide (Düsseldorf, Deutschland) bezogen. Verwendet wurden N<sub>2</sub> (99,9 %) und CO<sub>2</sub> (99,9 %), die zum Teil auch über eine Gasmischanlage in einem Mischungsverhältnis von 80:20 verwendet wurden.

#### 3.1.3 Enzyme

Die in der vorliegenden Arbeit genutzten Enzyme sind inklusive Bezugsquelle in **Tab. 1** aufgelistet.

**Tab. 1:** Enzyme, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Enzymbezeichnung	Hersteller
Aldolase (aus Kaninchen-Muskulatur)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
DNase I	Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
OneTaq®-DNA-Polymerase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Glühwürmchen Laternen Extrakt (Luciferase)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (aus Kaninchen-Muskulatur)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Phosphoglyceratkinase (aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
α-Glycerophosphat-Dehydrogenase (aus Kaninchen-Muskulatur)	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)

### 3.1.4 Antibiotika

Zur Erhaltung von Reinkulturen wurden Antibiotika eingesetzt, die im Folgenden unter Angabe der verwendeten Endkonzentration aufgelistet sind (Tab. 2).

Tab. 2: Eingesetzte Antibiotika mit Angabe des verwendeten Lösungsmittels und der Endkonzentration.

Antibiotikum	Lösungsmittel	Endkonzentration
Tetrazyklin	70 % <sub>(v/v)</sub> EtOH	10 µg ml <sup>-1</sup>
Kanamycin	H <sub>2</sub> O	50 µg ml <sup>-1</sup>

### 3.1.5 Organismen

In dieser Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Organismen verwendet (Tab. 3), die allesamt von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen wurden.

Tab. 3: Verwendete Organismen mit Angabe von Genotyp und Referenz. Alle Stämme wurden von der DSMZ (Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Organismus	Genotyp	Referenz
<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	Wildtyp	Hayashi <i>et al.</i> , 2007
<i>Bacteroides vulgatus</i> DSM 1447	Wildtyp	Eggerth and Gagnon, 1933; Hahnke <i>et al.</i> , 2016
<i>Parabacteroides johnsonii</i> DSM 18315	Wildtyp	Sakamoto <i>et al.</i> , 2007; Hahnke <i>et al.</i> , 2016

### 3.1.6 Oligonukleotide (Primer)

Zur Amplifikation verschiedener Genfragmente wurden die in Tab. 4 aufgelisteten Oligonukleotide (Primer) benutzt. Die Sequenzen wurden händisch oder mit Hilfe des Programms Primer 3 (primer3.ut.ee) entworfen. Letztere Methode wurde vor allem zur Herstellung von Primern für die quantitative RT-PCR (RT-qPCR) verwendet, um Primer-Paare mit möglichst gleichen Schmelztemperaturen und Amplifikate von möglichst gleichen Längen zu erhalten (siehe weiterführend Kapitel 3.3.6). Synthetisiert wurden die Oligonukleotide durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

Tab. 4: Übersicht über die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide.

Bezeichnung	Sequenz [5'→3']	Matrix	Anmerkung
Pco_16S2_fw	CGTGTTGTGAAATGTAGACG	16S-rRNA-Gen von <i>P. copri</i> (PREVCOP_05466)	erstellt von Deppenmeier, U. (2015; unveröffentlicht)
Pco_16S2_rev	TGTTTCAGACCAACAGCGGGCAT		

Bac_16S2_fw	TCAGYTGTGAAAGTTTGSGG	16S-rRNA-Gen von <i>Bacteroides</i> spp.	erstellt von Deppenmeier, U. (2015; unveröffentlicht)
Bac_16S2_rev	GTRTATCGCMAACAGCGAGTAT		
RTqPC03558_fw	GTTGAGGCTGAGAACGCAAA	GAPDH-Gen von <i>P. copri</i> (PREVCOP_03558)	für RT-qPCR
RTqPC03558_rev	GCTCAGCAGTAACACGGATG		
RTqPC06002_fw	CGTTGACAAAGACGGCTCAA	Gen des ribosomalen Proteins L21 von <i>P. copri</i> (PREVCOP_06002)	für RT-qPCR
RTqPC06002_rev	GTGAACTGAGCACGATGACC		
PFL-Pcop_fw	CAACCACTGAACAGCCTCAC	Gen der Pyruvat-Formiat- Lyase von <i>P. copri</i> (PREVCOP_04273)	für RT-qPCR
PFL-Pcop_rev	CCGTGAAGAGGTTGCTATGC		
PFdOR_Pcop_fw	AGTTGACGGTACATGGCAGA	Gen der Pyruvat:Ferredoxin- Oxidoreduktase von <i>P.</i> <i>copri</i> (PREVCOP_03943)	für RT-qPCR
PFdOR_Pcop_rev	GAGCTCCTCGTCGGTCAATA		
PEPCK_Pcop_fw	TGCCAGTACCATTCCAACCT	Gen der PEP- Carboxykinase von <i>P. copri</i> (PREVCOP_05409)	für RT-qPCR
PEPCK_Pcop_rev	GCGGTATCACAGAGCCTACT		
AcK_Pcop_fw	ATAGCGGTGAGATGTTCCGT	Gen der Acetatkinase von <i>P. copri</i> (PREVCOP_04865)	für RT-qPCR
AcK_Pcop_rev	TATCCGTGCCGTTGACTCTT		
PC03899_RTqPCR_fw	GTTAGCACCATTTTCGACGCT	Gen der PPI-PFK von <i>P.</i> <i>copri</i> (PREVCOP_03899)	für RT-qPCR
PC03899_RTqPCR_rev	ACTCGGTTTCAACGCTTCAC		
PC04138_RTqPCR_fw	AATTCATCGCACCTGTCAGC	Gen der ATP-PFK von <i>P.</i> <i>copri</i> (PREVCOP_04138)	für RT-qPCR
PC04138_RTqPCR_rev	ACAGGTGGTACGATGCTGAA		
RTqPC04137_fw	TTACTCGCTGTGCACAATCG	Gen der ATPase- Untereinheit $\beta$ von <i>P. copri</i> (PREVCOP_04137)	für RT-qPCR
RTqPC04137_rev	ACCACTGAGCTTTCCCGTAA		
RTqPC04486_fw	CCCAGCCGAAGAACATTACG	Gen der Cytochrom-bd- Chinoloxidase- Untereinheit I von <i>P. copri</i> (PREVCOP_04486)	für RT-qPCR
RTqPC04486_rev	AACTACTCCTGGTTTCGTGGG		
RTqPC06243_fw	TGGGTGGTATCTGGGTTGAC	Gen der Fumaratreduktase- Untereinheit A von <i>P. copri</i> (PREVCOP_06243)	für RT-qPCR
RTqPC06243_rev	AGCCAAACCCTGCATCAAAG		
RTqPC06320_fw	TCCTGCTTTGCTCTTCGGTA	Gen der Nqr-Untereinheit B von <i>P. copri</i> (PREVCOP_06320)	für RT-qPCR
RTqPC06320_rev	ACCAGCAACTTAGGGAGGAC		
RTqPC03626_fw	AGCCATAGGTCCAAACTGCT	Gen der Untereinheit A der "kopflösen" NDHI von <i>P. copri</i> (PREVCOP_03626)	für RT-qPCR
RTqPC03626_rev	GTGAACCTTTTGAGTGCGGT		

RTqPC05981_fw	CACCTGGCAGAATCTCTCCT	Gen der Rnf-Untereinheit	
RTqPC05981_rev	CTTGGTTCTCGGAGCAATCG	B von <i>P. copri</i> (PREVCOP_05981)	für RT-qPCR

### 3.1.7 Software und Datenbanken

Die in dieser Arbeit verwendeten Programme und Datenbanken sind in **Tab. 5** aufgeführt.

**Tab. 5: Software und Datenbanken, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.**

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller/Quelle
Artemis	Auswertung von Transkriptomdaten	Carver <i>et al.</i> , 2012
Chromas 2.6.6	Analyse von DNA-Sequenzen	Technelysium Pty Ltd (Brisbane, Australien)
Citavi 6	Literaturverwaltung und Zitationsmanagement	Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil, Schweiz)
Clone Manager 9.2	Analyse von DNA-Sequenzen	Sci Ed Software (Colorado, USA)
Clustal Omega	Multisequenzvergleiche	UCD (Dublin, Irland); Sievers <i>et al.</i> , 2011
ESPrpt 3.0	Erstellung von Alignment-Abbildungen	esprpt.ibcp.fr (abgerufen am 06.01.2020); Robert <i>et al.</i> , 2014
Inkscape 0.92	Erstellung von Abbildungen	Inkscape Community
KEGG	Genomdatenbank	www.genome.jp/kegg (abgerufen am 06.01.2020); Kanehisa Laboratories (Kyoto und Tokyo, Japan)
Microsoft Office	Tabellenkalkulation, Erstellung von Abbildungen, Textverarbeitung	Microsoft (Redmond, USA)
NCBI	Genomdatenbank	www.ncbi.nlm.nih.gov (abgerufen am 06.01.2020); NCBI (Bethesda MD; USA)
NCBI BLAST	Vergleich von DNA- und Aminosäuresequenzen	blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (abgerufen am 06.01.2020)
PDBe-Datenbank	Proteindatenbank	PDBe (Cambridge, Großbritannien)
Primer 3	Designing von Oligonukleotiden für RT-qPCR	primer3.ut.ee (abgerufen am 06.01.2020)

Uniprot

Proteindatenbank

uniprot.org (abgerufen am 06.01.2020); UniProt  
Consortium

## 3.2 Mikrobiologische Methoden

### 3.2.1 Anzucht von *P. copri* in Serumflaschen

*P. copri* wurde unter anaeroben Anzuchtbedingungen bei 37 °C ohne Schütteln in etwa zur Hälfte mit PYG- oder DMMG-Medium befüllten, dickwandigen Serumflaschen kultiviert. Hierfür wurden die Basismedien (**Tab. 6** und **Tab. 8**) zuvor mit KOH und ggf. HCl auf einen pH-Wert von 8 eingestellt, wonach sie zunächst 10 min mit N<sub>2</sub> und anschließend mit einem 80 % N<sub>2</sub>/20 % CO<sub>2</sub>-Gasgemisch durchsprudelt wurden, bis durch die CO<sub>2</sub>-bedingte Ansäuerung (Kohlensäure) ein pH-Wert von 7 erreicht wurde. Durch diesen Schritt wurde Sauerstoff aus den Medien getrieben und die für die Anzucht notwendige Gasatmosphäre geschaffen. Versiegelt wurden die präparierten Serumflaschen vor dem Autoklavieren mit Butyl-Gummistopfen. Um verbliebenen Sauerstoff sichtbar zu machen, wurde den Medien der Redoxindikator Resazurin (Endkonzentration: 1 mg l<sup>-1</sup>) hinzugegeben, welcher im oxidierten Zustand und bei pH 7 eine blaue Farbe besitzt, die unter Reduktion zunächst irreversibel nach pink umschlägt (es entsteht Resofurin) und anschließend reversibel farblos wird (es bildet sich Dihydroresofurin). Um den verbliebenen Sauerstoff vor der Kultivierung des Bakteriums zu entfernen, wurde den Medien nach der Autoklavierung L-Cystein (Endkonzentration: 0,5 g l<sup>-1</sup>) als Reduktionsmittel hinzugefügt.

Tab. 6: PYG-Basismedium.

Substanz	Menge
Trypton	5 g
Pepton	5 g
Hefeextrakt	10 g
Fleischextrakt	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
Salzlösung PYG	40 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Tab. 7: Salzlösung PYG

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

Vor der Anzucht wurde dem PYG-Medium außerdem Hämin (**Tab. 13**; sterilfiltriert; Endkonzentration: 0,5 mg l<sup>-1</sup>) und Vitamin K1 (**Tab. 10**; sterilfiltriert; Endkonzentration: 1 µl l<sup>-1</sup>) sowie Glucose in einer Endkonzentration von 5 g l<sup>-1</sup> hinzugemischt. DMMG erhielt vor der Anzucht neben Hämin, Vitamin K1 und Glucose zusätzlich Wolin-Lsg. (Wolin *et al.*, 1963; **Tab. 11**; sterilfiltriert) in 0,1-facher Konzentration. Um die *lag*-Phase in DMMG zu verkürzen, wurde

als optionaler Zusatz K-Butyrat oder K-Valeriat (Endkonzentration: 3 mM) in das Medium gegeben (Wegner and Foster, 1963; Dehority *et al.*, 1967; Bryant and Robinson, 1962). Da *P. copri* außerdem natürlicherweise resistent gegenüber Tetracyclin ist, konnte dem Medium das Antibiotikum gegebenenfalls hinzugefügt werden, um Kontaminationen in der Stammerhaltung vorzubeugen.

Tab. 8: DMMG-Basismedium

Substanz	Menge
Mineral 3B	50 ml
0,2 % <sub>(w/v)</sub> L-Methionin	10 ml
FeSO <sub>4</sub> -Lsg.	1,5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Tab. 10: Vitamin K1-Lsg.

Substanz	Menge
Vitamin K1	0,1 ml
95 % <sub>(v/v)</sub> Ethanol	20 ml

Tab. 12: FeSO<sub>4</sub>-Lsg.

Substanz	Menge
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	0,278 g
HCl	2 Tropfen
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 100 ml

Tab. 13: Hämin-Lsg.

Substanz	Menge
Hämin	50 mg
1 M NaOH	1 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 100 ml

Tab. 9: Mineral 3B.

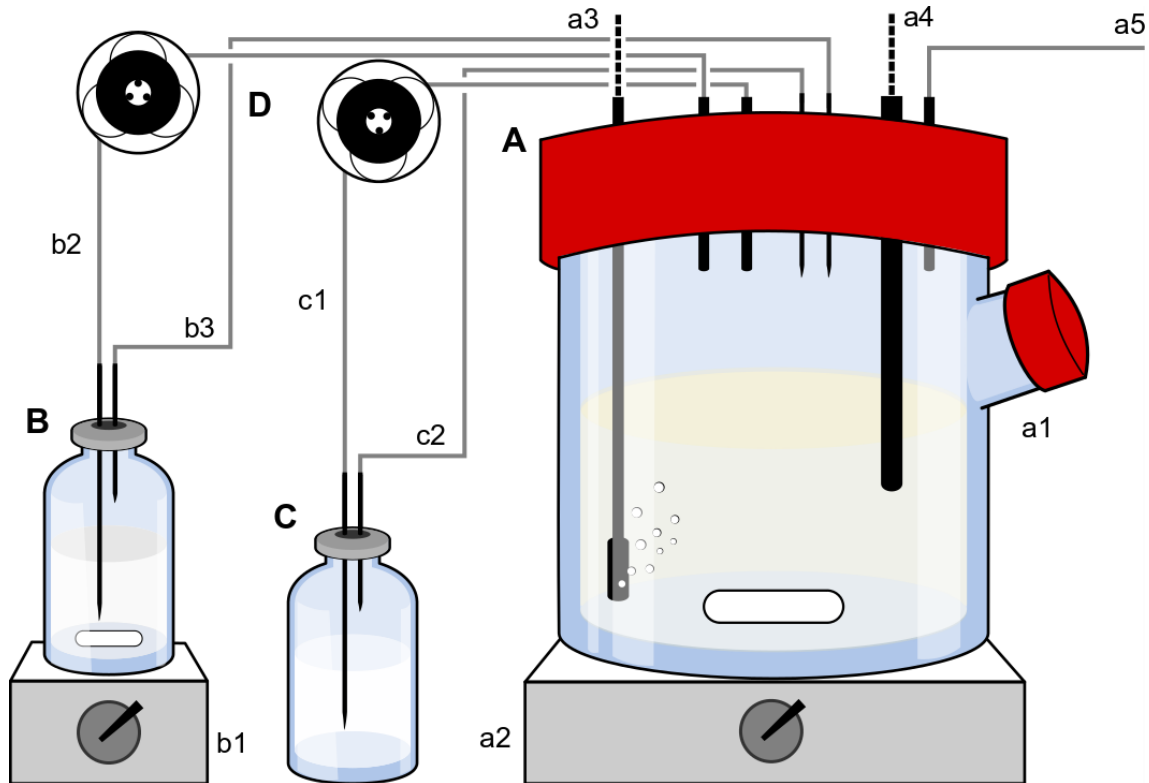
Substanz	Menge
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	18 g
NaCl	18 g
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,4 g
CaCl <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,52 g
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,02 g
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Tab. 11: 10x Wolin-Lsg. Nach 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
$\alpha$ -Liponsäure	50 mg
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

### 3.2.2 Anzucht von *P. copri* im anaeroben Kleinfermenter

Zur Kultivierung von *P. copri* in einem anaeroben Kleinfermenter wurde ein *benchtop* Bioreaktorsystem von DASGIP® (Jülich, Deutschland) für den anaeroben Betrieb umfunktioniert. Hierfür wurden zunächst sämtliche Öffnungen des Gefäßes luftdicht verschlossen und alle Schraubgewinde zusätzlich mit Teflonband abgedichtet. Als Zugänge für bspw. die Zufuhr von Substrat oder Probenentnahme wurden Septen auf Gummi eingesetzt, die mit Kanülen durchstoßen werden konnten. Für die spätere Zufuhr des N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>-Gasgemisches wurde ein Gasverteiler installiert und die Abluft an eine Waschflasche mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> angeschlossen. Der Fermenter wurde zu etwa der Hälfte mit PYG-Basismedium befüllt, das vor der Autoklavierung des Gefäßes etwa 10 min mit N<sub>2</sub> begast wurde, um die spätere Erzeugung anaerober Bedingungen zu beschleunigen. Nach separater Sterilisation wurde außerdem eine pH-Elektrode angebracht, die an der pH-Steuerungseinheit des Fermenters angeschlossen wurde. Als Rührwerk diente ein Magnetrührer. Zur Regulation des pH-Wertes wurde eine anaerobe Lösung 2 M HCl und eine anaerobe Ca(OH)<sub>2</sub>-Suspension (260 g l<sup>-1</sup>) in Serumflaschen über Peristaltikpumpen an den Fermenter angeschlossen, wobei jeweils ein ausreichend lange Kanüle bis etwa zum Boden der Serumflaschen versenkt wurde. Um die Ca(OH)<sub>2</sub>-Suspension gleichmäßig zu durchmischen wurde ein Magnetrührer verwendet, der die Suspension konstant aufwirbelte. Um außerdem die Bildung eines Unterdrucks zu vermeiden, wurden Verbindungsschläuche vom Gasraum der Serumflaschen zum Gasraum des Fermenters gelegt. Die Steuerung der Peristaltikpumpen erfolgte über die pH-Steuerungseinheit des Fermenters, die so eingestellt wurde, dass ein konstanter pH von 7 aufrechterhalten wurde. Ein Heizmantel, sowie eine Temperatursteuerung mit Messfühler wurde eingesetzt, um die Temperatur des Mediums auf 37 °C einzustellen. Ein Schema des vollständigen Fermenteraufbaus kann **Abb. 1** entnommen werden.



**Abb. 1: Aufbau des anaeroben Kleinfermenters zur Produktion von Succinat mit *P. copri*.** A = Kleinfermenter-Gefäß mit PYG-Medium, a1 = Zugangsstutzen, a2 = Magnetrührer des Kleinfermenters, a3 = Zufuhr des 80% N<sub>2</sub>/20% CO<sub>2</sub>-Gasgemisches, a4 = pH-Elektrode, a5 = Abluft, B = Serumflasche mit Ca(OH)<sub>2</sub>-Suspension, b1 = Magnetrührer der Ca(OH)<sub>2</sub>-Serumflasche, b2 = Fermenterzufuhr für Ca(OH)<sub>2</sub>-Suspension, b3 = Druckausgleichsschleife der Ca(OH)<sub>2</sub>-Serumflasche, C = Serumflasche mit HCl, c1 = Fermenterzufuhr für HCl, c2 = Druckausgleichsschleife der HCl-Serumflasche, D = Peristaltikpumpen. Der Kleinfermenter wurde zusätzlich mit einem Heizmantel versehen und das Medium mit Hilfe eines Messfühlers auf 37 °C temperiert (in der Abbildung nicht dargestellt). Die Peristaltikpumpen wurden pH-gesteuert betrieben, um den pH-Wert des Mediums auf konstant 7 zu halten.

Die Medienzusätze, 200 mM Glucose und L-Cystein (siehe auch **Kapitel 3.2.1**) wurden vor der Beimpfung des Mediums unter Begasung mit 80 % N<sub>2</sub>/20 % CO<sub>2</sub> in den Fermenter gegeben. Nach ~20 min konstanter Begasung erfolgte anschließend die 0,5 %<sub>(v/v)</sub>-ige Animpfung des Fermenters mit einer ü.N. angezogenen PYG-Kultur von *P. copri*. Die Fermentation erfolgte über einen Verlauf von insgesamt 144 h, wobei regelmäßig kleinvolumige Proben (2 ml) für die Bestimmung der OD<sub>600</sub>, des Substratverbrauchs und der Produktbildung genommen wurden (siehe weiterführend **Kapitel 3.2.6** und **Kapitel 3.4.5**). Nach 72 h wurden außerdem noch einmal 160 mM Glucose nachgefüttert.



### 3.2.3 Präparation von ruhenden Zellen zur ATP-Bestimmung

Als „ruhende Zellen“ bezeichnet man präparierte Zellen, die aufgrund des umliegenden Mediums nicht in der Lage sind Zellteilungen durchzuführen, aber wegen des immer noch vorhandenen Proteoms dennoch metabolische Reaktionen katalysieren können (Julsing *et al.*, 2012). Weil ruhende Zellen keine neuen Proteine mehr bilden, lässt sich dieser Zustand zur Analyse verschiedener metabolischer Parameter einsetzen. Vor allem kann der Energiemetabolismus von Zellen unabhängig vom Anabolismus betrachtet werden, was sich auch in der vorliegenden Arbeit zu Nutze gemacht wurde.

Um ruhende Zellen von *P. copri* zu erzeugen, wurden 500 ml Kulturen in PYG bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,6 bis 2 (entspricht mittlere bis späte exponentielle Wachstumsphase) angezogen und anschließend über Zentrifugation (8000 rpm, 10 min, 10 °C) geerntet. Die Zellpellets wurden zweimal mit je 100 ml *Resting Prevotella Cells*-Puffer (RPC-Puffer; **Tab. 14**) gewaschen (6000 x g, 20 min, 10 °C) und schlussendlich in 60 ml RPC-Puffer aufgenommen. Je 15 ml Aliquots wurden in Serumflaschen überführt, welche anschließend mit Butyl-Gummistopfen verschlossen und dann etwa 20 s mit 80 % N<sub>2</sub>/20 % CO<sub>2</sub> begast wurden. Sämtliche Arbeitsschritte wurden dabei unter strikt anaeroben Bedingungen in einem Anaerobenzelt (Coy Laboratory Products Inc., Grass Lake, USA) durchgeführt. Da sich im RPC-Puffer nicht ausreichend Nährstoffe befanden, waren die Zellen von *P. copri* ab hier nicht mehr in der Lage Zellteilung zu betreiben. Um die Zellen vor den nachfolgenden Experimenten vollständig auszuhungern, wurden die Zellsuspensionen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Induzierung des Energiestoffwechsels durch die Zugabe von 30 mM Glucose, wobei in jeweils einem Ansatz pro Replikat der Protonophor SF6847 oder der Natriumionophor ETH157 in einer Endkonzentration von 10 µM dazugegeben wurde, um die Auswirkungen der Ionophoren auf den Energiestoffwechsel von *P. copri* zu untersuchen (siehe weiterführend **Kapitel 3.3.10**).

**Tab. 14: RPC-Puffer.** Der pH-Wert des Puffers wurde zunächst mit KOH auf 8 eingestellt, wonach durch Begasung mit 80 % N<sub>2</sub>/20 % CO<sub>2</sub> der finale pH von 7,3 erreicht wurde.

Substanz	Menge
Mineral 3B	50 ml
FeSO <sub>4</sub> -Lsg.	1,5 ml
NaHCO <sub>3</sub>	2 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

### 3.2.4 Anzucht von *B. vulgatus* und *P. johnsonii*

Die Anzucht von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* erfolgt in DMMG wie bei *P. copri* (siehe **Kapitel 3.2.1**). Da *B. vulgatus* außerdem natürlicherweise resistent gegenüber Kanamycin ist, konnte zur Kultivierung dieses Organismus das Antibiotikum mit in das Medium gegeben werden, um Kontaminationen während der Kultivierung vorzubeugen.

### 3.2.5 Stammerhaltung der verwendeten Organismen

Zur kurzfristigen Stammerhaltung von *P. copri*, *B. vulgatus* und *P. johnsonii* wurden die Organismen im Abstand von spätestens 5 Tagen in frisches Medium (je nach Bedarf PYG oder DMMG) überführt und rekultiviert. Für die kurzfristige Lagerung wurden die Kulturen bei 4 °C gelagert. Um die Stämme längerfristig zu erhalten, wurden in kleinen Serumflaschen mit Butyl-Gummistopfen 2 ml von ü.N. angezogene Kulturen der jeweiligen Organismen 1:1 mit einer anaeroben und sterilen 50 %<sub>(w/v)</sub>-igen Saccharose-Lösung (Endkonzentration: 25 %<sub>(w/v)</sub>) versetzt und etwa 20 s mit N<sub>2</sub> steril begast. So präpariert wurden die Zellsuspensionen als Kryokulturen bei -70 °C eingelagert.

Um Kryokulturen zu reaktivieren, wurden diese auf Eis und unter steriler N<sub>2</sub>-Begasung aufgetaut. Anschließend konnten die Kryokulturen zur Animpfung von PYG oder DMMG verwendet werden.

### 3.2.6 Bestimmung der optischen Dichte von anaeroben Bakterienkulturen

Um das Wachstum bakterieller Zellsuspensionen zu quantifizieren, wurden die optischen Dichten der Kulturen bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) photometrisch ermittelt. Die Wellenlänge wurde so gewählt, dass Lichtstreuung durch die Bakterienzellen gemessen wurde und keine Absorption das Ergebnis verfälscht. Hierbei musste bedacht werden, dass die anaeroben Kulturen den Farbstoff Resazurin als Redox-Indikator enthielten und die Messungen aber aerob durchgeführt wurden. Um zu verhindern, dass der oxidationsbedingte Farbumschlag des Resazurins die Messung beeinflusste, wurden zum gewünschten Zeitpunkt 1 ml Proben der Kulturen in Plastikküvetten (1 cm Schichtdicke) gefüllt und diese mit wenigen Krümeln Natriumdithionit vermischt. Durch die starke Reduktionswirkung des Dithionits wurde die Oxidation des Resazurins verhindert und die Messung unverfälscht durchgeführt. Um Mehrfachstreuung des Lichts zu verhindern, die bei hohen Zelldichten das Ergebnis beeinträchtigen würden, wurden die Proben ab einer OD<sub>600</sub> von 0,3 mit Medium verdünnt. Als Leerwert diente ebenfalls das jeweilige Medium.

### 3.2.7 Bestimmung der Zelltrockenmasse von bakteriellen Kulturen

Neben der  $OD_{600}$  wurde auch die Zelltrockenmasse (TG) der bakteriellen Kulturen zur Quantifizierung des Wachstums bestimmt. Hierfür wurden 50 ml Kulturen bei  $6000 \times g$ , 20 min und  $10^\circ\text{C}$  abzentrifugiert und die Zellpellets zweimal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen, bevor sie in 5 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  aufgenommen und sukzessiv in vorher getrocknete und abgewogene 2 ml Mikroreaktionsgefäße überführt und erneut abzentrifugiert ( $6000 \times g$ , 2 min,  $10^\circ\text{C}$ ) wurden. Die abgetrennten Medienüberstände wurden zur Bestimmung des Produktspektrums und des Substratverbrauchs eingesetzt (siehe **Kapitel 3.4.5**). Nach Trocknung der Zellpellets bei  $120^\circ\text{C}$  für 48 h wurde die Zelltrockenmassen mit Hilfe einer Feinwaage ermittelt, wobei die Leergewichte von den Gewichten der gefüllten Mikroreaktionsgefäße abgezogen wurden.

### 3.2.8 Bestimmung von Wachstumsparametern

Zur Bestimmung der Wachstumsrate  $\mu$  und Verdopplungszeit  $td$  einer Bakterienkultur wurde zunächst eine Wachstumskurve erstellt, indem während der Anzucht die  $OD_{600}$  der Zellsuspension in regelmäßigen Abständen ermittelt wurde (siehe **Kapitel 3.2.6**). Anhand der logarithmischen Auftragung dieser Werte gegen die Zeit ließ sich die exponentielle Phase des Wachstums als ein linearer Verlauf darstellen, anhand dessen Steigung die Wachstumsrate berechnet werden konnte, wobei  $t$  und  $t_0$  zwei Zeitpunkten innerhalb des exponentiellen Wachstumsverlaufs und  $N_t$  und  $N_0$  den zugehörigen  $OD_{600}$ -Werten entsprechen (**Gl. 1**).

$$\text{Gl. 1} \quad \text{Wachstumsrate } \mu = \frac{\ln\left(\frac{N_t}{N_0}\right)}{(t - t_0)}$$

Die Wachstumsrate  $\mu$  konnte anschließend zur Berechnung der Verdopplungszeit genutzt werden, wofür **Gl. 2** verwendet wurde:

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

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 RNA-Isolierung

Um die Gesamt-RNA aus *P. copri*-Kulturen zu isolieren, wurden 500 ml PYG-Kulturen des Organismus bis zur mittleren exponentiellen Wachstumsphase ( $OD_{600}$  zwischen 1,5 und 1,8) angezogen und anschließend für wenige Minuten in einem  $-70\text{ °C}$  kaltem Ethanol-Bad abgekühlt. Durch Zentrifugation wurden die Kulturen aerob abgeerntet ( $6000 \times g$ , 20 min,  $10\text{ °C}$ ) und die Zellpellets auf Eis in je 5 ml TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) resuspendiert. Die resuspendierten Pellets wurden in je 1 ml Aliquots auf 2 ml Mikroreaktionsgefäße aufgeteilt und für 15 min bei RT inkubiert, um die Zellen zu lysieren. Sämtliche nun folgenden Schritte wurden unter möglichst RNase-freien Bedingungen unter der Sterilbank durchgeführt. Zu den TRI-Reagent-Lysaten wurden je 100  $\mu\text{l}$  1-Bromo-3-chloropropan gegeben und durch invertieren der Reaktionsgefäße untergemischt. Nach 15-minütiger Inkubation wurden die Ansätze bei  $20.000 \times g$  für 10 min bei  $4\text{ °C}$  zentrifugiert, um eine Phasentrennung zwischen dem TRI Reagent®- und der 1-Bromo-3-chloropropan-Phase zu erreichen. Die oberen, nun möglichst klaren Phasen wurden den Aliquots entnommen und zusammengehörend vereinigt, um mit je 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt zu werden. Nach etwa 10 s durchmischen der Präparation auf dem Vortexmischer folgte eine 5- bis 10-minütige Inkubation bei  $-20\text{ °C}$ , um die Nukleinsäuren zu fällen. Anschließend wurden die gefällten Nukleinsäuren durch Zentrifugation ( $20.000 \times g$ , 10 min,  $4\text{ °C}$ ) pelletiert und die Überstände verworfen. Es folgte ein Waschschrift der Pellets mit je 1 ml eiskaltem Ethanol ( $75\%_{(v/v)}$ ) und eine finale Zentrifugation der Proben bei  $20.000 \times g$  und  $4\text{ °C}$  für 5 min. Die Nukleinsäure-Pellets wurden unter der Sterilbank getrocknet, in 90  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$  aufgenommen und anschließend mit 10  $\mu\text{l}$  10x DNase-Puffer sowie 5  $\mu\text{l}$  DNase I versetzt, um die noch vorhandene DNA zu entfernen. Nach 2 h Inkubation bei  $37\text{ °C}$ , wurden erneut 5  $\mu\text{l}$  DNase I zu den Ansätzen hinzupipettiert, um die Reaktion über eine weitere Stunde Inkubation bei  $37\text{ °C}$  zu verstärken. Die Aufreinigung der übrig gebliebenen RNA erfolgte mittels RNA Clean & Concentrator™-Kit (Zymo Research, Freiburg, Deutschland) nach Herstellerangaben.

#### 3.3.2 Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen

Die Bestimmung von RNA- und DNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch mit Hilfe eines UV/Vis-Spektralphotometers (BioPhotometer® D30; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Es wurde die Absorption von RNA- und DNA-Präparationen bei der charakteristischen Wellenlänge von 260 nm gemessen ( $A_{260}$ ) und die jeweiligen Nukleinsäure-Konzentrationen anhand des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet, wobei die Extinktionskoeffizienten von ssRNA ( $\epsilon_{260} = 0,025\text{ [}\mu\text{g/ml]}^{-1}$ ) und dsDNA ( $\epsilon_{260} = 0,020\text{ [}\mu\text{g/ml]}^{-1}$ ) genutzt wurden. Als Leerwert diente  $\text{H}_2\text{O}_{\text{reinst}}$ , in dem die präparierten Nukleinsäuren letztendlich gelöst worden waren.

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung wurden außerdem die Verhältnisse  $A_{260}/A_{280}$  und  $A_{260}/A_{230}$  bestimmt, um die Reinheit der Präparationen bewerten zu können. Reine DNA- bzw. RNA-Präparationen besitzen hier idealerweise Werte zwischen 1,8 bis 2. Niedrigere Verhältnisse deuten wiederum auf Proteinkontaminationen ( $A_{280}$ ) oder Lösungsmittelrückstände ( $A_{230}$ ) hin.

### 3.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur *in vitro* Amplifikation von DNA (Mullis *et al.*, 1986). Hierfür nutzt man Oligonukleotide (Primer), die sequenzspezifisch an eine denaturierte DNA-Matrix binden und so den Startpunkt für die Amplifikation festlegen. Eine thermostabile DNA-Polymerase (z.B. aus *Thermus aquaticus*) synthetisiert anschließend vom 3'-Ende der Primer aus den neuen DNA-Strang, welcher homolog zur eingesetzten DNA-Matrix ist. Die mehrfache Amplifikation der Matrix erfolgt dabei durch die zyklische Wiederholung von drei Schritten:

1. Denaturierung der DNA-Matrix bei einer Temperatur von 95-98 °C.
2. Hybridisierung der Primer mit der DNA-Matrix bei einer Primer-abhängigen Temperatur ( $T_A$ ).
3. Elongation bzw. Synthese des komplementären Einzelstrangs bei einer von der eingesetzten DNA-Polymerase abhängigen Temperatur.

In dieser Arbeit wurde die OneTaq® DNA-Polymerase von New England Biolabs (Ipswich, USA) eingesetzt, um Kulturen für die Stammerhaltung anhand der 16S-rRNA auf Reinheit zu überprüfen und um die Qualität von RNA-Präparationen bewerten zu können. Bei der eingesetzten Polymerase handelte es sich um eine modifizierte Taq-DNA-Polymerase, die eine Arbeitsgeschwindigkeit von ca. 1 kb min<sup>-1</sup> und eine geringe Fehlerrate besitzt. Die Durchführung der PCR erfolgte mit dem in **Tab. 15** aufgeführten Ansatz und dem in **Tab. 16** aufgeführten Programm in einem MyCycler™ von BioRad (München, Deutschland).

**Tab. 15: Standard-PCR-Ansatz.**

Substanz	Menge
Vorwärtsprimer (10 pmol µl <sup>-1</sup> )	0,5 µl
Rückwärtsprimer (10 pmol µl <sup>-1</sup> )	0,5 µl
OneTaq® Quick Load 2x Master Mix	12,5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>reinst</sub>	6,5 µl
DNA-Matrix	5 µl

Tab. 16: Standard-PCR-Programm.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	
Initialdenaturierung	94,0	05:00	
<b>Denaturierung</b>	94,0	00:25	┐
<b>Hybridisierung</b>	T <sub>A</sub>	00:20	33x
<b>Elongation</b>	68,0	x	┘
Endelongation	68,0	05:00	
Programmende	12,0	∞	

T<sub>A</sub>: von den eingesetzten Primern abhängige Hybridisierungstemperatur

x: von der Länge des Amplikons abhängige Elongationsdauer

Für die spezifische Amplifikation eines charakteristischen Sequenzabschnitts des 16S-rRNA-Gens zur Stammerhaltung von *P. copri* oder *B. vulgatus* wurden die Primer Pco\_16S2\_fw und Pco\_16S2\_rev bzw. Bac\_16S2\_fw und Bac\_16S2\_rev (siehe Tab. 4) bei einer Hybridisierungstemperatur von 60 °C und einer Elongationszeit von 45 s eingesetzt. Als DNA-Matrix dienten jeweils 1:100 mit H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> verdünnte Kulturproben.

Um RNA-Präparationen von *P. copri* auf DNA-Kontaminationen zu überprüfen wurde eine Kontroll-PCR mit den Primern RTqPC05981\_fw und RTqPC05981\_rev (siehe auch Tab. 4) bei einer Hybridisierungstemperatur von 58 °C und einer Elongationszeit von 30 s durchgeführt. Als Matrix diente die RNA-Präparation, welche keine DNA mehr enthalten sollte. Im Falle einer sauberen Präparation sollte entsprechend keine DNA-Amplifikation stattfinden können, wohingegen eine noch mit DNA kontaminierte Probe zu einem Amplifikat geführt hätte. Als Qualitätsstandard wurden nur RNA-Präparationen für weitere Experimente verwendet, die auch nach 25 PCR-Zyklen kein Amplifikat aufwiesen.

### 3.3.4 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

Mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA- oder RNA-Stränge entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch auftrennen (Sambrook *et al.*, 1989). Dies ist möglich, da Nukleinsäuren aufgrund ihrer negativen Gesamtladung in einem elektrischen Feld zur Anode hinwandern. In einem Agarose-Gel führt dieser Effekt dazu, dass sich ein Gemisch aus unterschiedlich großen Nukleinsäure-Strängen auftrennen lässt, da kürzere Fragmente schneller durch das Maschennetz des Gels wandern können als größere. Durch die Nutzung eines Markers mit definierten Nukleinsäure-Fragmenten können so im Gel entstehende Nukleinsäure-Banden ihren Größen zugeordnet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 1 %-ige Agarose-Gele und 1x TAE-Puffer (Tab. 17) verwendet, um DNA-Proben elektrophoretisch aufzutrennen. Zur späteren Visualisierung wurde dem Gel vor Erstarren 1x Roti®-GelStain Red von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland) hinzugegeben. Der Farbstoff interkaliert mit DNA und RNA und fluoresziert unter UV-Licht. Als Marker dienten die Quick-Load® Purple 1 kb DNA ladder von New England Biolabs (Ipswich, USA) und die GeneRuler Low Range DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland). Als Ladepuffer wurde der Gel Loading Dye, Purple (6x) von New England Biolabs (Ipswich, USA) eingesetzt. Die angelegte Spannung betrug 90 V.

Tab. 17: TAE-Puffer (1x).

Substanz	Menge
Tris-HCl	4,84 g
0,05 M EDTA (pH 8)	2 ml
1 M Essigsäure	1,14 ml
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	ad 1000 ml

Um die DNA-Banden nach gelelektrophoretischer Auftrennung sichtbar zu machen, wurde das Agarose-Gel mit Hilfe eines UV-Transilluminators (Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) begutachtet und abfotografiert.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA-Proben wurden denaturierende Agarose-Gele verwendet, die die Ausbildung von hinderlichen, aber bei RNA-Strängen häufig vorkommenden Sekundärstrukturen unterbinden. Hierfür wurden zunächst 0,5 g Agarose in 36 ml H<sub>2</sub>O<sub>reinst</sub> aufgekocht und mit 5 ml 10x RNA-MOPS-Puffer (400 mM MOPS, 100 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH 7) und 9 ml 37 %<sub>(v/v)</sub> Formaldehyd versetzt. Nach Erstarren des Gels wurde die Gelkammer mit 1x RNA-MOPS-Puffer befüllt und die Proben für die Gelelektrophorese vorbereitet. Dabei wurden 5 µg RNA 1:1 mit RNA-Ladepuffer vermischt und anschließend für 10 min bei 65 °C inkubiert. Die Proben wurden hiernach für 5 min auf Eis runtergekühlt, bevor sie in die Geltaschen pipettiert wurden. Zur Auftrennung wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Um die RNA zu visualisieren, wurden die Gele nachträglich mit GelRed® (Biotium, Fremont, USA) nach Herstellerangaben eingefärbt. Die Anfärbung glich ansonsten der oben genannten „in-Gel“-Variante. Die Betrachtung des Gels erfolgte schlussendlich über den UV-Transilluminator.

### 3.3.5 Weiterführende Qualitätskontrolle isolierter RNA

Die Qualität von RNA-Präparationen ist für viele Experimente von kritischer Bedeutung. Häufig muss gewährleistet sein, dass die RNA in einem möglichst intakten Zustand präpariert wurde

und es nicht zu einer mechanischen Scherung der RNA-Stränge oder dem enzymatischen Abbau durch RNasen gekommen ist. Hierfür kann man die klassische Auftrennung von RNA-Präparaten mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese (**Kapitel 3.3.4**) nutzen, oder die noch höher auflösende Variante der Mikrofluid-Elektrophorese. Um RNA-Präparate für die Transkriptomsequenzierung qualitativ zu bewerten, wurde daher das Mikrofluid-Elektrophorese-System Agilent 2100 Bioanalyzer G2939A (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) zusammen mit dem Agilent RNA 6000 Nano Kit nach Herstellerangaben verwendet. Das Prinzip glich dabei einer klassischen Gelelektrophorese, wobei die RNA aufgrund einer angelegten elektronischen Spannung durch Mikrokanäle einer Polymermatrix wanderte und dabei ihrer Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt wurde. Mit Hilfe eines interkalierenden Farbstoffs wurden die aufgetrennten RNA-Moleküle an einem fluoreszenzphotometrischen Detektor gemessen und es entstand anhand der Retentionszeiten und der Signalintensität ein Gel-ähnliches Abbild sowie ein Elektropherogramm, anhand derer die Qualität der RNA bewertet werden konnte. Zusätzlich ermittelte ein spezifischer von Agilent geschaffener Algorithmus die sogenannte *RNA integrity number* (RIN), welche den Gesamtzustand der RNA mit einer Zahl von 1 (schlechtester Wert) bis 10 (bester Wert) angibt.

#### 3.3.6 Quantitative RT-PCR (RT-qPCR)

Als quantitative Reverse-Transkriptase-PCR (RT-qPCR) bezeichnet man ein quantitatives Verfahren, mit dem man die relative Menge von mRNA eines Zielgens mit der eines konstitutiv exprimierten Referenzgens vergleichen kann. Hierfür wird zunächst isolierte Gesamt-RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben, wonach eine PCR mit Genspezifischen Primern durchgeführt wird, die die (Teil-)Sequenzen der jeweiligen und nun umgeschriebenen mRNA amplifiziert. Um die Amplifikation sichtbar zu machen, enthalten die Ansätze einen Farbstoff, wie bspw. SYBR Green, welcher an doppelsträngige DNA (dsDNA) bindet, wodurch die Fluoreszenz des Farbstoffs bei einer bestimmten Wellenlänge zunimmt. Das messbare Fluoreszenzsignal korreliert damit direkt mit der Menge an enthaltener dsDNA, die in einer PCR mit jedem Zyklus exponentiell zunimmt. Rekapitulierend lässt sich so auch die relative Ausgangsmenge an cDNA ermitteln, da der Zeitpunkt, an dem ein bestimmter Fluoreszenzwert bzw. Schwellenwert (*threshold*) detektiert wird, je nach Ausgangsmenge früher oder später stattfindet. Die Zykluszahl, bei welcher der *threshold* erreicht wird, bezeichnet man dabei als Ct-Wert, welcher am Anfang der linearen Phase der exponentiellen Amplifikationskurve angesiedelt ist. Je geringer der Ct-Wert, desto mehr mRNA eines Gens befand sich also vor der reversen Transkription in der Probe, während ein höherer Ct-Wert mit geringen Transkriptmengen gleichzusetzen ist.



In der vorliegenden Arbeit wurde die RT-qPCR genutzt, um den Transkriptionsstatus von Genen der Schlüsselenzyme des Zentralstoffwechsels von *P. copri* zu bestimmen. Hierfür wurde das QRT-PCR Green One Step Kit LRox (biotechrabbit, Henningsdorf, Deutschland) nach Herstellerangaben benutzt, wobei 5 pmol der jeweiligen Primer und 50 ng RNA pro 20 µl-Ansatz verwendet wurden. Die experimentelle Durchführung erfolgte in einem CFX Connect™ RT-PCR-Cycler von BioRad (München, Deutschland) und dem in **Tab. 18** aufgeführten PCR-Programm. Am Ende des Programms wurde optional eine Schmelzkurve der Amplifikate erstellt, wobei schrittweise die Temperatur erhöht und die Fluoreszenz der Ansätze gemessen wurde. Hierdurch konnte die Spezifität der Primer bzw. der Amplifikation bewertet werden, da distinkte PCR-Produkte einen charakteristischen Schmelzkurvenverlauf zeigen.

Tab. 18: RT-qPCR-Programm.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [mm:ss]	
Reverse Transkription	50	10:00	
<b>Initialdenaturierung/Aktivierung</b>	95	03:00	┐
<b>Denaturierung</b>	95	00:10	40x
<b>Hybridisierung und Elongation</b>	60	00:30	┘
Schmelzkurve	35 – 95	jeweils 00:05	

Die Ct-Werte wurden durch das zum Cycler gehörende *interface* automatisch ermittelt. Um hieraus die relative Transkriptabundanz eines Gens von Interesse zu bestimmen, wurden der Ct-Wert mit dem Ct-Wert des Referenzgens des ribosomalen Proteins L21, das unter wachsenden Bedingungen konstitutiv exprimiert wird, verrechnet (Gl. 3 und Gl. 4).  $\Delta Ct$  stellt dabei die Differenz zum Ct-Wert des Referenzgens dar, während  $\Delta\Delta Ct$  das relative Verhältnis zur Transkriptmenge des Referenzgens angibt. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne Reverse Transkriptase mit Primern für das Referenzgen.

$$\text{Gl. 3} \quad \Delta Ct = Ct - Ct_{\text{Referenzgen}}$$

$$\text{Gl. 4} \quad \Delta\Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$$

### 3.3.7 Transkriptomsequenzierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde präparierte Gesamt-RNA von *P. copri* sequenziert, um eine Übersicht über die Transkriptmengen sämtlicher Gene unter Wachstum auf Glucose zu erhalten, die die Ergebnisse der RTq-PCR noch erweitern und stützen sollten. Die RNA-Sequenzierung wurde von der Firma BGI Tech Solution Co. Ltd. (Hongkong, China) durchgeführt und erforderte hohe Anforderungen an das Probenmaterial. So musste darauf geachtet werden, dass keine nennenswerten Lösungsmittelreste in den Proben verblieben und

die RNA sich in einem möglichst intakten Zustand befand (siehe auch **Kapitel 3.3.2**, **Kapitel 3.3.4** und **Kapitel 3.3.5**). Für die Sequenzierung wurden die RNA-Präparationen von der Firma zunächst mit verschiedenen Hybridisierungstechniken vorsortiert und mit Hilfe von zufalls-generierten Primern (*random N6 primer*) über eine Reverse Transkriptase in eine cDNA-Bibliothek übersetzt. Die cDNA wurde anschließend über DNA nanoball sequencing (DNBseq™; Drmanac *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017) sequenziert. Dabei werden zunächst einzelsträngige, zirkuläre cDNA-Proben erzeugt, die über *rolling circle amplification* (RCA) kontinuierlich und an einem zusammenhängenden Strang amplifiziert werden, wodurch etwa 300 nm durchmessende DNA-Nanokügelchen (DNBs) entstehen. Diese werden in einem hochorganisierten Muster auf einen Durchfluss-Nanoarray-Chip aufgetragen, um als Startpunkte für die eigentliche Sequenzierung zu dienen (Drmanac *et al.*, 2010). Ähnlich wie bei der Illumina Sequenzierung werden im Anschluss Basen-spezifische Fluorophore eingesetzt, um während der weiteren Amplifikation der DNBs die Sequenzen für jeden einzelnen Punkt des Nanoarray-Chips zu bestimmen (Drmanac *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017). Die so erzeugten Sequenzdaten wurden nun den Sequenzbereichen der Genomdaten von *P. copri* DSM 18205 (NCBI BioProject Accession: PRJNA30025) zugeordnet und mit Hilfe des Programms Artemis (Carver *et al.*, 2012) ausgewertet. Als Resultat konnte jedem transkribierten Genombereich sogenannte *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM) zugeordnet werden, die die Transkriptmengen als normalisierte Werte darstellen. Die Normalisierung bezieht sich dabei auf die einzelnen Längen der abgedeckten Sequenzbereiche des Genoms und die Anzahl aller sequenzierten Transkripte.

### 3.3.8 Präparation von Cytoplasma- und Membranfraktionen

Um Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri* zu präparieren wurden Kulturen in 500 ml PYG-Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> zwischen 1,5 und 1,8 angezogen und die Zellen bei 6000 x g bei 10 °C für 20 min anaerob abgeerntet. Die Zellpellets wurden in 15 ml anaeroben Kaliumphosphatpuffer (40 mM Kaliumphosphatpuffer, 5 mM Dithioerythritol, 1 mg ml<sup>-1</sup> Resazurin, pH 7) resuspendiert und mittels Ultraschalldesintegrator (Sonoplus Sonicator, Bandelin Electronic, Berlin, Deutschland) bei gepulsten Ultraschallintervallen mit einer Intensität von 50 % für 2 min pro ml Zellsuspension unter Zugabe von DNase I aufgeschlossen. Das Lysat wurde zentrifugiert (12.000 x g, 4 °C für 10 min), um intakte Zellen und sonstige unerwünschte Rückstände zu entfernen. Der Überstand wurde anschließend ultrazentrifugiert (150.000 x g, 4 °C für 1,5 h), wodurch Membranfragmente von der löslichen Proteinfraction abgetrennt wurden. Der Überstand nach Zentrifugation wurde als verdünnte Cytoplasmafraction der Zellen definiert und in einer Serumflasche mit Butylgummistopfen für die weitere Nutzung bei -70 °C eingelagert. Das rotbräunliche Pellet (= Membranfraction) wurde

mit anaerobem Kaliumphosphatpuffer gewaschen und erneut ultrazentrifugiert ( $150.000 \times g$ ,  $4^\circ\text{C}$  für 1 h), um Kontaminationen der Membranfraktion zu entfernen. Das Pellet wurde anschließend in 1 ml anaerobem Kaliumphosphatpuffer (siehe oben) homogenisiert und in Glasfläschchen aliquotiert, die mit einem Gummistopfen versiegelt und bis zur weiteren Nutzung bei  $-70^\circ\text{C}$  eingelagert wurden. Sämtliche Schritte wurden anaerob durchgeführt, wobei das Befüllen bzw. Umfüllen von gasdichten Zentrifugenbechern und die generelle Handhabung in einem Anaerobenzelt von Coy Laboratory Products Inc. (Grass Lake, USA) bei einer 98 %  $\text{N}_2/2\% \text{H}_2$ -Gasatmosphäre stattfand.

### 3.3.9 Aktivitätsbestimmung cytoplasmatischer Enzyme und Transmembrankomplexen in Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri*

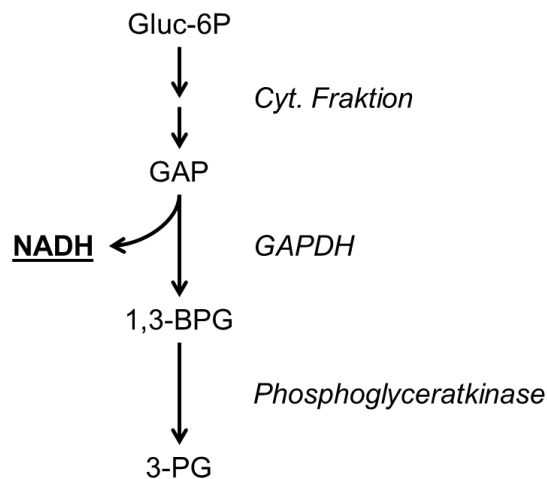
Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden verschiedenen Aktivitäten von cytoplasmatischen Enzymen und Transmembrankomplexen von *P. copri* gemessen, um das Vorhandensein von zentralen Stoffwechselwegen auf Proteinebene zu bestätigen. Hierfür wurden präparierte Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri* (**Kapitel 3.3.8**) in photometrischen Untersuchungen eingesetzt, wobei Quarzküvetten verwendet wurden, die mit Butylgummistopfen versiegelt und durch 3-minütige  $\text{N}_2$ -Begasung anaerobisiert wurden. Gemessen wurden die Assays in einem V-550 UV/Vis Spectrometer von Jasco bei  $37^\circ\text{C}$  (Pfungstadt, Deutschland). Die Enzymaktivitäten wurden dabei als  $\text{U mg}^{-1}$  Membran- bzw. Cytoplasmaprotein bestimmt, wobei U als Substratumsatz in  $\mu\text{mol pro min}$  definiert wurde.

Die Aktivitätsbestimmung der Fumaratreduktase erfolgte mit Membranfraktionen von *P. copri* in einem anaeroben Tris-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, pH 7). Als artifizieller Elektronendonator wurde 2,5 mM Benzylviologen eingesetzt, welches mit 0,2 mM Natriumdithionit reduziert wurde. Die Reaktion wurde anschließend mit 2 mM Natriumfumarat und verschiedenen Mengen Membranfraktion (0 - 0,5 mg Membranprotein  $\text{ml}^{-1}$ ) gestartet, wobei die Reihenfolge der letzten Substanz des Ansatzes variiert wurde. Die Aktivität der Fumaratreduktase wurde bei 550 nm ( $\epsilon_{550 \text{ nm}} = 7,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) als Fumarat-abhängige Oxidation des reduzierten Benzylviologens verfolgt.

Die NADH-Dehydrogenase-Aktivität wurde mit Membranpräparationen ebenfalls in einem anaeroben Tris-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 5 mM DTT, 0,01 % Triton-X100, pH 7) gemessen, welcher DTT für anaerobe Bedingungen und geringe Mengen Triton-X100 enthielt, um 0,25 mM Decylubichinon als Elektronenakzeptor in Lösung zu bringen. Als Elektronendonator der Reaktion diente 0,5 mM NADH, dessen Membran-abhängige Oxidation bei 340 nm ( $\epsilon_{340 \text{ nm}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) photometrisch verfolgt wurde. Um die Reaktion zu starten

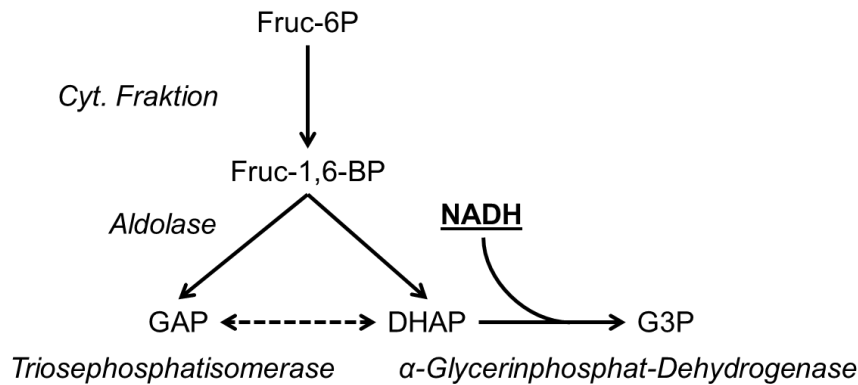
wurde entweder NADH oder verschiedene Konzentrationen der Membranpräparationen (0 – 0,5 mg Membranprotein ml<sup>-1</sup>) als letztes in den Reaktionsansatz gegeben.

Die enzymatische Umwandlung von Glucose-6-phosphat zu Glyceraldehyd-3-phosphat wurde in einem anaeroben Tris-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7) gemessen. Die Ansätze enthielten 0,4 mM ADP, 0,4 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM ATP, 0,5 mM Natriumpyrophosphat, 7 U ml<sup>-1</sup> GAP-Dehydrogenase aus Kaninchenmuskel (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 10 U ml<sup>-1</sup> Phosphoglyceratkinase. Um die Reaktion zu starten wurden 0,2 mM NAD<sup>+</sup>, 2 mM Glucose-6-phosphat und 0 – 9 µg ml<sup>-1</sup> Cytoplasmaprotein in variabler Reihenfolge hinzugefügt. Verfolgt wurde der Ablauf der Reaktion (**Abb. 2**) durch die Glucose-6-phosphat-abhängige Reduktion von NAD<sup>+</sup> bei 340 nm.



**Abb. 2:** Schematischer Reaktionsablauf des Enzym-Assays zur Bestimmung der enzymatischen Umwandlung von Glucose-6-phosphat (Gluc-6P) zu Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) mit der cytoplasmatischen Fraktion (cyt. Fraktion) von *P. copri*. GAPDH = GAP-Dehydrogenase, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat.

Um die Aktivität der Phosphofruktokinasen in Cytoplasmafraktionen von *P. copri* zu messen, wurde ein Ansatz mit 15 mM Fructose-6-phosphat, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM NADH, 2 mM ATP oder Natriumpyrophosphat, 0,6 U ml<sup>-1</sup> Triosephosphatisomerase aus Kaninchenmuskel (Sigma-Aldrich, München, Deutschland), 0,6 U ml<sup>-1</sup> Aldolase, α-Glycerophosphat-Dehydrogenase und 0 – 10 µg Cytoplasmaprotein ml<sup>-1</sup> in 40 mM Tris-HCl (pH 7, anaerob) verwendet, wobei die Reaktion entweder mit den Proben der Cytoplasmafraktion oder Fructose-6-phosphat gestartet wurde. Als Resultat der ATP- oder P<sub>Pi</sub>-abhängigen Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat, der Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat und der Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat durch die α-Glycerophosphat-Dehydrogenase wurde die Oxidation von NADH bei 340 nm gemessen (**Abb. 3**).



**Abb. 3: Schematischer Reaktionsablauf der Bestimmung der Phosphofruktokinase-Aktivität in cytoplasmatischen Fraktionen (cyt. Fraktion) von *P. copri*.** Fruc-6P = Fructose-6-phosphat, Fruc-1,6-BP = Fructose-1,6-bisphosphat, GAP = Glyceraldehyd-3-phosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, G3P = Glycerin-3-phosphat.

Zur Bestimmung der GAP-Dehydrogenase-Aktivität in Cytoplasmafraktionen von *P. copri* wurde erneut ein anaerober Tris-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 5 mM DTT) verwendet. Die Ansätze enthielten 0,2 mM  $\text{NAD}^+$ , 0,4 mM ADP, 0,4 mM  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM Glyceraldehyd-3-phosphat, 11 U ml<sup>-1</sup> Phosphoglyceratkinase aus *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und verschiedene Konzentrationen (0 – 9 µg Cytoplasmaprotein ml<sup>-1</sup>) der Cytoplasmafraktion von *P. copri*. Die Glyceraldehyd-3-phosphat-abhängige Reduktion von  $\text{NAD}^+$  wurde bei 340 nm verfolgt.

Die PEP-Carboxykinase- plus Malatdehydrogenase-Aktivität in den Cytoplasmafraktionen wurde in 40 mM Tris-HCl (pH 7) mit 20 mM NaCl und 5 mM DTT durchgeführt. Die Enzym-Assays enthielten des Weiteren 0,2 mM NADH, 0,4 mM ADP, 0,4 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM  $\text{MnCl}_2$  und 5 mM  $\text{NaHCO}_3$ . Die Reaktion wurde mit Proben der präparierten Cytoplasmafraktion (0 – 9 µg Cytoplasmaprotein ml<sup>-1</sup>) und 0,8 mM Phosphoenolpyruvat in variabler Reihenfolge gestartet, wobei die Küvetten zuvor mit 80 %  $\text{N}_2$ /20 %  $\text{CO}_2$  durchgast worden waren. Die PEP- bzw. Oxalacetat-abhängige Oxidation des NADH wurde bei 340 nm gemessen. Die Messung der Malatdehydrogenase alleine erfolgte in der gleichen Art und Weise, wobei PEP durch 0,4 mM Oxalacetat ersetzt wurde.

Die Aktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase wurde in cytoplasmatischen Fraktionen von *P. copri* wie von Zhou *et al.*, 2015 beschrieben nachgewiesen. Hierfür wurde ein anaerober Tris-Puffer (40 mM Tris-HCl, 20 mM NaCl, 5 mM DTT, pH 7) verwendet und mit 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM Coenzym A, 0,4 mM Thiaminpyrophosphat, 3 mM Methylviologen und 10 mM Pyruvat versetzt. Zu diesem Ansatz wurde anschließend  $\leq 0,2$  mM Natriumdithionit hinzu pipettiert, bis eine leicht bläuliche Verfärbung durch die Reduktion des Methylviologens zu erkennen war. Die Reaktion wurde anschließend durch die Zugabe von 0 – 10 µg Cytoplasmaprotein ml<sup>-1</sup> gestartet

und die ausgelöste Fortführung der Methylviologen-Reduktion bei 604 nm ( $\epsilon_{604} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) verfolgt. Um nicht-enzymatische Ursachen für die beobachtete Reaktion auszuschließen, wurde die Reihenfolge der Zugabe des Pyruvats mit der Zugabe der Cytoplasmafraktion variiert.

### 3.3.10 ATP-Bestimmung von ruhenden Zellen

Um die ATP-Bildung von *P. copri* (unter Einfluss eines Protonophors oder Natriumionophors) zu messen, wurden Suspensionen mit ruhenden Zellen präpariert (**Kapitel 3.2.3**), deren Energiemetabolismus nach der Äquilibrierung mit 30 mM Glucose reaktiviert wurde. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  Proben der reaktivierten ruhenden Zellen in kurzen zeitlichen Abständen genommen und in auf Eis gelagerte Mikroreaktionsgefäße mit 40  $\mu\text{l}$  3 M Perchlorsäure überführt und für 40 bis 120 min unter gelegentlichem Invertieren inkubiert. Hierdurch wurden die Zellen lysiert und eine Hydrolyse von ATP verhindert. Die Ansätze wurden durch die Zugabe von 13  $\mu\text{l}$  gesättigter  $\text{K}_2\text{CO}_3$ -Lsg. neutralisiert und mit 20  $\mu\text{l}$  eines 400 mM Natrium- $\text{TES}$ -Puffers (pH 7,4) versetzt. Das bei der Neutralisierung entstehende und präzipitierende Kaliumchlorat wurde anschließend für 3 min bei  $20.000 \times g$  und  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  abzentrifugiert und die Überstände für die enzymatische ATP-Bestimmung mittels Leuchtkäfer-Luciferase verwendet. Die Luciferase oxidiert dabei mit molekularem Sauerstoff Luciferin zu Oxoluciferin, wobei gleichzeitig ATP hydrolysiert wird. Da durch die katalysierte Reaktion Oxoluciferin in einem angeregten Zustand gebildet wird, das bei der Rückkehr zu seinem Grundzustand genau einen Lichtquant abgibt, lässt sich die ATP-Hydrolyse anhand der Lichtemission messen. Aufgrund der Proportionalität der Lichtemission zur umgesetzten ATP-Menge, lässt sich über diese Methode sogar die Konzentration von ATP in einer Lösung quantifizieren. Um ATP-Präparate der ruhenden Zellen zu messen wurden 1 – 20  $\mu\text{l}$  der Proben mit 950  $\mu\text{l}$  ATP-Bestimmungspuffer (5 mM  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4$ , 4 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Glycylglycin, pH 8) versetzt und in 9 ml Szintillationsgefäße überführt. Die Zugabe der Luciferase erfolgte in Form von 50  $\mu\text{l}$  Glühwürmchen-Laternen-Extrakt (nach Herstellerangaben komplementiert). Die Lichtemissionen wurden mit einem LS 6500 Liquid Scintillation Counter (Beckman Coulter, Brea, USA) detektiert, wobei das vorinstallierte Programm zur Messung von Tritium ( $^3\text{H}$ ) mit einem Messzeitraum von 0,2 min und einem Energiefenster von 0 – 1000 verwendet wurde. Da der verwendete Szintillationszähler über eine Koinzidenzschaltung verfügte, waren die ermittelten Emissionsereignisse proportional zum Quadrat der ATP-Konzentration. Als Referenz diente dabei eine erstellte ATP-Kalibrierkurve mit bekannten ATP-Konzentrationen.

### 3.4 Biochemische Methoden

#### 3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach der Methode von Bradford, 1976. Bei dieser Methode wird sich die Eigenschaft von Coomassie Brilliant Blue G-250 zu Nutze gemacht, bei niedrigen pH-Werten mit hydrophoben und kationischen Seitenketten von Proteinen zu komplexieren, wodurch sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm nach 595 nm verschiebt. Die Absorption ist dabei proportional zur Bildung des Farbstoff-Seitenketten-Komplexes, weswegen man mit Coomassie Brilliant Blue G-250 die Proteinkonzentrationen von Lösungen photometrisch bei 595 nm bestimmen kann. Hierfür wurden 20 µl Proben mit 980 µl Bradford-Reagenz (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt und für 10 min bei RT und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die jeweilige Absorption bei 595 nm ( $A_{595}$ ) in Plastikkuvetten mit 1 cm Schichtdicke in einem Photometer (Helios-Epsilon, Thermo Scientific, Waltman, USA) bestimmt. Anhand der Geradengleichung einer Kalibriergeraden, die mit Hilfe bekannter Rinderserumalbumin (BSA)-Konzentrationen ( $0 - 1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) erstellt wurde, konnte die  $A_{595}$  der Proben in die jeweiligen Proteinkonzentrationen umgerechnet werden.

#### 3.4.2 Carbonatbestimmung von menschlichen Feces

Zur Bestimmung der Carbonatkonzentrationen von menschlichen Feces wurden frische Stuhlproben (20 g) mit Hilfe eines Trichters in 120 ml Serumflaschen gefüllt und mit 20 ml  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  homogenisiert. Es folgte eine pH-Wert-Messung der verdünnten Stuhlprobe mit pH-Teststreifen, bevor die Serumflaschen mit Butyl-Gummistopfen verschlossen wurden. Mit Hilfe einer Spritze wurden 2 ml HCl (6 M) in die verschlossenen Serumflaschen transferiert, wodurch es zu einer starken Ansäuerung der Probe und einer daraus resultierenden Umwandlung von gebundenem  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CO}_2$  kam. Durch die Freisetzung des  $\text{CO}_2$  entstand ein Überdruck in den Serumflaschen, der mittels Gas-dichter Glasspritze quantifiziert wurde. Die Berechnung des  $\text{CO}_2$ -Gehalts der Proben erfolgte dann über die thermische Zustandsgleichung (Gl. 5), wobei hierfür noch der jeweilige Luftdruck und die Temperatur zum Zeitpunkt der Probennahme berücksichtigt werden musste.

Gl. 5

$$n = \frac{p \cdot V}{R \cdot T}$$

 $n$  := Stoffmenge [mol] $p$  := Luftdruck [kPa] $V$  := Überdruck-Volumen [l] $R$  := Gaskonstante (8,314 [J mol<sup>-1</sup> K<sup>-1</sup>]) $T$  := Temperatur [K]

$$c_{HCO_3^-} = \frac{n}{v}$$

 $c_{HCO_3^-}$  := HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>-Konzentration [mol l<sup>-1</sup>] $v$  := Probenvolumen [l]

Insgesamt wurden auf diese Weise Stuhlproben von neun gesunden Individuen untersucht, wobei pro Proband mindestens drei voneinander unabhängige Proben analysiert wurden.

### 3.4.3 Glycogenbestimmung

Die Quantifizierung von Glycogen in *P. copri* Zellen erfolgte nach einer Methode von Del Don *et al.*, 1994. Hierbei wurden 5 ml Proben von Kulturen von *P. copri* abzentrifugiert (6000 x *g*, 3 min, 4 °C) und die Pellets zwei Mal mit je 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen, um Medienbestandteile zu entfernen. Die Pellets wurden in 300 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> resuspendiert und mit 200 µl einer 2 %<sub>(w/v)</sub>-igen Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lsg. versetzt. Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diente in den folgenden Schritten als Co-Präzipitat, das die Ausfällung des Glycogens begünstigt (van Handel, 1965). Anschließend wurden die Zellen bei 70 °C für 10 min lysiert, die Lysate auf Eis transferiert und das Glycogen durch die Zugabe von 1 ml MeOH präzipitiert. Die Präzipitate wurden bei 12 000 x *g* für 3 min und 4 °C abzentrifugiert und die Pellets zwei Mal mit jeweils 1 ml MeOH gewaschen bis die Pellets eine weiße Farbe angenommen hatten und das ausgefällte Glycogen somit von Verunreinigungen, wie z.B. Zellresten, befreit worden war. Die Glycogen-Pellets wurden nun mit frisch angesetzten 5 ml Anthron-Reagenz (2 g l<sup>-1</sup> Anthron, 5 %<sub>(v/v)</sub> EtOH in 75 %<sub>(v/v)</sub> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) vermischt, bei 90 °C für 15 min inkubiert und anschließend sofort auf Eis abgekühlt, um die Reaktion zu stoppen. Durch die hochkonzentrierte Schwefelsäure und die Erhitzung der Proben hydrolysierten die Glycogenketten zu Glucose-Einheiten, die weiter zu Hydroxymethylfurfural (HMF) reagierten. Das Anthron bildete dabei mit dem entstandenen HMF einen blau-grünlichen Farbkomplex, welcher Licht bei einer Wellenlänge von 620 nm absorbiert. Um das umgewandelte Glycogen der Proben zu quantifizieren, wurden also die A<sub>620</sub> bestimmt und mit der Geradengleichung einer Kalibriergeraden mit definierten Glycogen-Konzentrationen (Glycogen aus Rinderleber, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) verrechnet.

### 3.4.4 Elementaranalyse von gefriergetrockneten *P. copri*-Zellen

Um die elementare Zusammensetzung von *P. copri*-Zellen zu ermitteln, wurde eine 500 ml PYG-Kultur mittels Zentrifugation (6000 x *g*, 20 min, 4 °C) bei einer OD<sub>600</sub> von 1,8 (späte



exponentielle Wachstumsphase) abgeerntet und zwei Mal mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde ü.N. bei  $-20\text{ °C}$  eingefroren und anschließend für zwei Tage lyophilisiert und mit einer Feinwaage gewogen. Die Elementaranalyse des gefriergetrockneten Zellpellets erfolgte schließlich durch das Mikroanalytische Labor Pascher (Remagen, Deutschland), wobei eine klassische CNHS-Verbrennungsanalytik durchgeführt wurde. Hierbei wird das Probenmaterial bei hohen Temperaturen verbrannt, wodurch die Verbrennungsgase  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  entstehen. Diese werden über einen Gaschromatographen aufgetrennt und mit Hilfe eines Wärmeleitfähigkeitsdetektors quantifiziert. Um außerdem den Sauerstoffgehalt des Probenmaterials zu bestimmen, wurde eine zusätzliche Verbrennung unter Sauerstoffausschluss durchgeführt, wobei der Kohlenstoff mit dem Sauerstoff der Probe zu  $\text{CO}$  reagiert. Das  $\text{CO}$  kann schließlich ebenfalls mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor gemessen werden. Anhand der Quantifizierung der Verbrennungsgase wurde die prozentuale Verteilung der Elemente von Interesse im Zellmaterial von *P. copri* bestimmt.

#### 3.4.5 Analyse von Kulturüberständen mittels HPLC

Nach der Ernte von bakteriellen Kulturen (siehe **Kapitel 3.2.7**) wurden die Kulturüberstände mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert, um den Substratverbrauch und die Endproduktbildung zu bestimmen. Die Durchführung erfolgte an einer HPLC-Anlage von Knauer (Berlin, Deutschland) mit einer Aminex-HPX-87H 300 mm x 7,8 mm Säule von Bio-Rad (München, Deutschland). Als Laufmittel diente 5 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , das mit einer Flussrate von  $0,6\text{ ml min}^{-1}$  bei  $65\text{ °C}$  eingesetzt wurde. Die Proben wurden mindestens 1:3 mit Laufmittel verdünnt, bei  $12.000 \times g$ , 2 min und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert, um mögliche Feststoffe zu entfernen, und anschließend in die Anlage appliziert. Die Glucose-Detektion erfolgte mit Hilfe eines Brechungsindexdetektor, während die fermentativen SCFAs mit Hilfe eines UV-Detektors gemessen wurden. Zur Konzentrationsbestimmung wurden Kalibriergeraden mit passenden Standards in bekannten Konzentrationen erstellt und die Signalflächen der Proben mit den jeweiligen Geradengleichungen der Standards verrechnet.

#### 3.4.6 Ausfällung von Bernsteinsäure mittels $\text{Ca}(\text{OH})_2$ unter Anwesenheit von Medienbestandteilen

Um zu überprüfen, ob Medienbestandteile von PYG und DMMG einen Einfluss auf die chemische Ausfällung von Bernsteinsäure mit Hilfe von  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  haben, wurden zunächst die Salze, Hefeextrakt und Fleischextrakt, sowie Pepton und Trypton in den Endkonzentrationen des PYG-Mediums separat angesetzt und mit 200 mM Bernsteinsäure versetzt. Die Gemische wurden anschließend sukzessiv mit einer  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Suspension ( $260\text{ g l}^{-1}$ ) auf pH 7 titriert, wobei ein weißlicher Niederschlag beobachtet werden konnte, der auf die Entstehung von unlöslichen

Calcium-Salzen zurückzuführen war. Die ausgefallten Partikel wurden im Folgenden durch Zentrifugation (1 ml Proben, 12.000 x g, 3 min, 4 °C) von der löslichen Fraktion abgetrennt. Anschließend wurde sowohl der Überstand als auch das Pellet mittels HPLC auf die Succinat-Konzentration untersucht (**Kapitel 3.4.5**). Hierfür musste zuvor das Pellet durch Ansäuerung wieder in Lösung gebracht werden, wofür 1 ml konzentrierte HCl verwendet wurde. In zwei weiteren Versuchen wurden auf gleiche Weise die Auswirkung verschiedener Hefeextrakt-Konzentrationen (0 - 10 g l<sup>-1</sup>) und Medienbestandteile von DMMG (Salze, NaHCO<sub>3</sub> und Methionin in den Endkonzentrationen des Mediums) untersucht und die Succinat-Konzentrationen in den jeweiligen Überständen und Pellets bestimmt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Wachstumsparameter von *P. copri*

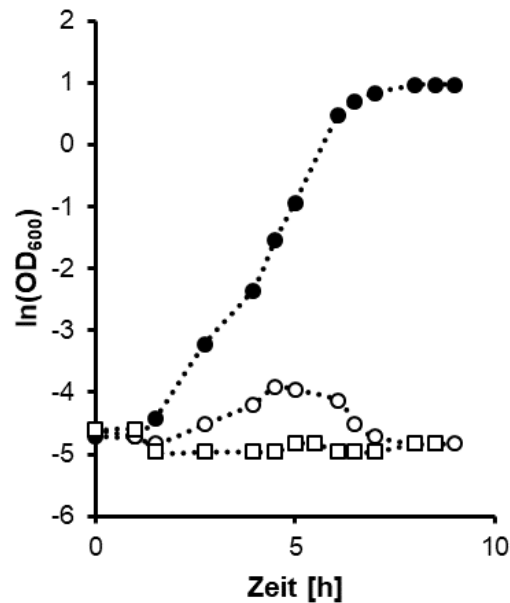
Da zu Beginn der vorliegenden Arbeit nur verhältnismäßig wenige Informationen über *P. copri* vorlagen, war es zunächst erforderlich, geeignete Kultivierungsbedingungen für die reproduzierbare Anzucht des Bakteriums zu finden. Hierfür wurden vor allem Anzuchtmethoden für im Darm lebende *Bacteroides* spp. ausgetestet, da die Gattung aufgrund ihres Verwandtschaftsgrades zu *P. copri* und der ähnlichen Lebensweise als ein geeigneter Anhaltspunkt für das Wachstumsverhalten dienen konnte (Bacic and Smith, 2008). So hängt die erfolgreiche Kultivierung von *Bacteroides* spp. z.B. von einer Supplementierung mit Vitamin K, Hämin und Vitamin B12 ab (Varel and Bryant, 1974). Vitamin K dient hierbei als Vorstufe für die Biosynthese von Chinonen und ist notwendig, da der zugehörige *de novo* Syntheseweg in *Bacteroides* spp. und generell in einem Großteil von im Darm lebenden Prokaryoten nicht vollständig vorliegt (Fenn *et al.*, 2017). Ähnliches gilt für Hämin als Vorstufe für Häm b (Gibbons and Macdonald, 1960; Sperry *et al.*, 1977). Vitamin B12 kann ebenfalls von sehr vielen Darmorganismen nicht synthetisiert werden, ist jedoch gleichzeitig für die meisten Organismen lebensnotwendig. Im Habitat „Darm“ existiert sogar ein bemerkenswerter Konkurrenzdruck um diese Ressource, sodass Vitamin B12 Mikrobiota-modulierende Eigenschaften zugesprochen werden (Degnan *et al.*, 2014). Da das Vitamin unter anderem als Cofaktor für die Methioninsynthese fungiert, und daher notwendig ist für die Produktion der essenziellen Aminosäure Methionin, kann Vitamin B12 bei einigen Darmbakterien wie *Bacteroides* spp. auch direkt durch Methionin ersetzt werden (Varel and Bryant, 1974; Degnan *et al.*, 2014; Bacic and Smith, 2008).

#### 4.1.1 Wachstum auf Komplex- und Minimalmedium

Um *P. copri* anzuziehen, wurde zunächst auf PYG als Komplexmedium zurückgegriffen, das nichtselektiv für die Kultivierung von verschiedenen anaeroben Bakterien genutzt wird; so auch für z.B. *Bacteroides* spp. (Atlas, 2010). Das Medium ist reichhaltig an verschiedenen Peptiden, Aminosäuren und Spurenelementen, enthält Glucose als weitere Kohlenstoffquelle und ist außerdem mit Kaliumphosphat pH-gepuffert.

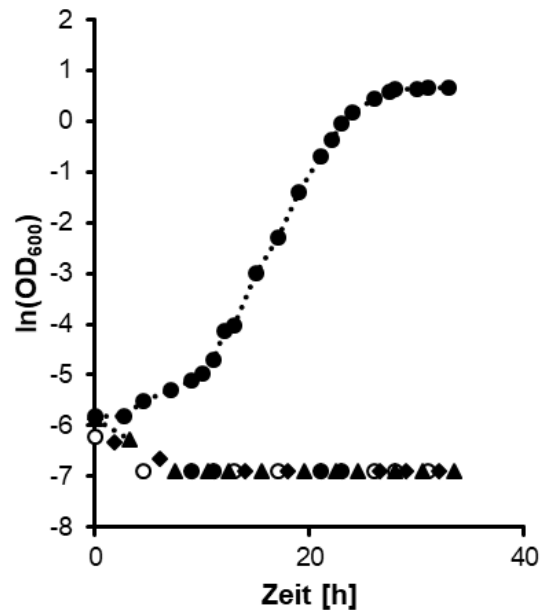
*P. copri* ließ sich gut in PYG anziehen und erreichte hier mit einer Verdopplungszeit von 40 min eine maximale OD<sub>600</sub> von 2,6 (Abb. 4). Trotz der reichhaltigen Zusammensetzung des Mediums war *P. copri* nicht in der Lage, ohne Glucose im Medium zu wachsen, was die Annahme bestätigt, dass *P. copri* kaum Peptide und Aminosäuren aus dem umliegenden Millieu verstoffwechseln kann und weitestgehend auf Saccharide spezialisiert ist. Zusätzlich benötigte

das Bakterium zum Aufbau von Biomasse eine kohlenstoffdioxidhaltige Atmosphäre, da PYG mit einer reinen N<sub>2</sub>-Begasung zu keiner sichtbaren Erhöhung der optischen Dichte führte. Der Bedarf an CO<sub>2</sub> ist dabei, wie in **Kapitel 4.2** erläutert, vermutlich hauptsächlich auf die Carboxylierung von PEP zu OAA zurückzuführen, das im Zuge der Generierung des für die Atmungskette essentiellen, terminalen Elektronenakzeptors als Zwischenprodukt gebildet werden muss.



**Abb. 4: Kultivierung von *P. copri* in PYG Medium.** Logarithmischer Wachstumsverlauf in vollständigem PYG (●), PY (○; = PYG ohne Glucose), und PYG-CO<sub>2</sub> (□; = PYG ohne CO<sub>2</sub> in der Gasatmosphäre).

Als geeignetes Minimalmedium konnte DMMG identifiziert werden, das ursprünglich für *Bacteroides fragilis* konzipiert wurde (Varel and Bryant, 1974). Da sich das Medium an den Bedürfnissen von *Bacteroides* spp. orientiert, enthält DMMG z.B. NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, welches die bevorzugte Stickstoffquelle der Gattung *Bacteroides* darstellt, und Cystein, das nicht nur als Reduktionsmittel zur Entfernung von O<sub>2</sub> sondern auch als favorisierte Schwefelquelle dient (Bacic and Smith, 2008).



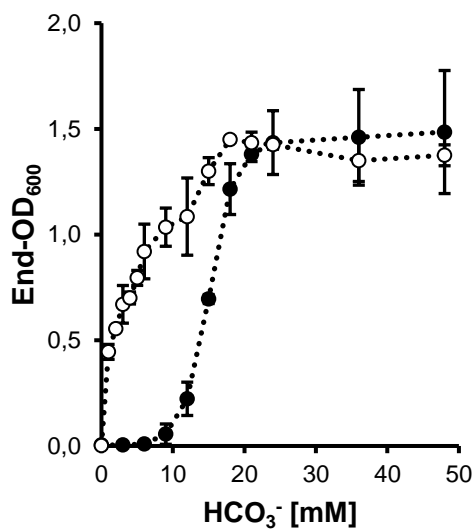
**Abb. 5: Kultivierung von *P. copri* in DMMG Medium.** Logarithmischer Wachstumsverlauf in vollständigem DMMG (●), DMMG ohne  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  (○), DMMG ohne Hämin (▲) und Medium ohne Vitamin K1 (◆).

*P. copri* wuchs in DMMG mit einer Verdopplungszeit von 2,5 h und erreichte hier eine maximale  $\text{OD}_{600}$  von 1,5 (Abb. 5). Das entsprach einem mit *B. fragilis* und *B. thetaiotaomicron* vergleichbarem Wachstumsverhalten (Bacic and Smith, 2008). Des Weiteren war *P. copri* eindeutig abhängig von Hämin und Vitamin K, da das Bakterium ohne diese Zusätze nicht in der Lage war zu wachsen. Auch die Notwendigkeit einer  $\text{CO}_2$ -haltigen Gasatmosphäre zur Anzucht des Organismus wurde für das Minimalmedium bestätigt.

Um den Effekt von  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  auf das Wachstumsverhalten von *P. copri* genauer zu untersuchen, wurde modifiziertes DMMG mit unterschiedlichen  $\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen verwendet, in dem der Organismus bis zur jeweiligen finalen optischen Dichte kultiviert wurde. Das Medium wurde hier nur mit Stickstoff begast und mit 20 mM KPP versetzt, um die ungleichmäßige Pufferwirkung verschiedener  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -Konzentrationen zu kompensieren. Zusätzlich wurden dieselben Bedingungen bei *B. vulgatus* als repräsentative Spezies der konkurrierenden Gattung *Bacteroides* ausgetestet, um einen direkten Vergleich mit *P. copri* ziehen zu können.

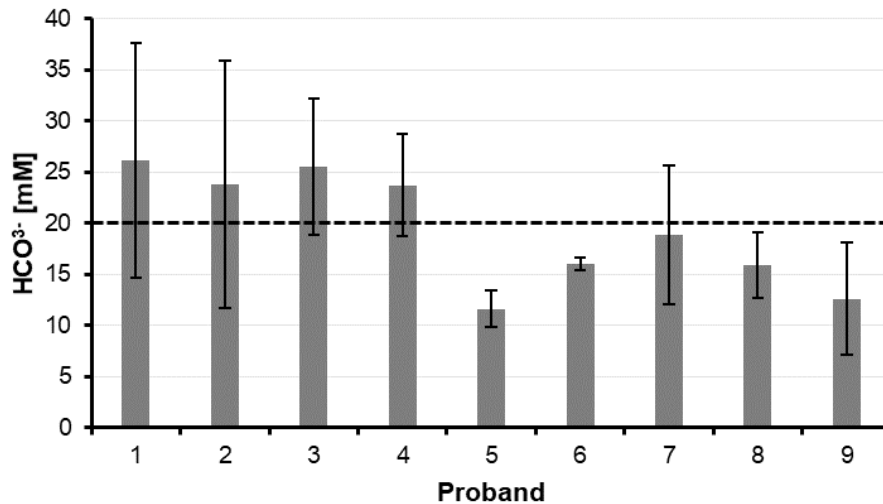
*P. copri* benötigte für das Erreichen des halbmaximalen Wachstumsertrags etwa 15 mM  $\text{HCO}_3^-$  und erreichte erst bei über 20 mM den maximalen Wert von  $\text{OD}_{600} \approx 1,5$  (Abb. 6). Im Gegensatz hierzu war der Bedarf von *B. vulgatus* an  $\text{HCO}_3^-$  deutlich geringer und das Bakterium erreichte mit nur ~10 mM den maximalen und bereits mit 3 mM  $\text{HCO}_3^-$  den halbmaximalen Wachstumsertrag. Der beachtliche Unterschied lag möglicherweise darin begründet, dass *B. vulgatus* im Zuge der Propionatbildung aus Succinat  $\text{CO}_2$  freisetzen kann, welches dann wiederum von der PEP-Carboxykinase zur Carboxylierung von PEP verwendet wird (siehe

**Kapitel 4.3)** (Caspari and Macy, 1983; Reichardt *et al.*, 2014). *P. copri* ist hierzu nicht in der Lage (siehe **Kapitel 4.2**).



**Abb. 6:** Effekt von Hydrogencarbonat auf die finale optische Dichte von *P. copri* (●) und *B. vulgatus* (○). Die Werte entsprechen der durchschnittlichen End-OD<sub>600</sub> von je drei verschiedenen Kulturen. Die Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt.

Im Kontext mikrobieller Konkurrenz innerhalb der Darmflora scheint die Konzentration von HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> somit eine mögliche, aber wenig beachtete Stellschraube zu sein. Da es nur relativ wenige Daten über die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>-Konzentration im menschlichen Gastrointestinaltrakt gibt, wurden für einen besseren Vergleich die HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentrationen in Stuhlproben von neun gesunden Individuen bestimmt (**Abb. 7**). Die durchschnittliche Konzentration lag hier bei 21±9 mM, wobei die Werte insgesamt zwischen 10 und 40 mM schwankten. Somit herrschten bei den Probanden zum Teil intestinale Bedingungen vor, in denen das Wachstum von *P. copri* aufgrund der niedrigen HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub>-Konzentrationen (weit unterhalb von 20 mM) limitiert gewesen sein dürfte.



**Abb. 7: Carbonatkonzentration in menschlichen Feces.** Dargestellt sind die arithmetischen Mittel und Standardabweichungen der ermittelten Carbonatkonzentrationen in Stuhlproben von neun gesunden Probanden. Ausgewertet wurden jeweils mindestens drei voneinander unabhängige Proben. Die Trenngerade markiert die Carbonatkonzentration, die für ein nicht-limitiertes Wachstum von *P. copri* erforderlich ist.

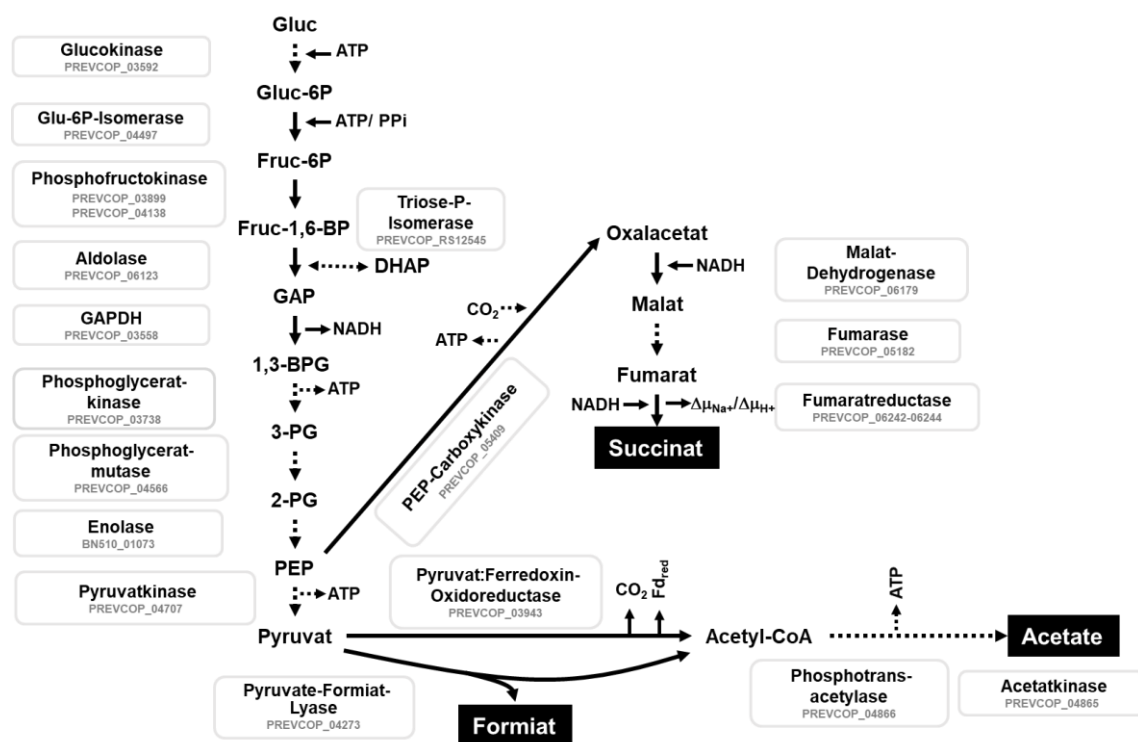
## 4.2 Der zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus von *P. copri*

### 4.2.1 Bioinformatische Analyse des Zentralstoffwechsels von *P. copri*

Insgesamt existieren nur wenige Informationen über den zentralen Energie- und Kohlenstoffstoffwechsel von *P. copri*, wobei die Informationen hauptsächlich aus *analytic profile index* (API) Analysen der Erstbeschreibung von *P. copri* stammen (Hayashi *et al.*, 2007). Daher wurde das Genom des Typ-Stamms *P. copri* DSM 18205 (NCBI BioProject: PRJNA30025) zunächst auf Gene relevanter Enzyme durchsucht, wobei die Gensequenzen von gut charakterisierten Enzymen als Referenz verwendet wurden, um mittels BLAST-Analysen die hinterlegten Nucleotiddaten von *P. copri* im Detail abzugleichen. Aus den Analysen wurde ein Stoffwechselmodell entwickelt, das im Folgenden näher beschrieben wird (**Abb. 8**).

Es stellte sich heraus, dass *P. copri* zum cytoplasmatischen Abbau von Zuckern die Schlüsselenzyme für den oxidativen Pentosephosphatweg, sowie die KDPG-Aldolase und 6-Phosphogluconatdehydrogenase des Entner-Doudoroff-Wegs fehlen. Im Gegensatz hierzu besitzt der Organismus jedoch alle Enzyme des Embden-Meyerhoff-Parnas-(EMP)-Wegs, welcher somit den zentralen Abbauweg von Zuckern in *P. copri* darstellt. Aufgenommene Glucose wird von *P. copri* folglich über eine Glucokinase (PREVCOP\_03592) phosphoryliert, über eine Glucose-6-phosphat-Isomerase (PREVCOP\_04497) zu Fructose-6-phosphat umgewandelt und schließlich durch die Aktivität einer Phosphofruktokinase ein weiteres Mal phosphoryliert, und es entsteht Fructose-1,6-bisphosphat. Interessanterweise liegen im Genom des Bakteriums zwei Gene für Phosphofruktokinasen (PREVCOP\_04138 und PREVCOP\_03899) vor, die im EMP-Weg eine Rolle spielen könnten. Dabei unterscheiden sich die beiden Enzyme

in ihrem Co-Substrat bzw. ihrer Phosphatquelle, bei der es sich entweder um PPi oder ATP handelt (persönliche Mitteilung Laura Garschagen, Institut für Mikrobiologie und Biotechnologie, Universität Bonn, 2016). Nach der Aktivierung des Zuckers durch die zwei Phosphorylierungsschritte wird Fructose-1,6-bisphosphat über die Aktivitäten einer Aldolase (PREVCOP\_06123) und einer Triosephosphatisomerase (PREVCOP\_RSI2545) letztlich zu zwei Molekülen Glyceraldehyd-3-phosphat (GAP) gespalten. Hiernach beginnen der schrittweise Abbau und der energiegewinnende Teil des EMP-Wegs. GAP wird durch eine Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; PREVCOP\_03558) zu 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) oxidiert, wobei NADH gewonnen wird. 1,3-BPG wird anschließend ATP-generierend über eine Phosphoglyceratkinase (PREVCOP\_03738) zu 3-Phosphoglycerat dephosphoryliert. Es folgen Umlagerungsreaktionen einer Phosphoglyceratmutase (PREVCOP\_04566) und einer Enolase wodurch Phosphoenolpyruvat (PEP) entsteht. Da das Gen der Enolase im Typ-Stamm *P. copri* DSM 18205 nicht aufgefunden werden konnte, und vermutlich in einer Lücke der noch fragmentiert vorliegenden Genomdaten lokalisiert ist, wurde für die BLAST-Analysen auf das Genom von *P. copri* CAG:l64 (NCBI-BioProject: PRJEB734) zurückgegriffen, welches das Gen unter der Gen-Nummer (BN510\_01073) enthält und daher in **Abb. 8** integriert wurde. Der letzte Schritt des EMP-Wegs wird schließlich durch eine Pyruvatkinase (PREVCOP\_04707) katalysiert, wobei Pyruvat und ATP entstehen.

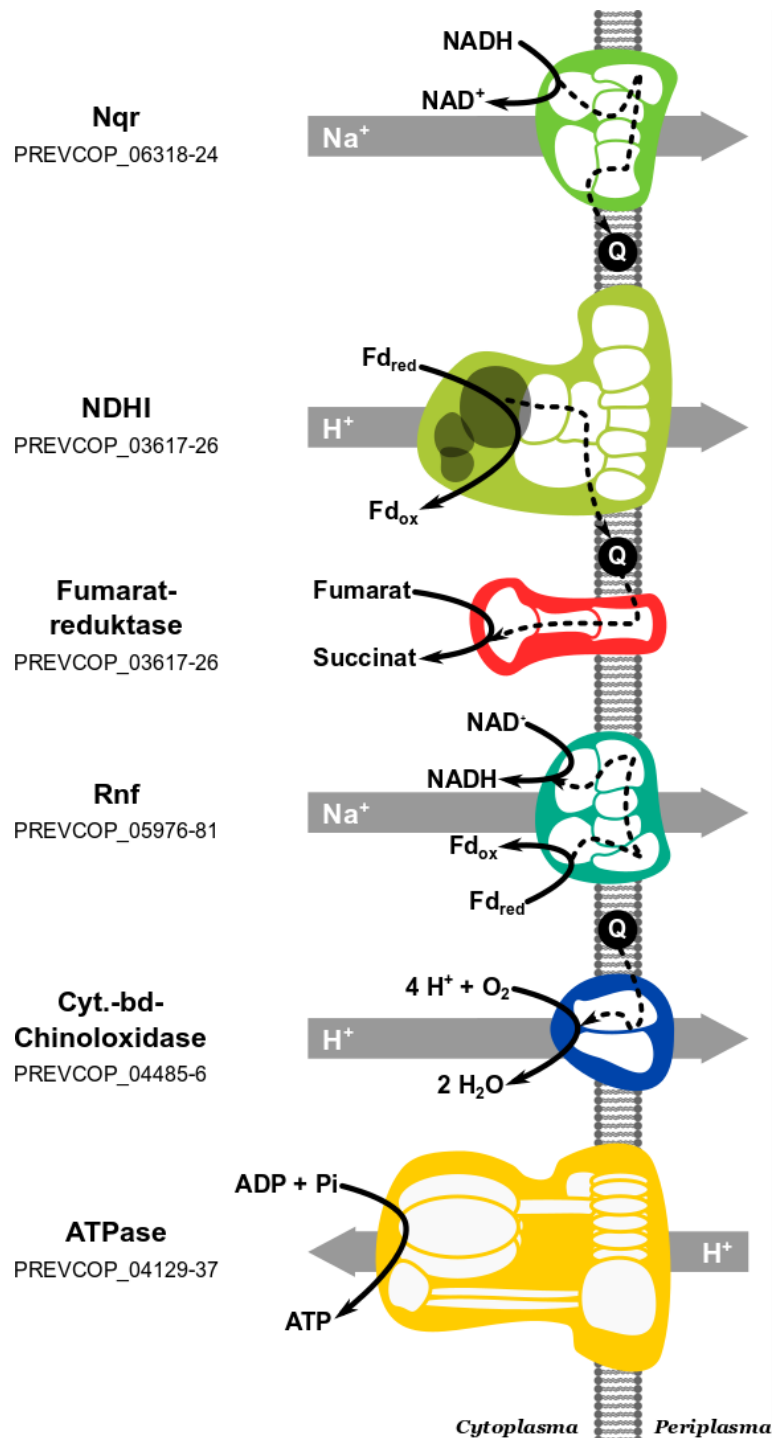


**Abb. 8:** Postuliertes Modell des Kohlenstoffmetabolismus von *P. copri* DSM 18205. Gluc = Glucose, Glu-6P = Glucose-6-phosphat, Fruc-6P = Fructose-6-phosphat, Fruc-1,6-BP = Fructose-1,6-bisphosphat, GAP = Glyceraldehyd-3-phosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat. Verändert nach Franke and Deppenmeier, 2018.



Von PEP ausgehend verzweigt sich der zentrale Stoffwechsel in zwei Äste. Der erste Ast startet mit der Carboxylierung von PEP zu Oxalacetat (OAA) durch die PEP-Carboxykinase (PREVCOP\_05409), wobei ATP generiert wird. OAA wird anschließend zu Malat reduziert und zu Fumarat umgewandelt, welches als Elektronenakzeptor für die Fumaratreduktase (PREVCOP\_06242-44) in der Atmungskette von *P. copri* dient. Dabei entsteht Succinat als terminales Produkt, da *P. copri* im Gegensatz zu *Bacteroides* spp. nicht in der Lage ist, diese Verbindung weiter zu Propionat umzuwandeln. Die Gene für die hierfür notwendigen Enzyme Methylmalonyl-CoA-Mutase, Methylmalonyl-CoA-Epimerase und Succinat-Methylmalonyl-CoA-Transferase liegen nicht im Genom von *P. copri* vor.

Der zweite Ast des Stoffwechsels startet mit der Umwandlung von PEP zu Pyruvat durch eine Pyruvatkinase (PREVCOP\_04707). Pyruvat wird zu Acetyl-CoA verstoffwechselt, was entweder über eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase (PREVCOP\_03943) oder eine Pyruvat-Formiat-Lyase (PREVCOP\_04273) geschieht. Neben Acetyl-CoA entsteht durch letzteres Enzym als Endprodukt außerdem Formiat, das in das umliegende Medium abgegeben wird. Die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase setzt wiederum CO<sub>2</sub> und reduziertes Ferredoxin frei, welches möglicherweise Elektronen für die Atmungskette von *P. copri* bereitstellt. Das bei beiden Reaktionen freigesetzte Acetyl-CoA wird schließlich über eine Phosphotransacetylase (PREVCOP\_04866) und eine Acetatkinase (PREVCOP\_04865) zu Acetat umgewandelt, was als weiteres Endprodukt im Medium akkumuliert. Zudem wird ATP gebildet.



**Abb. 9:** Postuliertes Modell der anaeroben Atmungskette von *P. copri*. Rnf = Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase, NDHI = NADH-Dehydrogenase I ohne die Untereinheiten NuoE-G, Nqr = Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon-Reduktase.

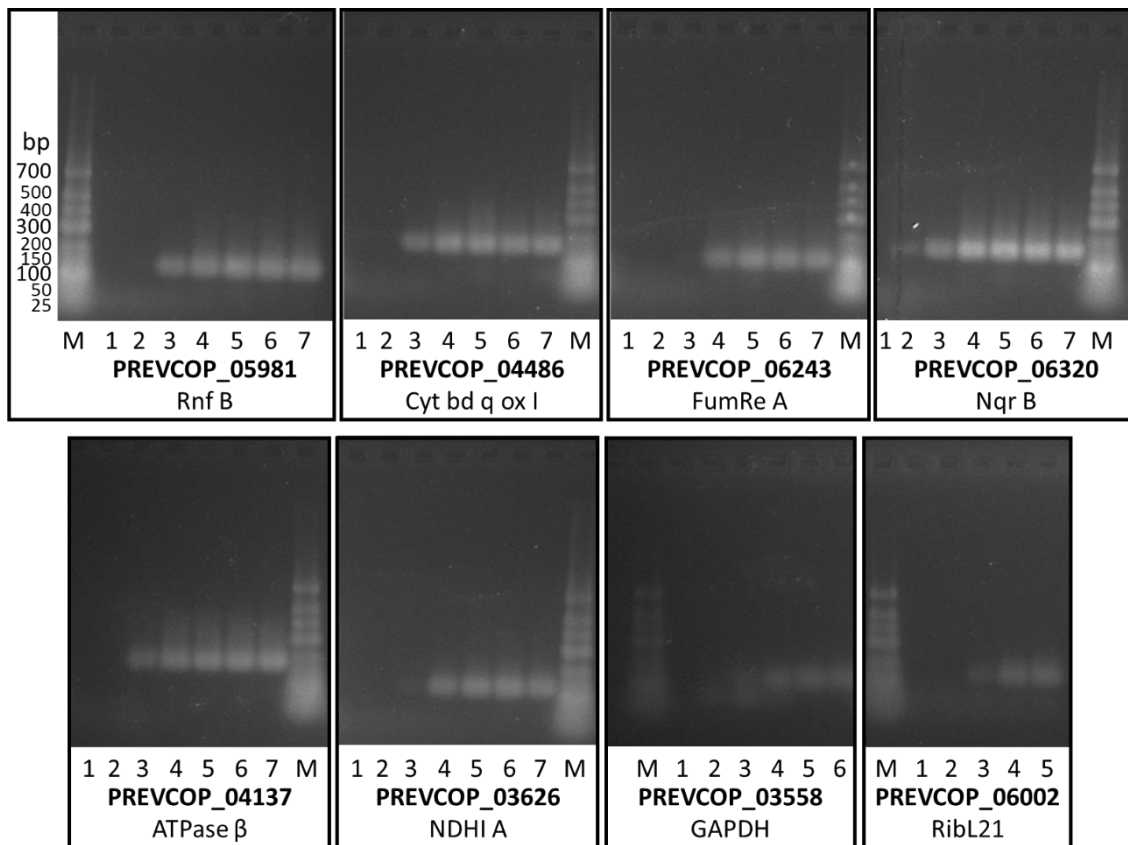
Die Atmungskette von *P. copri* besteht aus fünf Membrankomplexen, die im Genom des Organismus codiert sind (**Abb. 9**). Der erste Komplex ist eine Na<sup>+</sup>-translozierende Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase (Rnf; PREVCOP\_05976-81), der NAD<sup>+</sup> mit Hilfe von Fd<sub>red</sub> reduziert und dabei einen Na<sup>+</sup>-Gradienten ( $\Delta\mu_{\text{Na}^+}$ ) erzeugt (Biegel *et al.*, 2011; Poehlein *et al.*, 2012; Schlegel *et al.*, 2012). Der zweite Enzymkomplex ist eine NADH:Chinon-Oxidoreduktase bzw. der Komplex I der Atmungskette (NDHI; PREVCOP\_03617-26), welchem das NADH

oxidierende Modul (Untereinheiten NuoE-G) des typischen Enzyms fehlt und daher als „kopfloste“ Variante von Komplex I bezeichnet wird. Es wird angenommen, dass diese Form des Enzymkomplexes  $Fd_{red}$  statt NADH nutzt, um Elektronen in die Atmungskette zu schleusen und einen elektrochemischen  $H^+$ -Gradienten ( $\Delta\mu_{H^+}$ ) aufzubauen (Weerakoon and Olson, 2008; Kröniger *et al.*, 2016; Schuller *et al.*, 2019). Als Elektronenakzeptor fungiert wahrscheinlich Menachinon. Der dritte Komplex stellt eine  $Na^+$ -translozierende NADH:Chinon-Reduktase (Nqr; PREVCOP\_06318-24) dar, welche NADH oxidiert und die Elektronen auf Menachinon überträgt. Gleichzeitig erzeugt der Enzymkomplex ein  $\Delta\bar{\mu}_{Na^+}$  über der Membran (Steuber *et al.*, 2015). Reduziertes Menachinon wird schließlich am vierten Membrankomplex, der Fumaratreduktase (PREVCOP\_06242-4), re-oxidiert und die Elektronen auf Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor übertragen (Cecchini *et al.*, 2002). Zusätzlich enthält das Genom von *P. copri* die Gene für eine Cytochrom-bd-Chinioxidase, welche als fünfter Membrankomplex Elektronen aus dem Menachinonpool auf molekularen Sauerstoff übertragen kann. Für *Bacteroides* spp. konnte gezeigt werden, dass das Enzym unter mikroaerophilen Bedingungen zu einer Generierung von ATP und zu einem erhöhten molaren Wachstumsertrag führte (Baughn and Malamy, 2004). Es ist jedoch fraglich, inwieweit das Enzym unter physiologischen Bedingungen relevant für die Atmungskette von *P. copri* ist. Denn der einzige Bereich in einem gesunden, menschlichen Dickdarm, in welchem entsprechende Bedingungen vorherrschen, ist unmittelbar am peripheren Darmepithel, das jedoch insgesamt nur von sehr wenigen (vor allem asaccharolytischen) Organismen besiedelt wird (Donaldson *et al.*, 2016).

#### 4.2.2 Transkriptionsanalysen zum Zentralstoffwechsel von *P. copri*

Nach der Erstellung eines Modells für den zentralen Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel von *P. copri* wurden Transkriptionsanalysen durchgeführt, um die bioinformatischen Vorhersagen experimentell zu bestätigen. Hierfür wurden RNA-Präparationen von in PYG Medium exponentiell wachsenden *P. copri* Zellen durchgeführt und die jeweiligen mRNA-Konzentrationen mittels RT-qPCR und spezifischen Primern für Gene von Schlüsselenzymen des Zentralstoffwechsels bestimmt. Zusätzlich wurde eine Transkriptomsequenzierung durchgeführt, um die Transkriptabundanz sämtlicher Gene des Glucoseabbaus analysieren zu können.

Für die RT-qPCR Experimente wurden zunächst die zu verwendenden Primer auf Spezifität geprüft, wobei die Primer zusammen mit präparierter, genomischer DNA von *P. copri*, welche hier als Matrix diente, in einer typischen PCR eingesetzt wurden. Da zusätzlich nach einer passenden Hybridisierungstemperatur gesucht wurde, bei der für jedes Primerpaar ein korrektes PCR-Produkt erzielt werden kann, wurden verschiedene Temperaturen ausgetestet (**Abb. 10**).

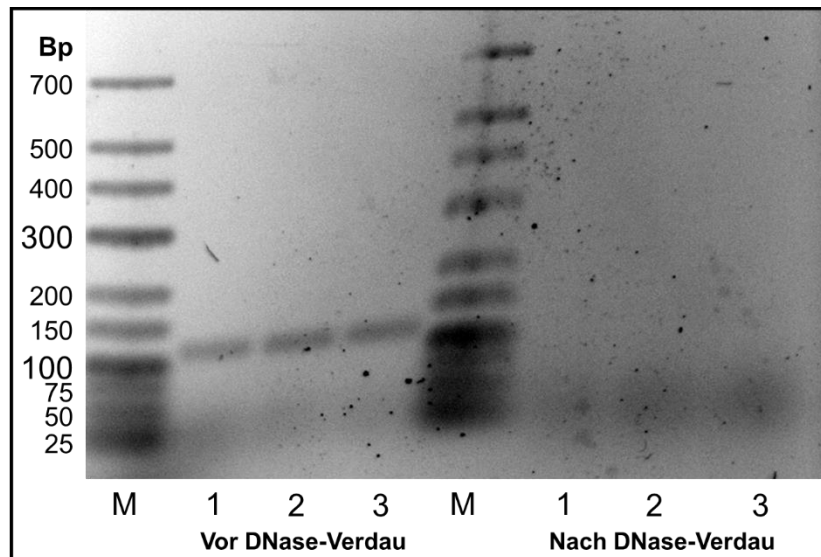


**Abb. 10: Kontroll-PCR zur Überprüfung der Spezifität der Primerpaare für die RT-qPCR zur Analyse des zentralen Stoffwechsels von *P. copri* auf RNA-Ebene.** Dargestellt sind die PCR-Produkte von acht verschiedenen Ansätzen bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen. M = Marker (GeneRuler Low Range DNA Ladder), 1-7 = Hybridisierungstemperaturen zwischen 50 und 70 °C in 2,86 °C-Schritten. Zur Übersicht sind die Nummern und zugehörigen Proteine der Ziel-Gene angegeben. Rnf B = Untereinheit B der Na<sup>+</sup>-translozierenden Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase, Cyt bd q ox I = Untereinheit I der Cytochrom-bd-Chinioxidase, FumRe A = Untereinheit A der Fumaratreduktase, Nqr B = Untereinheit B der NADH:Chinon-Reduktase, ATPase β = Untereinheit β der ATP-Synthase, NDHI A = Untereinheit A der NADH-Dehydrogenase, GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, RibL12 = Ribosomales Protein L12.

Die Ergebnisse der Kontroll-PCR zeigten, dass die Reaktionsansätze aller getesteten Primer zu jeweils nur einem einzigen PCR-Fragment führten, welches jeweils eine Größe von 100-150 Bp hatte. Da bei den getesteten Hybridisierungstemperaturen zwischen 50 °C und 70 °C im Bereich von 55 °C bei allen Primerpaaren Banden von ähnlicher Intensität im Agarosegel beobachtet werden konnten, wurde auch bei den folgenden RT-qPCR-Experimenten eine Hybridisierungstemperatur von 55 °C verwendet.

Zusätzlich zu den in **Abb. 10** überprüften acht Primerpaaren, wurden vier zusätzliche Primerpaare verwendet, um den Stoffwechsel der exponentiell wachsenden *P. copri*-Zellen auf Transkripte aller Gene der Schlüsselenzyme zu untersuchen. Die zusätzlichen Primerpaare wurden nach dem in **Kapitel 3.3.6** beschriebenen Prinzip erstellt (persönliche Mitteilung Aline Augsburg und Laura Garschagen, IfMB 2016) und dienten zur Detektion von Transkripten der Gene für die ATP- und PPI-abhängige Phosphofruktokinase, die PEP-Carboxykinase und die Pyruvat-Formiat-Lyase.

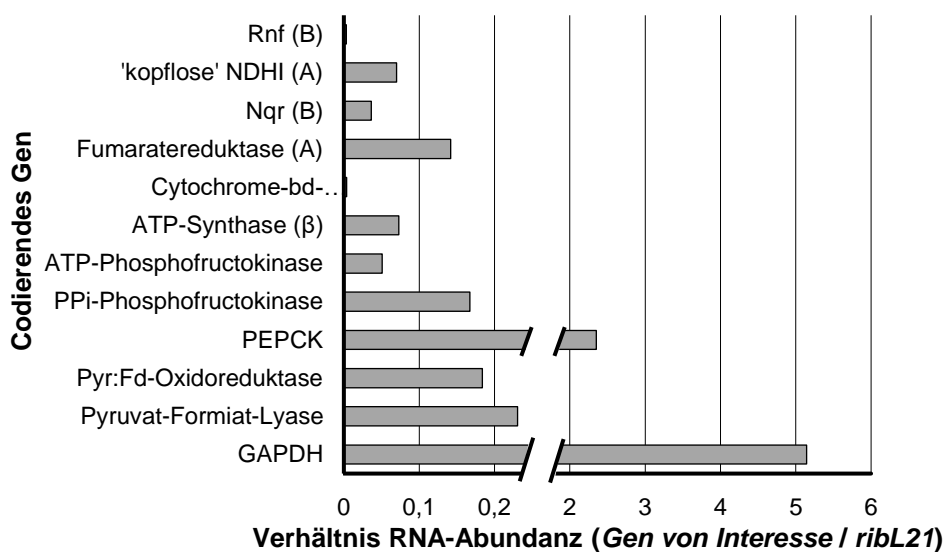
Um zu überprüfen, ob die RNA-Präparationen von DNA-Resten befreit worden waren, wurden ebenfalls Kontroll-PCRs durchgeführt. Dies war entscheidend, da Kontaminationen mit DNA die Quantifizierung der Transkripte verfälscht. Daher wurden Primer (RTqPC06002\_fw und RTqPC06002\_rev) für die RT-qPCR zusammen mit den DNase-verdauten RNA-Präparationen in einer normalen PCR eingesetzt und kontrolliert, ob die Ansätze noch zu einem PCR-Produkt führten (**Abb. II**).



**Abb. II: Kontroll-PCR nach DNase-Verdau von RNA-Präparationen aus exponentiell wachsenden *P. copri*-Kulturen.** M = Marker (GeneRuler Low Range DNA Ladder), 1-3 = RNA-Präparationen 1-3.

Es konnte gezeigt werden, dass verbliebene DNA-Reste in den RNA-Präparationen von *P. copri* durch DNase I soweit abgebaut wurden, dass keine PCR-Produkte mehr in den Ansätzen der Kontroll-PCR aufgefunden werden konnten. Entsprechend wurden die RNA-Präparationen zusammen mit den spezifischen Primern in einer ein-Schritt RT-qPCR eingesetzt, bei der eine Reverse Transkriptase in einem vorgeschalteten Inkubationsschritt die eingesetzte RNA im RT-qPCR-Ansatz in DNA umschreibt. Die Detektion und Quantifizierung der so revers transkribierten RNA erfolgte nun während jedes PCR-Zyklus mit Hilfe von SYBR Green, welches mit doppelsträngiger DNA interkaliert und einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex bildet, der wiederum in der Lage ist, blaues Licht zu absorbieren und grünes Licht zu emittieren. Da die Signalstärke des emittierten Lichts mit der in jedem Zyklus exponentiell zunehmenden DNA-Menge korreliert, konnte die relative Ausgangsmenge der Transkripte der einzelnen Gene von Interesse quantifiziert werden. Hierfür wurde ein sogenannter Schwellenwert (*threshold*) festgelegt, der die Hintergrundsignale der RT-qPCR-Ansätze von den exponentiell wachsenden Signalen während der Vervielfachung der Matrices abgrenzte. Die Zykluszahl, bei der die Signalstärke eines Ansatzes den Schwellenwert passierte, auch Ct-Wert genannt, wurde nun verwendet, um die Transkripte der Gene von Interesse in relativer Form zu quantifizieren. Als

Referenzgröße diente hierbei der Ct-Wert des Signals für die Transkriptmenge des Gens für das ribosomale Protein L21. Als Bestandteil der Ribosomen wird das Protein in der exponentiellen Wachstumsphase zu jedem Zeitpunkt benötigt, sodass auch das entsprechende Gen konstant exprimiert wird. Man zählt das Gen für L21 daher auch zu den Referenzgenen. Die relativen RNA-Level der Gene von Interesse wurden folglich mit dem RNA-Level des Referenzgens verglichen, indem zunächst die Differenz der jeweiligen Ct-Werte ( $\Delta Ct$ ) gebildet wurde. Da sich die Ct-Werte auf ein System beziehen, in dem sich die DNA-Menge pro Zyklus verdoppelt, wurden die  $\Delta Ct$ -Werte anschließend in die Formel  $2^{-\Delta Ct}$  eingesetzt, um die Verhältnisse der Transkriptmengen in eine nicht-logarithmische Darstellung umzuwandeln (**Abb. 12**).



**Abb. 12:** Verhältnis von mRNA von Schlüsselenzymgenen des zentralen Kohlenstoff- und Energiestoffwechsels von *P. copri*.  $\Delta Ct$ -Werte stellen die Differenz der jeweiligen Ct-Werte mit dem Ct-Wert des Referenzgens für das ribosomale Protein L21 (PREVCOP\_06002) dar. Für die Berechnung der Verhältnisse an mRNA wurde die Formel  $2^{-\Delta Ct}$  verwendet.

Alle Gene der Enzyme, die im modellierten Stoffwechsel von Bedeutung sind, erreichten 4-20 % der Transkriptabundanz des Referenzgens PREVCOP\_06002 (codiert das ribosomale Protein L21), womit gezeigt werden konnte, dass die Expression der Gene in exponentiell wachsenden *P. copri*-Zellen in ausreichender Form erfolgt, und somit das aufgestellte Stoffwechselmodell unterstützt wird. Im Vergleich erreichten die Gene für den Rnf-Komplex und die Cytochrombd-Chinol-Oxidase nur sehr geringe mRNA-Level, weswegen die respiratorische Funktion beider Enzymkomplexe für den generellen Energiehaushalt von *P. copri* unter den getesteten Umständen in Frage gestellt werden kann. Hingegen erreichten die Gene für die „kopflöse“ NDHI, die Nqr und die Fumaratreduktase 4, 7 und 14 % der Transkriptabundanz von L21, weswegen diese Komplexe wahrscheinlich eine zentrale Stellung in der Energiekonservierung von *P. copri* einnehmen. Interessanterweise konnten unter den getesteten Bedingungen mRNA beider Phosphofruktokinase-Gene gefunden werden, wobei das Gen der PPi-abhängigen

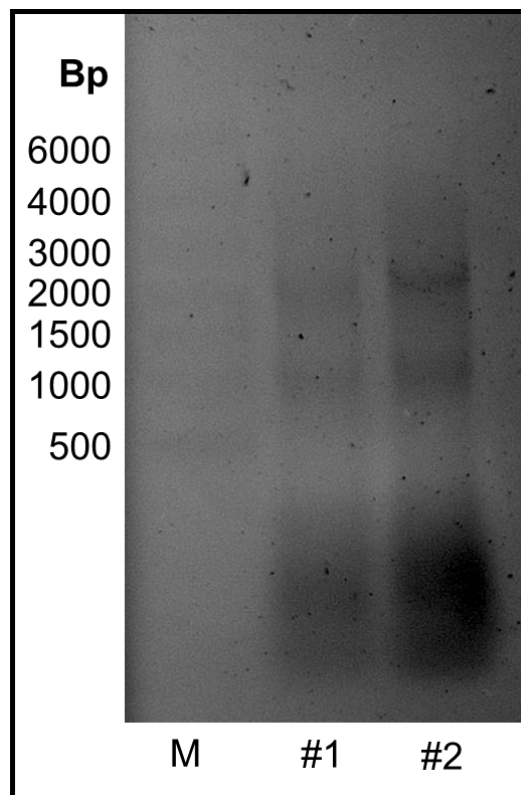
Phosphofruktokinase ungefähr zweimal so stark transkribiert vorlag wie das Gen des ATP-abhängigen Enzyms. Insgesamt zeigten die Gene für GAPDH und PEPCK die höchste Transkriptabundanz, was die Relevanz der beiden Gene für den EMP- und den Syntheseweg des terminalen Elektronenakzeptors Fumarat verdeutlicht.

Zusätzlich zu den RT-qPCR-Experimenten wurde eine Transkriptomsequenzierung durchgeführt, um alle Gene des Zentralstoffwechsels, inklusive sämtlicher Untereinheiten der Membrankomplexe auf RNA-Ebene zu quantifizieren. Hierfür mussten die RNA-Präparationen zunächst bestimmte Qualitätsstandards erfüllen, da die Sequenzierung vergleichsweise hohe Ansprüche an das Probenmaterial einfordert. Im Besonderen musste gewährleistet sein, dass die präparierte RNA in einem möglichst sauberen und intakten Zustand vorlag. Neben der obligatorischen Überprüfung auf DNA-Kontaminationen (siehe oben) wurde daher zusätzlich die Reinheit der RNA-Präparationen photometrisch bestimmt. So ließen sich Lösungsmittelverunreinigungen und Proteinkontaminationen bei 230 nm bzw. 280 nm detektieren, während Nukleinsäuren (sowohl DNA als auch RNA) bei 260 nm absorbieren. Daher konnte man anhand der Verhältnisse der  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  bzw. zu  $A_{230}$  relativ gut die Sauberkeit des Probenmaterials beurteilen. Insgesamt wurden zwei RNA-Präparationen einer Qualitätsüberprüfung für die Transkriptomsequenzierung unterzogen (Tab. 19). Die zwei Präparationen enthielten  $117,3 \mu\text{g ml}^{-1}$  bzw.  $85,4 \mu\text{g ml}^{-1}$  RNA und nur geringe Mengen Proteinkontaminationen, was vor allem durch das gute Verhältnis von  $A_{260}$  zu  $A_{280}$  von  $\geq 2$  verdeutlicht wurde. Auch ließen die photometrischen Daten auf nur geringe Konzentrationen an Lösungsmittelrückständen ( $A_{260}/A_{230} \geq 2$ ) schließen, sodass sich die Proben aufgrund dieser Aspekte für eine Transkriptomsequenzierung eigneten.

**Tab. 19: Photometrische Analyse zur Qualitätskontrolle von RNA-Präparation #1 und #2 aus exponentiell wachsenden *P. copri*-Zellen nach einem zusätzlichen Aufreinigungsschritt.**

Eigenschaft	RNA-Präparation (1:10 Verdünnung)	
	#1	#2
$A_{260}$	0,293	0,214
$A_{280}$	0,146	0,101
$A_{230}$	0,133	0,089
$A_{260}/A_{280}$	2,00	2,12
$A_{260}/A_{230}$	2,20	2,40
RNA-Konzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ]	11,73	8,54

Da es neben der Reinheit der RNA-Präparation auch auf ihre Integrität ankam, wurden die Proben in einem RNA-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, um anhand des Bandenmusters den Zustand der Präparate bewerten zu können (**Abb. 13**)



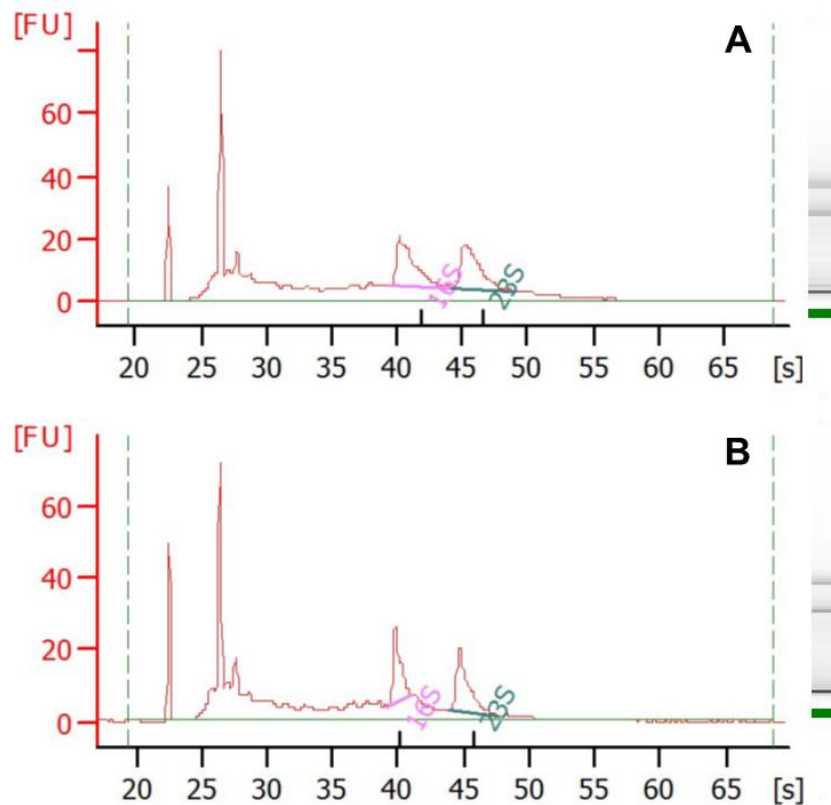
**Abb. 13:** Elektrophoretische Auftrennung der RNA-Präparationen aus exponentiell wachsenden *P. copri*-Kulturen in einem denaturierenden RNA-Agarose-Gel. M = RiboRuler high range RNA ladder (ThermoFisher Scientific), #1 = RNA-Präparation #1, #2 = RNA-Präparation #2.

Beide Präparate zeigten zwei deutliche Banden im Agarose-Gelbild, die die 23S rRNA (2894 bp) der großen Untereinheit und die 16S rRNA (1520 bp) der kleinen Untereinheit der prokaryotischen Ribosomen von *P. copri* repräsentieren. Des Weiteren konnte man ein ausgeprägtes, jedoch diffuses Signal unterhalb der 500 bp-Marke erkennen, welches vermutlich auf eine große Anzahl kleiner RNA (z.B. tRNA und sRNA), die meist zwischen 50 und 500 Nukleotide umfassen, zurückzuführen ist (Papenfort and Vanderpool, 2015; Tsai *et al.*, 2015). Aufgrund der diffusen RNA-Wolke ließ sich keine Bande für die 5S rRNA der großen ribosomalen Untereinheit identifizieren, die mit ~120 Nukleotiden in diesem Bereich zu finden wäre. Insgesamt zeigte das Gelbild eine weitgehend intakte Gesamt-RNA, da die distinkten Banden der 23S und 16S rRNA als in der Zelle massenhaft vorkommende RNA-Moleküle deutlich zu erkennen und somit höchstens geringfügig degradiert waren.

Um eine noch präzisere Aussage über den Zustand der RNA-Präparationen treffen zu können, wurden die Proben mit Hilfe einer hochauflösenden Mikrofluid-Elektrophorese (Agilent 2100 Bioanalyzer G2939A) aufgetrennt (**Abb. 14**). Hierbei wird die RNA durch Mikrokanäle einer



Polymermatrix elektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe eines interkalierenden Farbstoffs fluoreszenzphotometrisch detektiert. Aus der Retentionszeit und der Fluoreszenz werden dann Gel-ähnliche Bilder und ein Elektropherogramm von der Probe erstellt, woran wiederum die Integrität der RNA-Probe ermittelt werden kann. Hierfür dient die sogenannte *RNA integrity number* (RIN), welche mit einem Wert von 1 bis 10 die Integrität der RNA-Probe bewertet, wobei 10 einer idealen, nicht-degradierten RNA entspricht.



**Abb. 14: Elektropherogramme der Mikrofluid-Elektrophorese von zwei RNA-Präparationen aus *P. copri*.** A) RNA-Präparation 1, B) RNA-Präparation 2.

Die Elektropherogramme der RNA-Präparate zeigten im Bereich zwischen 27 s und 28 s ein Signal, welches vermutlich die 5S rRNA widerspiegelt. Im Bereich zwischen 40 s und 48 s waren die Signale der 16S und der 23S rRNA zu erkennen. Direkt vor dem 5S-Signal befand sich in beiden Proben ein starkes Fluoreszenzsignal, das vermutlich sRNA und tRNA repräsentiert, während in der sogenannten *fast region* zwischen etwa 30 s und 40 s vermutlich vor allem mRNA und Degradationsprodukte von rRNA zu finden waren. Obwohl die rRNA in der prokaryotischen Zelle über 80 % der Gesamt-RNA ausmacht (Blazewicz *et al.*, 2013), waren die Fluoreszenzsignale der 23S und 16S rRNA im Vergleich zu den Signalen der sRNAs/tRNAs kleiner, was für eine geringfügige Degradation der RNA in der Probe spricht. Zu erkennen war dies auch an dem RIN-Wert von 5,8 der Probe 2. Zwar war die Autokalkulation des Bioanalyzers nicht in der Lage die RIN für Probe 1 zu berechnen (und es existiert keine Möglichkeit zur

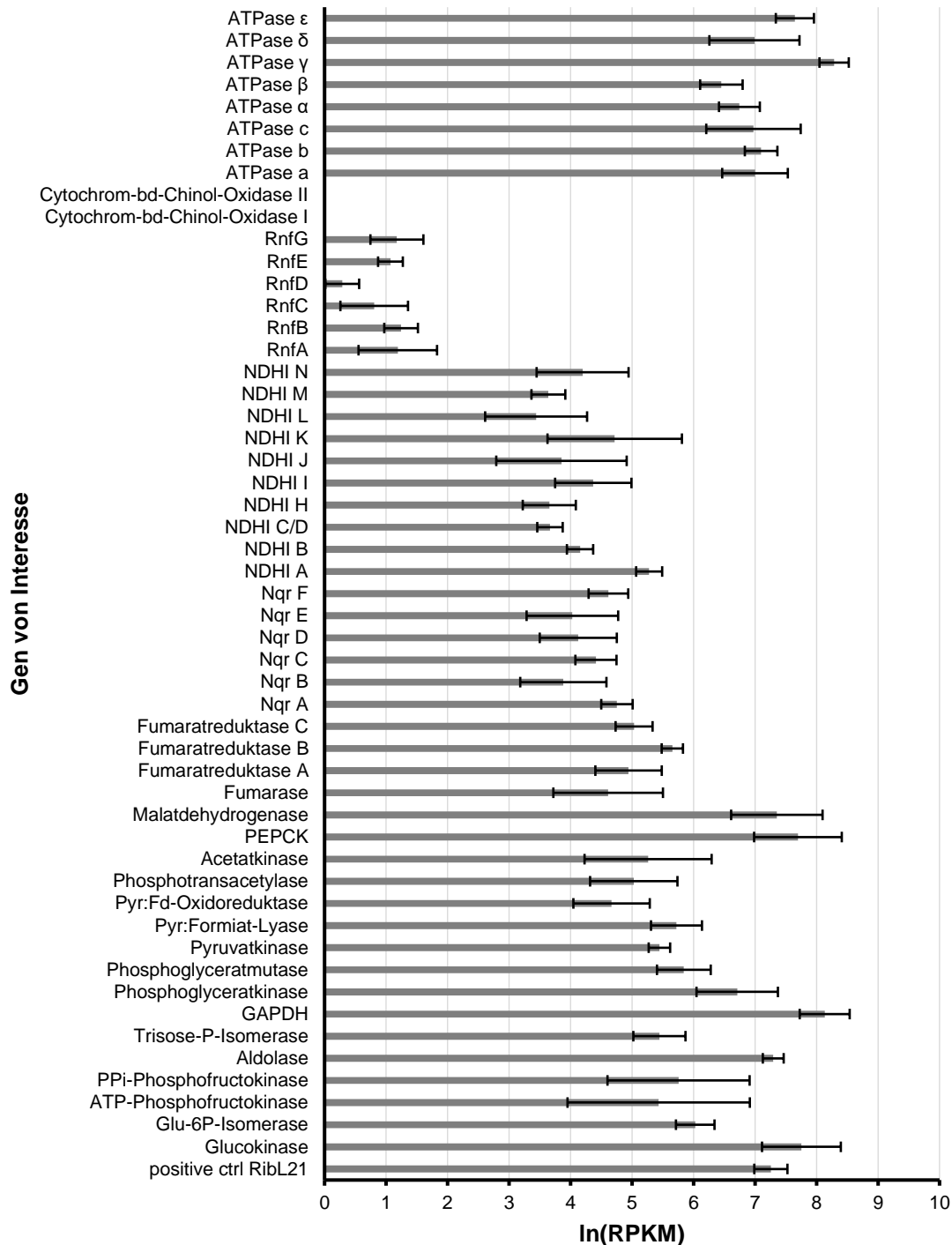
manuellen Berechnung, da Agilent den zugrundeliegenden Algorithmus unter Verschluss hält), jedoch wurde aufgrund der Peakfläche der Signale und der gesamten Erscheinung des Elektropherogramms ein ähnlicher RIN-Wert wie in Probe 2 angenommen. Insgesamt zeigten die Analysen der Mikrofluid-Elektrophorese jedoch, dass die präparierte RNA eine ausreichend gute Integrität besaß und daher für die nachfolgende Transkriptomsequenzierung genutzt werden konnte.

Die RNA-Sequenzierung erfolgte durch die Firma BGI Tech Solutions Co. Ltd. (Hongkong, China), welche die präparierte Gesamt-RNA zunächst mit Hilfe von verschiedenen Hybridisierungstechniken vorsortierte und anschließend über ein Gemisch aus zufallsgenerierten Oligonukleotiden (*random N6 primer*) und einer Reversen Transkriptase in eine cDNA-Bibliothek transkribierte. Anschließend erfolgte die Sequenzierung der cDNA-Bibliothek über sogenannte DNBseq™ (Drmanac *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017). Hierbei wurden einzelsträngige, zirkuläre cDNA-Proben vorbereitet, die über eine *rolling circle amplification* (RCA) zu einem kontinuierlichen Einzelstrang sich wiederholender Amplifikate multipliziert wurden. Diese Amplifikate ordneten sich zu etwa 300 nm durchmessenden Nanokügelchen (*DNA nanoballs; DNBs*) zusammen, die auf einem Durchfluss-Nanoarray-Chip in einem hochorganisierten Muster aufgebracht wurden (Drmanac *et al.*, 2010). Es folgte die Sequenzierung mittels Basen-spezifischer Fluorophore, die während der weiteren Amplifikation der DNBs für jeden einzelnen Punkt des Nanoarray-Chips detektiert wurden (ähnelt Illumina Sequenzierung) (Drmanac *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2017).

Mit Hilfe der Sequenzierung des gesamten Transkriptoms konnten sämtliche Gene, die im bioinformatischen Modell aufgestellt wurden, auf RNA-Ebene quantifiziert werden. Hierfür wurden alle abgelesenen RNA-Sequenzen (*reads*) mit dem Referenzgenom von *P. copri* abgeglichen und ihren jeweiligen Genen zugeordnet. Die Anzahl an *reads* eines jeden Gens wurde anschließend gegen die jeweilige Genlänge normalisiert und auf eine Größenordnung von 1 Million insgesamt erfasste *reads* bezogen. Dies ist notwendig, weil die präparierte RNA für die Sequenzierung fragmentiert werden musste, um die bestmögliche Leselänge der Sequenzierungstechnik einzuhalten. Hierdurch entstehen aber bei längeren mRNA proportional mehr *reads* als bei kürzeren mRNA, weswegen die Vergleichbarkeit der Transkripthäufigkeiten aller Gene nur mit einer entsprechenden Normalisierung gewährleistet ist. Die resultierenden *reads per kilobase per million mapped reads* (RPKM) eines jeden Gens dienen schließlich als Wert für die jeweilige Transkripthäufigkeit innerhalb des Transkriptoms von *P. copri*.

Hierbei zeigten die Daten übereinstimmend mit den RT-qPCR-Analysen mittlere bis hohe Genexpressionslevel (zwischen ~20 und ~280 % der Transkriptmenge des Referenzgens *ribL21*)

für sämtliche Gene des zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus (**Abb. 15**). Im Besonderen wiesen die Gene des gesamten EMP-Wegs und des respiratorischen Teils des Stoffwechsels (siehe auch **Kapitel 4.2.1**) zusammen mit den Genen der Untereinheiten der ATP-Synthase die höchsten Transkriptkonzentrationen auf. Die Gene der Untereinheiten der Fumaratreduktase, Nqr und der „kopflosten“ NDHI-Variante waren moderat exprimiert, während fast keine Transkripte für die Gene der Untereinheiten der Cytochrom-bd-Chinioxidase (<10 % der Transkriptmenge von *ribL21*) vorzufinden waren. Insgesamt konnten auch nur geringe Mengen RNA (<12 % der Transkriptmenge von *ribL21*) von PREVCOP\_05976-81 (Gene der Rnf-Untereinheiten) detektiert werden.



**Abb. 15: Transkriptabundanz von Genen des Energie-konservierenden Systems und des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *P. copri*.** Gezeigt ist der natürliche Logarithmus der jeweiligen RPKM Werte. Die Durchführung des Experiments erfolgte im Duplikat mit mRNA-Präparationen zwei verschiedener *P. copri*-Kulturen. Die Fehlerbalken entsprechen den jeweiligen Standardabweichungen der Duplikate.

Die Untersuchungen zeigten, dass ein funktional zusammenhängender Zentralstoffwechsel, wie er in dem Modell in **Kapitel 4.2.1** aufgestellt wurde, in *P. copri* mit Ausnahme der Cytochrom-bd-Chinoloxidase und des Rnf-Komplexes auf RNA-Ebene existiert. Somit konnte das aufgrund

von bioinformatischen Daten aufgestellte Zentralstoffwechselmodell von *P. copri* durch Daten der Transkriptionsanalysen vollständig bestätigt werden.

### 4.2.3 Untersuchungen zu Enzymaktivitäten des Zentralstoffwechsels von *P. copri* in Cytoplasma- und Membranfraktionen

Um die funktionale Aktivität der zentralen Stoffwechselwege von *P. copri* auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Enzymaktivitätsmessungen in Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri* durchgeführt. Der Übersicht halber sind die gemessenen Reaktionen zusätzlich in **Abb. 8** durch durchgezogene schwarze Pfeile gekennzeichnet.

Tab. 20: Enzymaktivitäten im Cytoplasma- und Membranfraktionen von *P. copri*.

Reaktion	Enzyme	Aktivität [U/mg Protein] <sup>a</sup>
Gluc-6-P→1,3-BPG	Gluc-6-P-Isomerase	0,56 ± 0,08
	Phosphofruktokinase	
	Aldolase	
Fruc-6-P→Fruc-1,6-BP	ATP-Phosphofruktokinase	0,16 ± 0,03
Fruc-6-P→Fruc-1,6-BP	PPi-Phosphofruktokinase	0,54 ± 0,05
GAP→1,3-BPG	GAPDH	0,25 ± 0,03
PEP→Malat	PEPCK	28,1 ± 6,5
	Malatdehydrogenase	
OAA→Malat	Malatdehydrogenase	28,1 ± 5,2
Fumarat→Succinat	Fumaratreduktase	1,77 ± 0,75
NADH→Decylchinon	Nqr	1,03 ± 0,14
Pyruvat→Acetyl-CoA + CO <sub>2</sub> + Fd <sub>red</sub>	Pyruvat:Ferredoxin-	0,6 ± 0,2
	Oxidoreduktase	

<sup>a</sup> Die Enzymaktivitäten entstammen drei unabhängigen Präparationen. Es sind die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Alle untersuchten Enzymreaktionen zeigten messbare Aktivitäten. Die gemessenen Reaktionen des EMP-Wegs wiesen dabei in der Cytoplasmafraktion Aktivitäten zwischen  $0,16 \pm 0,03$  U/mg Protein (Reaktion der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase) und  $0,56 \pm 0,08$  U/mg Protein (Reaktionen der Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Phosphofruktokinase und Aldolase) auf. Interessanterweise zeigte dabei die Reaktion der PPi-abhängigen Phosphofruktokinase eine dreimal höhere Aktivität als die ATP-abhängige Phosphofruktokinase, was zum einen mit den Ergebnissen der RT-qPCR und Transkriptomanalysen übereinstimmte und zum anderen auf eine zentrale Rolle des Enzyms im EMP-Weg hindeutete. Somit ist wahrscheinlich auch *in vivo* PPi die bevorzugte Phosphatquelle zur Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat in *P. copri*.

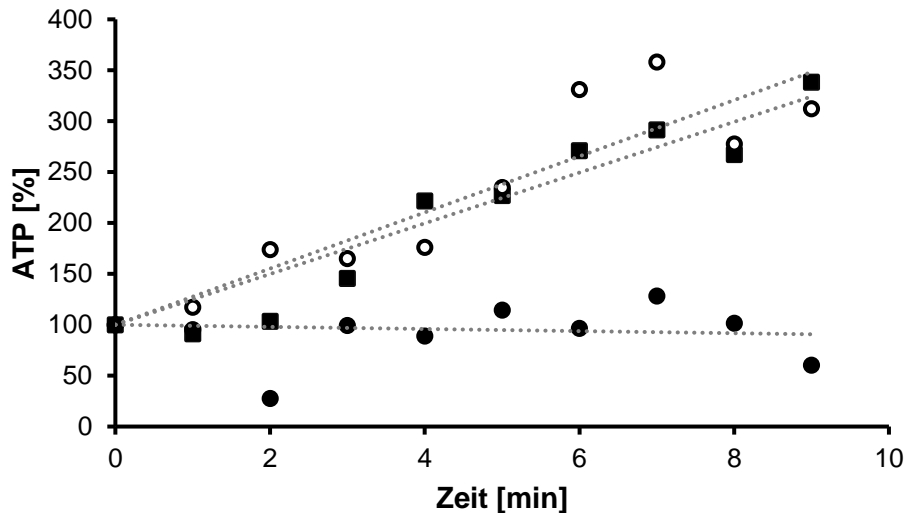
Da dennoch eine ATP-abhängige Phosphofruktokinase-Reaktion gemessen wurde, konnte die physiologische Funktion der beiden Enzyme hiermit nicht eindeutig zugeordnet werden und wird daher in **Kapitel 5.3** näher diskutiert.

Die Enzymreaktionen zur Produktion von Fumarat aus PEP (Reaktionen der PEPCK und Malatdehydrogenase) zeigten mit  $>20$  U/mg Protein die höchsten Aktivitäten in der cytoplasmatischen Fraktion von *P. copri*, was die Wichtigkeit der katabolen Prozesse für die Fumarat-Atmung des Organismus unterstreicht. In diesem Zusammenhang lagen die beiden respiratorischen Membrankomplexe Nqr und Fumaratreduktase mit Aktivitäten von  $>1000$  mU/mg Protein im selben Bereich wie vergleichbare Elektronen-Transfer-Reaktionen in Membranfraktionen von *Bacteroides (B.) amylophilus* und *B. fragilis* (Wetzstein and Gottschalk, 1985; Macy *et al.*, 1975).

Insgesamt konnte die Bedeutung der Fumaratsynthese, die auch in anderen Vertretern der Familien Prevotellaceae und Bacteroidaceae essenziell für die anaerobe Atmung ist, für *P. copri* auf Enzymebene bestätigt werden (Macy *et al.*, 1978; Wetzstein and Gottschalk, 1985; Takahashi and Yamada, 2000; Baughn and Malamy, 2003). Da im Gegensatz hierzu keine Aktivitäten des Rnf-Komplexes und der Cytochrom-bd-Chinioxidase gemessen werden konnten, spielen die beiden Enzymkomplexe unter den untersuchten, strikt anoxischen Bedingungen vermutlich keine Rolle (siehe auch die geringe Transkription der zugehörigen Gene in **Kapitel 4.2.1**). Aufgrund des fehlenden Rnf-Komplexes blieb somit nur die „kopfloose“ NDHI als möglicher Einschleusungspunkt für Elektronen von  $Fd_{red}$  in die Atmungskette von *P. copri*.

#### 4.2.4 $H^+/Na^+$ -abhängige ATP-Produktion in ruhenden Zellen von *P. copri*

Um die in **Kapitel 4.2.1** aufgestellte These zu überprüfen, dass die Energiekonservierung von *P. copri* sowohl über einen elektrochemischen Protonen- als auch Natriumionen-Gradienten verläuft, wurden ATP-Messungen an ruhenden Zellen von *P. copri* durchgeführt. Hierfür wurden Zellen von *P. copri* zunächst auf Glucose-haltigem Medium bis zur exponentiellen Wachstumsphase angezogen, geerntet, gewaschen und in einen Stabilisierungspuffer aufgenommen, der keine Kohlenstoffquelle mehr enthielt. Durch das Aushungern der Zellen gingen diese in einen basalen Erhaltungsstoffwechsel über, enthielten aber noch die Enzymausstattung der exponentiellen Wachstumsphase. Um nun die ATP-Produktion zu untersuchen, wurden der Energiestoffwechsel der Zellen durch die Zugabe von Glucose angeregt und die Zellen selektiv mit dem Protonophor SF6847 oder mit dem Natriumionophor ETH157 behandelt. Die Quantifizierung der ATP-Menge der Zellen zu bestimmten Zeitpunkten erfolgte schließlich über einen Luciferin-Luciferase-Nachweis, wobei die ATP-abhängige Lichtemission mittels Szintillationsdetektor gemessen wurde.

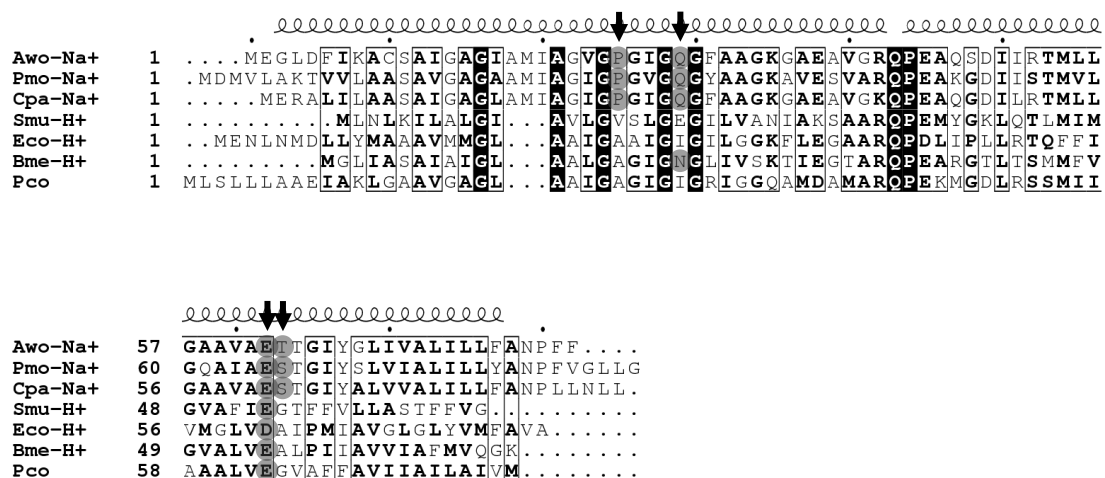


**Abb. 16:** ATP-Bildung bei ruhenden Zellen von *P. copri* nach Zugabe von Glucose. Angegeben ist die relative prozentuale ATP-Menge im Vergleich zur Ausgangsmenge (definiert als 100 %) zum Zeitpunkt der Glucose-Zugabe. Positivkontrolle (■), bei Zugabe des Protonophors SF6847 (●) und bei Zugabe des Natriumionophors ETH157 (○). Gezeigt ist der repräsentative Verlauf eines von drei Replikaten.

Es konnte gezeigt werden, dass die ATP-Menge in ruhenden Zellen von *P. copri* nach der Anregung des Energiestoffwechsels mit Glucose über den Verlauf von 10 min konstant anstieg (Abb. 16). Nach Zugabe des Protonophors SF6847 stieg die ATP-Konzentration indes nicht merklich an und schwankte im Verlauf der 10 min nur um den Anfangswert bei 0 min. Sehr wahrscheinlich kam es durch den Protonophor zu einer Entkopplung der Atmungskette, sodass der elektrochemische Protonengradient nicht mehr zur respiratorischen ATP-Produktion genutzt werden konnte (Nicholls and Ferguson, 2013). Vielmehr musste wahrscheinlich sogar ATP aus der Substratkettenphosphorylierung zur Erhaltung des  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  hydrolysiert werden (Dimroth *et al.*, 2006; Divakaruni *et al.*, 2014). Die angestrebte Erhaltung des  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  führte wahrscheinlich außerdem dazu, dass sich die Aktivität der Atmungskettenenzyme erhöhte, um dem Abbau des  $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$  durch die Translokation von  $H^+/Na^+$  entgegenzuwirken (Blaut and Gottschalk, 1984; Divakaruni *et al.*, 2014). Hierdurch wurde in den ruhenden Zellen vermutlich die Produktion von Succinat gegenüber Acetat bzw. Acetat und Formiat bevorzugt, was zusätzlich die ATP-Generierung der Substratkettenphosphorylierung senkte (siehe zum Vergleich auch Abb. 8). So führte der Einsatz des Protonophors SF6847 insgesamt dazu, dass die ATP-Bildung der ruhenden Zellen nach der Glucose-Zufuhr nicht merklich anstieg und annähernd dem Ursprungszustand entsprach. Im Gegensatz hierzu konnte kein inhibierender Effekt des Natriumionophors ETH157 auf die ATP-Produktion der ruhenden Zellen beobachtet werden, und die ATP-Konzentration stieg ebenso wie bei der Positivkontrolle im Verlauf der 10 min konstant an.

Da die respiratorische ATP-Bildung der ruhenden Zellen nur durch Zugabe des Protonophors SF6847, nicht aber durch den Natriumionophor ETH157 inhibiert wurde, war die Generierung von ATP durch die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase von *P. copri* vermutlich Protonen-abhängig. Zwar werden im Zuge der anaeroben Fumaratatmung durch die Nqr Natriumionen über die Membran transloziert, jedoch ist es denkbar, dass diese entweder durch einen Protonen-Natriumionen-Antiporter durch Protonen ausgetauscht oder anderweitig, bspw. für die Aufnahme von Nährstoffen, genutzt werden (Unemoto *et al.*, 1990; Martin, 1994). Ersteres ist in diesem Zusammenhang allerdings deutlich wahrscheinlicher, da die Nqr als zentraler Enzymkomplex vermutlich den Großteil der Elektronen in die anaerobe Atmungskette von *P. copri* einschleust (siehe auch **Kapitel 4.2.1 - 4.2.3**). Entsprechend werden die dabei translozierten Natriumionen vermutlich, wenn auch möglicherweise nur indirekt, zur Energiekonservierung genutzt.

Weil einige Vertreter der Familien Prevotellaceae und Bacteroidaceae wahrscheinlich aufgrund von Kapsel- und Zellwandstrukturen resistent gegenüber bestimmten Ionophoren sind (die Ionophoren gelangen nicht an die Cytoplasmamembran) (Russell and Houlihan, 2003), konnte zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass das Natriumionophor ETH157 seinen Wirkungsort in *P. copri* aus strukturellen Gründen nicht erreichen und daher keinen Effekt auf die ATP-Bildung der ruhenden Zellen haben konnte. Um die Ergebnisse der ATP-Messung an ruhenden Zellen zu untermauern, wurden daher Multisequenzvergleiche der Proteinsequenz der Untereinheit C (AtpE) der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase von *P. copri* (PREVCOP\_04I33) mit Sequenzen gut charakterisierter F-Typ ATP-Synthasen durchgeführt (**Abb. 17**), da man anhand des C-Rings der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase die Ionenspezifität des Enzymkomplexes ablesen kann (Mulکیدjianian *et al.*, 2008).



**Abb. 17: Multisequenzvergleich der Aminosäuresequenz von AtpE aus *P. copri* mit AtpE aus gut charakterisierten F-Typ ATP-Synthasen.** Die bekannte Sekundärstruktur von AtpE aus *Acetobacterium woodii* ist oberhalb des Alignments durch Helices angedeutet. Weiße Buchstaben auf schwarzem Grund kennzeichnen gleiche Aminosäuren, fettgedruckte Buchstaben auf weißem Grund kennzeichnen physikochemisch ähnliche Aminosäuren.



Aminosäurereste des Na<sup>+</sup>-Bindemotivs sind mit grauen Kreisen hinterlegt und durch Pfeile markiert. Awo = *Acetobacterium woodii*, Pmo = *Propiogenium modestum*, Cpa = *Clostridium paradoxum*, Smu = *Streptococcus mutans*, Eco = *Escherichia coli*, Bme = *Bacillus megaterium*, Pco = *Prevotella copri*. Na<sup>+</sup> = Na<sup>+</sup>-abhängig, H<sup>+</sup> = H<sup>+</sup>-abhängig.

Na<sup>+</sup>-F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen besitzen insgesamt vier Aminosäurereste, die das charakteristische Na<sup>+</sup>-Bindemotiv ausbilden (**Abb. 17**). Hierbei liegen jeweils zwei dieser Aminosäuren auf einer der zwei Transmembranhelices des Proteins, sodass sich die Aminosäuren bei vollständiger Faltung der *hairpin*-Struktur annähernd gegenüberliegen (Rahlfs and Müller, 1997). Zusätzlich weisen Na<sup>+</sup>-F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen einen verlängerten C-Terminus auf, welcher in den periplasmatischen Raum ragt und die Na<sup>+</sup>-Aufnahme begünstigt (Rahlfs and Müller, 1997; Mulkidjanian *et al.*, 2008). Einzelne dieser Struktureigenschaften können zwar auch bei H<sup>+</sup>-F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen vorkommen, allerdings entsteht die Natriumionenspezifität nur durch ein kombiniertes Auftreten (Rahlfs and Müller, 1997; Mulkidjanian *et al.*, 2008). Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass AtpE aus *P. copri* nur eine von vier der notwendigen Aminosäureresten und keinen verlängerten C-Terminus besitzt, weswegen davon ausgegangen werden kann, dass die zugehörige F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase ATP ausschließlich durch protonenmotorische Kraft (pmf) generiert. Inwiefern der durch die Nqr erzeugte Natriumionengradient für die Energiekonservierung von *P. copri* genutzt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Als in Frage kommende (putative) Na<sup>+</sup>:H<sup>+</sup>-Antiporter sind jedoch die Proteine der Gene PREVCOP\_04527 (CPA2-Typ Antiporter) und PREVCOP\_04139 (NhaD-Typ Antiporter) zu nennen, die in den Transkriptomanalysen (siehe auch Kapitel 4.2.2) einen RPKM-Wert von II8 bzw. III aufwiesen, und daher ähnlich stark exprimiert waren wie die Gene der membrangebundenen Enzymkomplexe der Atmungskette. Während CPA2-Typ Antiporter unter physiologischen Bedingungen normalerweise hauptsächlich dazu dienen, die pmf für den Transport von monovalenten Kationen (folglich auch Natriumionen) in die Zelle hinein zu bewerkstelligen, um z.B. den cytoplasmatischen pH-Wert unter alkalischen Bedingungen zu regulieren, transportieren NhaD-Typ Antiporter z.B. zur Osmoregulation unter Salzstress vornehmlich Protonen im Austausch für Natriumionen aus der Zelle hinaus (Krulwich *et al.*, 2009; Kurz *et al.*, 2006). Da das Gen PREVCOP\_04139, welches für einen putativen NhaD-Typ Na<sup>+</sup>:H<sup>+</sup>-Antiporter codiert, außerdem unmittelbar neben dem Gencluster der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase im Genom von *P. copri* lokalisiert ist, handelt es sich hierbei am wahrscheinlichsten um das Gen des gesuchten Antiporters. Allerdings können Na<sup>+</sup>:H<sup>+</sup>-Antiporter in Prokaryoten aufgrund von verschiedenen Regulationsmechanismen ganz unterschiedliche physiologische Funktionen einnehmen, sodass weitere Untersuchungen erfolgen müssten, um die Frage nach dem Verbleib der translozierten Natriumionen abschließend zu klären (Krulwich *et al.*, 2009; Kurz *et al.*, 2006).

#### 4.2.5 Bestimmung von Speicherstoffen und Elementaranalyse

Es ist bekannt, dass Spezies innerhalb der Abteilung Bacteroidetes Polysaccharide aus Glucose als Speicherstoffe einlagern (Lindner *et al.*, 1979; Lou *et al.*, 1997; Takahashi and Yamada, 2000). Um auch den Speicherstoffgehalt von *P. copri* für weitere Analysen zu bestimmen, wurde der Glycogengehalt von *P. copri*-Kulturen nach einer Methode von Del Don *et al.*, (1994) ermittelt. Hierfür wurden Zellen von *P. copri* lysiert und das Glycogen mit Hilfe von Natriumsulfat und Methanol aus dem Lysat gefällt und durch mehrmalige Waschschriffe von übriggebliebenen Zellbestandteilen befreit. Anschließend wurden die Oligomere durch die Zugabe von Schwefelsäure und Hitze sauer hydrolysiert, wobei die Glucose-Monomere zu Hydroxymethylfurfural dehydratisiert wurden, welches wiederum zusammen mit Anthron einen blau-grünen Farbkomplex bildeten, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen werden konnte.

Tab. 2I: Glycogenanteil in *P. copri*-Zellen aus PYG-Kulturen.

OD <sub>600</sub>	Zelltrockenmasse [mg l <sup>-1</sup> ]	Glycogen [mg l <sup>-1</sup> ]	Glycogen [%]
1,86	1044	50,47	4,83
1,98	1034	58,42	5,65
2,16	944	33,19	3,52
2,4	820	48,38	5,90
2,7	932	38,48	4,13
∞			4,81 ± 1

Zunächst wurde der Glycogengehalt von ü.N. gewachsenen *P. copri*-Kulturen in PYG-Medium bestimmt, welcher durchschnittlich knapp 5 % der Zelltrockenmasse ausmachte (Tab. 2I). Zusätzlich wurde der Glycogenanteil von Kulturen in DMMG bestimmt, wobei festgestellt wurde, dass hier der Anteil an Glycogen im Vergleich zu den Ergebnissen der PYG-Kulturen deutlich schwankte. Daher wurden weitere Kulturen in DMMG bei verschiedenen OD<sub>600</sub> (und damit unterschiedlichen Wachstumsphasen) beprobt und auf ihren Speicherstoffgehalt analysiert (Abb. 18).

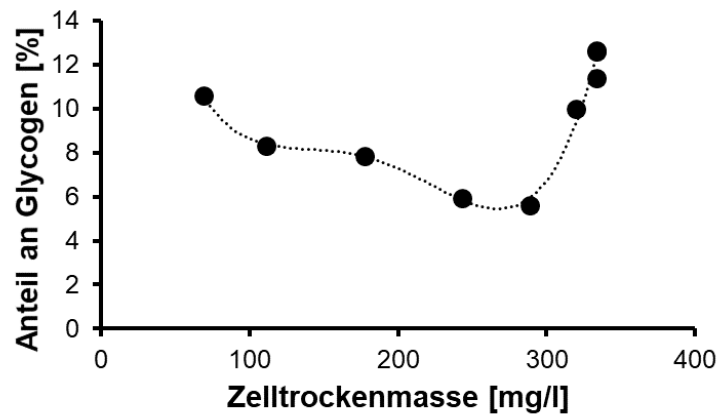


Abb. 18: Prozentualer Glycogenanteil von *P. copri* in DMMG.

Es zeigte sich, dass der prozentuale Glycogenanteil in DMMG gewachsenen Zellen nicht-proportional zur gebildeten Zelltrockenmasse verlief, sondern mit zunehmender Zellmasse der Kulturen zunächst kontinuierlich ab-, dann jedoch wieder zunahm. Es ist daher anzunehmen, dass *P. copri* abhängig von der Wachstumsphase Glycogen aufbaut bzw. verbraucht. Ein ähnlicher Effekt konnte bereits bei *P. ruminicola* gezeigt werden (Lou *et al.*, 1997). So schien das Glycogen während der exponentiellen Wachstumsphase aufgrund der noch reichhaltig vorhandenen Substrate des Mediums wenig bis gar nicht zu akkumulieren, während beim Übergang zur stationären Phase die zur Neige gehende Glucose vermutlich verstärkt als Glycogen eingelagert wurde. Dieser Vorgang ergibt im Zusammenhang mit dem menschlichen Colon als natürlichem Habitat von *P. copri* durchaus Sinn, da durch die in der Regel diskontinuierliche Nahrungsaufnahme des Menschen auch die Substrate der Darmflora nur phasenweise auftreten. Die Einlagerung von Glycogen bei drohendem Substratmangel ist somit eine geschickte Anpassung, um den Übergang bis zur nächsten Substratverfügbarkeit zu überstehen.

Zusätzlich zu der Quantifizierung des Speicherstoffs Glycogen in *P. copri* wurde lyophilisiertes Zellmaterial des Organismus einer Elementaranalyse unterzogen, wobei die enthaltenen Mengen an Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff quantifiziert wurden. Die Quantifizierung erfolgte durch klassische CNHS Verbrennungsanalytik, bei der das Probenmaterial bei hohen Temperaturen soweit erhitzt wird, dass die Verbrennungsgase  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  entstehen, welche gaschromatographisch aufgetrennt und mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor gemessen wurden. Zur genaueren Quantifizierung des Sauerstoffgehalts wurde außerdem eine Hochtemperaturpyrolyse unter Ausschluss von Luftsauerstoff durchgeführt, bei der der Sauerstoffanteil der Probe zusammen mit Kohlenstoff zu  $\text{CO}$  reagiert, welches ebenfalls mittels Wärmeleitfähigkeitsdetektor gemessen wurde. So

konnten die prozentualen Anteile der Elemente von Interesse im Zellmaterial von *P. copri* bestimmt werden (Abb. 19).

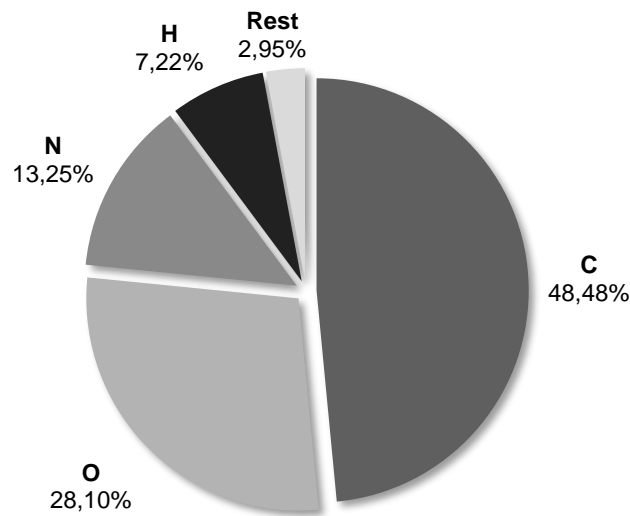


Abb. 19: Vereinfachte Elementarzusammensetzung von gefriergetrockneten *P. copri*-Zellen.

Das gefriergetrocknete Zellmaterial bestand aus 48,5 % Kohlenstoff, 28,1 % Sauerstoff, 13,25 % Stickstoff, 7,22 % Wasserstoff und einem Restanteil von 2,95 % nicht näher bestimmter Elemente. Insgesamt wies die Analyse eine mit anderen Prokaryoten vergleichbare Elementarzusammensetzung auf (Heldal *et al.*, 1996; Lawford and Rousseau, 1996; Stockar and Liu, 1999). Aus dem prozentualen Anteil der Elemente ließ sich nun anhand der jeweiligen molaren Masse eine vereinfachte Summenformel für die kleinste Einheit berechnen, aus der die Biomasse von *P. copri* in abstrahierter Form besteht:  $C_1H_{1,79}O_{0,43}N_{0,23}$ . Die Formel wurde in Kapitel 4.2.6 dazu verwendet, die Kohlenstoff- und Redoxbilanz des rekonstruierten Stoffwechsels von *P. copri* zu kalkulieren und kann zukünftig z.B. auch für die Optimierung von Kulturmedien verwendet werden.

#### 4.2.6 Kohlenstoffbilanz, Redoxbilanz und Rekonstruktion des Zentralmetabolismus von *P. copri*

Zur genaueren Untersuchung der zellinternen Prozesse und zur Rekonstruktion des Kohlenstoffflusses im Zentralstoffwechsel, wurden die fermentativen Endprodukte von *P. copri* in PYG und DMMG mittels HPLC bestimmt. In beiden Medien waren Succinat, Acetat und Formiat als einzige Endprodukte der Glucose-Fermentation zu finden, was mit dem postulierten Stoffwechselmodell und den Ergebnissen aus Kapitel 4.2.1-4.2.3 übereinstimmte.

Insgesamt wurden 18 Kulturen von *P. copri* in PYG-Medium (jeweils 50 ml) bis zu unterschiedlichen  $OD_{600}$  angezogen, die Zellen durch Zentrifugation abgeerntet und die

Überstände mittels HPLC auf die Stoffwechselendprodukte und die verbliebene Substratkonzentration hin analysiert. Parallel wurden die Zellpellets zur Bestimmung der Zelltrochkenmasse verwendet. So konnte zunächst eine eindeutige Korrelation zwischen der  $OD_{600}$  und der Zelltrochkenmasse (TG) gezeigt werden, die hier bei  $0,43 \pm 0,08$  g pro l Kultur pro  $OD_{600}$  l lag (Abb. 20).

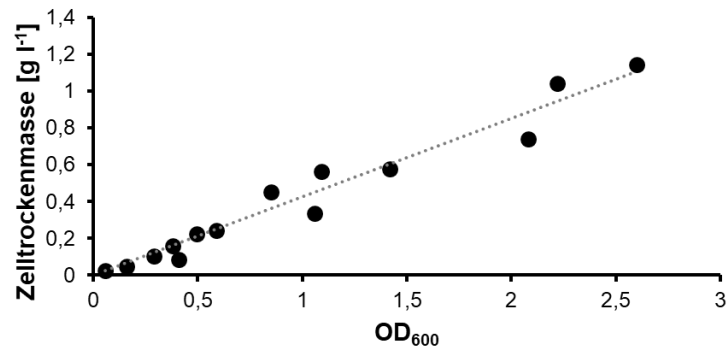


Abb. 20: Zusammenhang zwischen der Zelltrochkenmasse und der  $OD_{600}$  von *P. copri* in PYG.

In Kombination mit den Daten der HPLC-Analysen konnte der Substratverbrauch sowie die Produktbildung mit der Zelltrochkenmasse korreliert werden. So verbrauchte *P. copri* in PYG 16,8 mmol Glucose pro g TG (Abb. 21), was einem Wachstumsertrag von umgerechnet 59,6 g pro Mol verbrauchter Glucose entsprach. Gleichzeitig bildete das Bakterium 15 mmol Succinat/g TG, 15,3 mmol Acetat/g TG und 8,8 mmol Formiat/g TG.

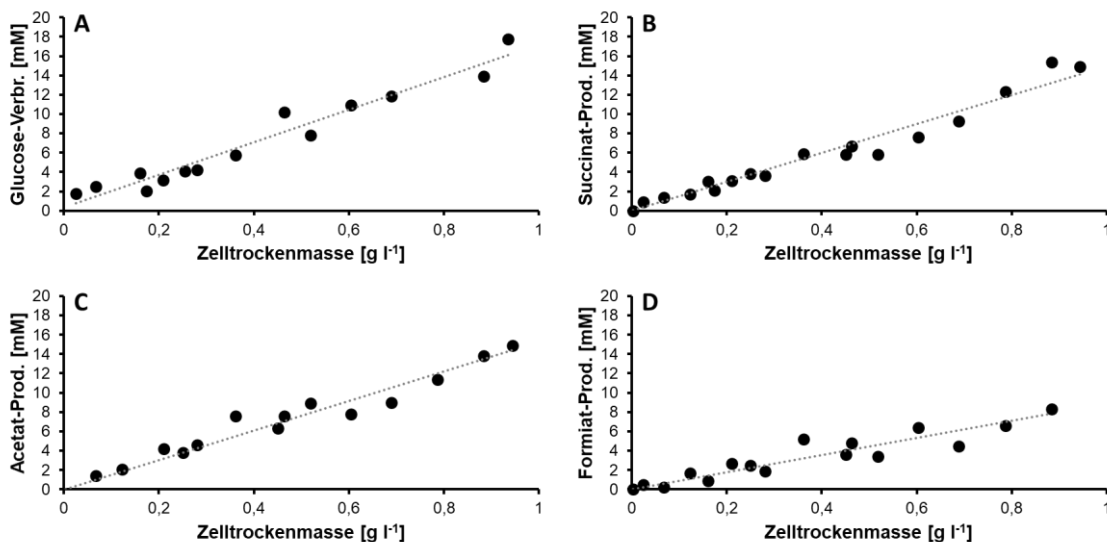


Abb. 21: Substratverbrauch und Produktbildung von *P. copri* während des Wachstums in PYG. Glucose-Verbrauch (A), Succinat-Produktion (B), Acetat-Produktion (C) und Formiat-Produktion (D).

Anhand der gebildeten Endprodukte und des Substratverbrauchs ließ sich außerdem der Fluss der Intermediate im Zentralstoffwechsel von *P. copri* zurückverfolgen (Abb. 22). Dabei zeigte sich, dass Pyruvat (15,3 mmol/g TG) als zentrales Intermediat des Stoffwechsels durch die

katalytische Aktivität der Pyruvat:Formiat-Lyase zu Acetyl-CoA und Formiat (je 8,8 mmol/g TG) oder durch die Katalyse der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> und Fd<sub>red</sub> (je 6,5 mmol/g TG) verstoffwechselt wurde. Als zweites, zentrales Intermediat konnte PEP identifiziert werden, das zu OAA carboxyliert wurde und schlussendlich in Succinat (15 mmol/g TG) mündete. Addiert man nun noch die Menge an PEP hinzu, die für die Produktion von Pyruvat verwendet wurde, entsprach die gesamte Anzahl an ursprünglich gebildetem PEP 30,3 mmol/g TG, welches letztlich auf 15,15 mmol/g TG konsumierte Glucose zurückzuführen war. Die Differenz der katabol konsumierten Glucose und der insgesamt verbrauchten Menge (16,8 mmol/g TG) ergab schließlich einen geringen Anteil von 1,65 mmol/g TG, der in anabolen Prozessen zur Generierung von Biomasse verwendet wurde. So wurden insgesamt 90,2 % der konsumierten Glucose in den Katabolismus kanalisiert, während lediglich 9,82 % in den Anabolismus flossen. Neben der Glucose inkorporierte *P. copri* außerdem 8,5 mmol/g TG CO<sub>2</sub>, die sich aus der Differenz der Decarboxylierung von Pyruvat (6,5 mmol/g TG) und der Carboxylierungsreaktion der PEP-Carboxykinase (15 mmol/g TG) ergaben. Insgesamt entwickelte sich hieraus die folgende Fermentationsgleichung (Gl. 6)

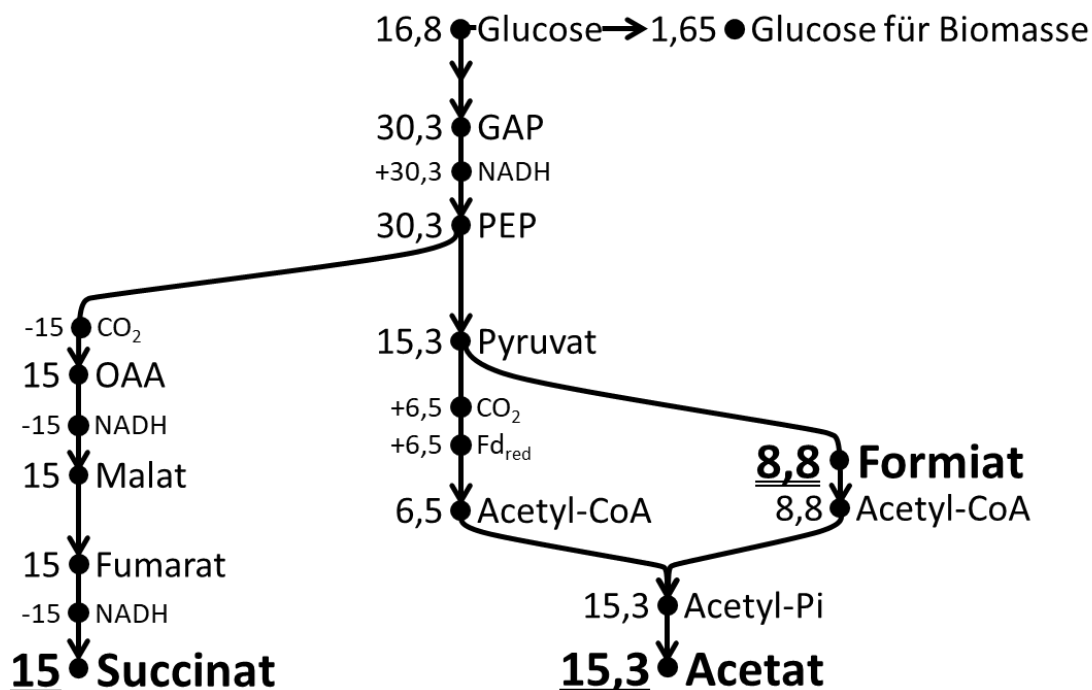
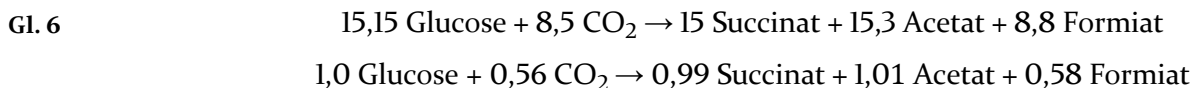


Abb. 22: Flussschema der Intermediate des zentralen C-Stoffwechsels von *P. copri* während der Verstoffwechslung von Glucose in PYG. Angegeben ist die Stoffmenge [mmol] der jeweiligen Substanz pro Zelltrockenmasse [g]. GAP = Glycerinaldehyd, PEP = Phosphoenolpyruvat, OAA = Oxalacetat, Fd<sub>red</sub> = reduziertes Ferredoxin, Pi = Phosphat.

Anhand der Rekonstruktion des Kohlenstoff-Flusses konnte ermittelt werden, dass 9,9 mmol Kohlenstoff aus der anabol konsumierten Glucose (entspricht 1,65 mmol Glucose/g TG) in die Bildung von 1 g Zelltrockenmasse flossen. Vergleicht man dies mit den Daten der Elementaranalyse (siehe **Kapitel 4.2.5**) benötigte *P. copri* bei einem Kohlenstoffgehalt von 48,5 % für die Bildung von 1 g Zelltrockenmasse 0,485 g Kohlenstoff (= 40,4 mmol). Folglich wurden nur 24,5 % des für die Zellbiomasse notwendigen Kohlenstoffs aus dem anabolen Abbau von Glucose bezogen. Da die Zellen in einem reichhaltigen Komplexmedium kultiviert wurden, kann davon ausgegangen werden, dass der restliche Bedarf an Kohlenstoff durch die Medienbestandteile (vor allem Proteine, Peptide und Aminosäuren) gedeckt wurde. Die Konsumierung der Glucose diente in PYG-Medium folglich hauptsächlich zur Generierung von Reduktionsäquivalenten und ATP.

Um eine exakte und detaillierte Auflösung des Zentralstoffwechsel während der Verstoffwechslung von Glucose zu erhalten, wurden anschließend insgesamt 35 Kulturen von *P. copri* in DMMG wie zuvor in PYG zu unterschiedlichen Wachstumsstadien geerntet, die optische Dichte bestimmt und abzentrifugiert. Die Überstände dienten der Analyse der Produkte des zentralen Stoffwechsels, während die Pellets zur Bestimmung der Zelltrockenmasse verwendet wurden.

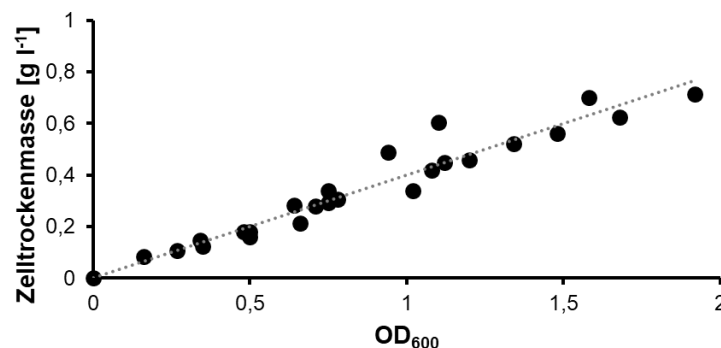


Abb. 23: Zusammenhang zwischen der Zelltrockenmasse und der OD<sub>600</sub> von *P. copri* in DMMG.

Auch hier konnte eine eindeutige Korrelation zwischen der optischen Dichte und der Zelltrockenmasse identifiziert werden, die bei  $0,40 \pm 0,06$  g pro l Kultur pro OD<sub>600</sub> l lag (Abb. 23).

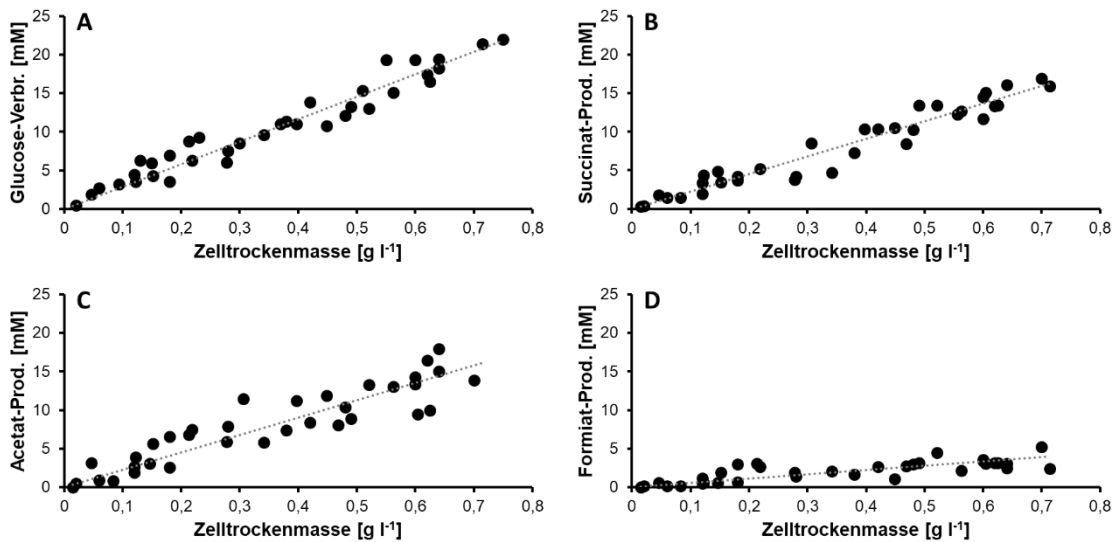


Abb. 24: Substratverbrauch und Produktbildung von *P. copri* während des Wachstums in DMMG. Glucose-Verbrauch (A), Succinat-Produktion (B), Acetat-Produktion (C) und Formiat-Produktion (D).

Insgesamt konsumierte *P. copri* in DMMG 29,1 mmol/g TG an Glucose (Abb. 24), was einem Wachstumsertrag von 34,4 g Zelltrockenmasse pro Mol verbrauchter Glucose entsprach. Dabei produzierte der Organismus etwa gleiche Mengen an Succinat (22,7 mmol/g TG) und Acetat (22,6 mmol/g TG), während mit 5,5 mmol/g TG geringere Mengen an Formiat gebildet wurden. Auch hier wurde wie zuvor anhand des Substratverbrauchs und der Produktbildung der Fluss der Intermediate im Zentralstoffwechsel von *P. copri* rekonstruiert (Abb. 25).

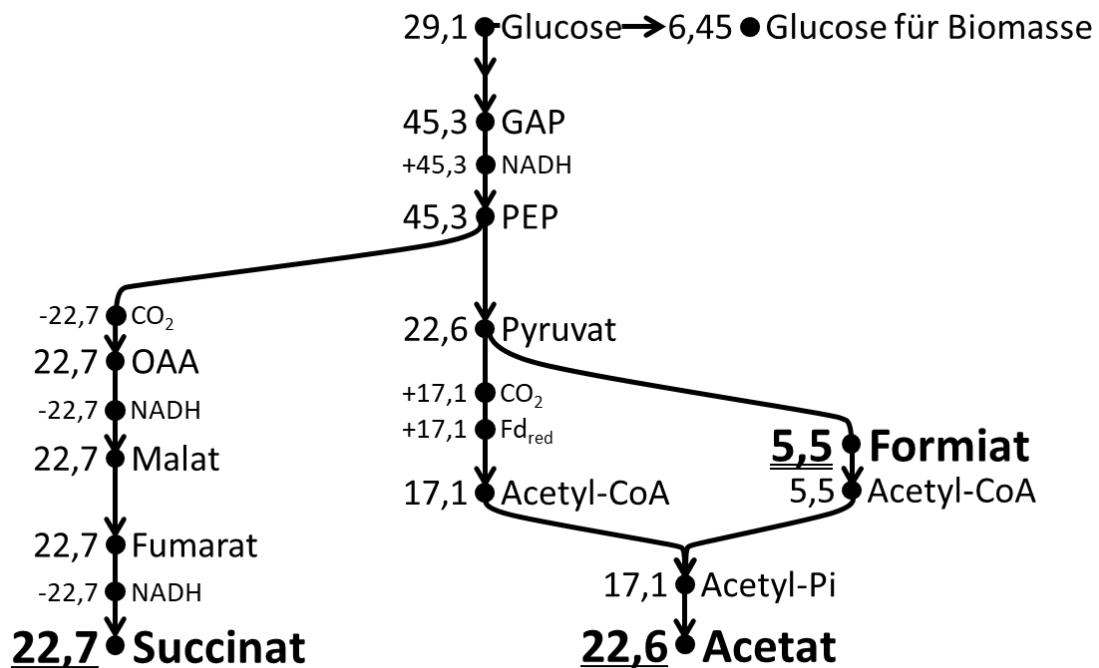
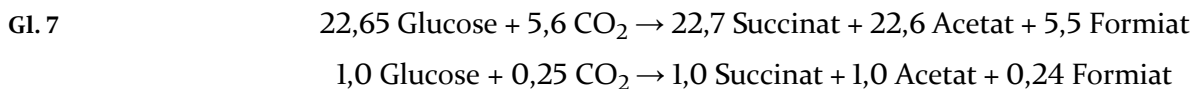


Abb. 25: Flusschema der Intermediate des zentralen C-Stoffwechsels von *P. copri* während der Verstoffwechslung von Glucose in DMMG. Angegeben sind die Stoffmenge [mmol] der jeweiligen Substanz pro Zelltrockenmasse [g]. GAP = Glycerinaldehyd, PEP = Phosphoenolpyruvat, OAA = Oxalacetat,  $Fd_{red}$  = reduziertes Ferredoxin, Pi = Phosphat.



Wie sich zeigte, wurde Pyruvat (22,6 mmol/g TG) als zentrales Stoffwechselintermediat hauptsächlich durch die katalytische Reaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase in Acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> und Fd<sub>red</sub> (jeweils 17,1 mmol/g TG) umgewandelt, während ein im Vergleich zu den Ergebnissen der PYG-Kulturen geringerer Anteil durch die Pyruvat:Formiat-Lyase in Formiat und Acetyl-CoA (je 5,5 mmol/g TG) verstoffwechselt wurde. Das zweite zentrale Intermediat PEP wurde etwa zur Hälfte zu OAA carboxyliert und mündete schließlich in Succinat (je 22,7 mmol/g TG), während die andere Hälfte in Pyruvat umgewandelt wurde. Die zusammengefasste, ursprüngliche Menge PEP entsprach folglich 45,3 mmol/g TG, die ultimativ auf 22,65 mmol/g TG katabol konsumierte Glucose zurückzuführen war. Da jedoch insgesamt 29,1 mmol/g TG Glucose verbraucht wurde, verblieb die Differenz von 6,45 mmol Glucose/g TG für anabole Prozesse zur Generierung von Biomasse. Des Weiteren wurden im Zuge des Stoffwechsels 5,6 mmol/g TG CO<sub>2</sub> inkorporiert, die sich aus der Differenz zwischen der Decarboxylierung von Pyruvat (17,1 mmol/g TG) und der Carboxylierungsreaktion der PEP-Carboxykinase (22,7 mmol/g TG) ergaben. Insgesamt entwickelte sich hieraus folgende Fermentationsgleichung (Gl. 7):



Damit benötigte *P. copri* in DMMG im Vergleich zu PYG zur Verstoffwechslung von Glucose nur weniger als die Hälfte des CO<sub>2</sub>, was vor allem auf die geringere Produktion von Formiat zurückzuführen war. Da das Pyruvat hier vermehrt durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase umgesetzt wurde, sank durch die Decarboxylierungsreaktion der Netto-Bedarf an CO<sub>2</sub>. Des Weiteren wurde insgesamt deutlich mehr Glucose konsumiert (und entsprechend mehr Endprodukte gebildet) und ein größerer Anteil der Glucose (22,7 %) floss in den Anabolismus der Zellen. Diese 6,45 mmol anabol konsumierter Glucose entsprachen dabei 38,7 mmol Kohlenstoff, die den Kohlenstoffbedarf der Zelle zur Bildung von Biomasse (40,4 mmol; siehe oben) zu 96 % abdeckten. Die restlichen 4 % stammten möglicherweise aus dem im Medium als Reduktionsmittel zur Entfernung von molekularem Sauerstoff enthaltenem L-Cystein (siehe auch **Kapitel 3.2.1** und **4.1**), das als Aminosäure neben der Glucose eine weitere, potenzielle Kohlenstoffquelle darstellte.

Neben der Kohlstoffbilanz spielt auch ein ausgeglichener Redox-Haushalt eine wichtige Rolle für das Zellwachstum und somit auch für das aufgestellte Stoffwechselmodell. Es konnte gezeigt werden, dass in DMMG 124,8 mmol/g TG Reduktionsäquivalente [H] im Zuge des katabolen Abbaus von Glucose generiert wurden (**Abb. 25**). Die Äquivalente stammten dabei in Form von

NADH und  $Fd_{red}$  aus der Umwandlung von GAP zu 1,3-BPG (45,3 mmol NADH/g TG) und der oxidativen Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA (17,1 mmol  $Fd_{red}$ /g TG). 90,8 mmol/g TG der Reduktionsäquivalente [H] (entsprechen 45,4 mmol/g TG NADH) wurden zudem bei der Reduktion von OAA zu Fumarat benötigt, sodass 34,0 mmol/g TG [H] für die Generierung von Biomasse zur Verfügung stand. Von der Elementaranalyse des Zellmaterials (siehe **Kapitel 4.2.5**) ist bekannt, dass die vereinfachte, kleinste chemische Einheit der Biomasse von *P. copri* die Summenformel  $C_1H_{1,79}O_{0,44}$  besaß und damit im Vergleich zu Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ ) in einem reduzierteren Zustand vorlag. Die Umwandlung des für den Katabolismus zur Verfügung stehenden Substrats in Zellbiomasse erforderte also bei 6,45 mmol/g TG zur Verfügung stehender Glucose die Reduktion von 38,7 mmol/g TG  $C_6H_{12}O_6$ -Einheiten in 38,7 mmol/g TG  $C_1H_{1,79}O_{0,44}$ -Einheiten. Entsprechend mussten 77,4 mmol/g TG [H]-Äquivalente der Glucose in 69,27 mmol/g TG [H]-Äquivalente umgewandelt werden, was einer Differenz von 8,13 mmol/g TG [H]-Äquivalenten entsprach (**Tab. 22**). Gleiches galt für [O]-Äquivalente, die von 38,7 mmol/g TG auf 17,03 mmol/g TG reduziert werden mussten. Da der Sauerstoff von der Zelle letztendlich in Form von  $H_2O$  entfernt werden musste, lag der Gesamtbedarf an [H]-Äquivalenten zur Entfernung von [O] bei 43,34 mmol/g TG. Mit 34 mmol/g TG [H], die durch den Katabolismus generiert wurden, und dem Überschuss von 8,13 mmol/g TG aus der Umwandlung von Glucose zu Biomasse, existierten entsprechend 42,13 mmol/g TG [H] zur Abdeckung dieses Bedarfs, was einer Redox-Bilanz von 97,2 % entsprach. Die restlichen [H]-Äquivalente stammten möglicherweise aus dem im DMMG enthaltenen Cystein.

Tab. 22: Berechnung der Redox-Bilanz für *P. copri* während der Fermentation von Glucose.

Bestandteil	[mmol/g TG]
Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>a)</sup>	6,45
C <sub>1</sub> H <sub>2</sub> O <sub>1</sub> -Einheiten <sup>b)</sup>	38,70
[H]-Äquivalente aus Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>c)</sup>	77,40
[H]-Äquivalente für Zellbiomasse (C <sub>1</sub> H <sub>1,79</sub> O <sub>0,44</sub> ) <sup>d)</sup>	69,27
Zu entfernende [H]-Äquivalente <sup>e)</sup>	8,13
[O]-Äquivalente aus Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>f)</sup>	38,70
[O]-Äquivalente für Zellbiomasse (C <sub>1</sub> H <sub>1,79</sub> O <sub>0,44</sub> ) <sup>g)</sup>	17,03
Zu entfernende [O]-Äquivalente <sup>h)</sup>	21,67
[H]-Bedarf für [O]-Entfernung (als H <sub>2</sub> O) <sup>i)</sup>	43,34
[H] aus Katabolismus <sup>j)</sup>	34,00
Summe [H] für [O]-Entfernung <sup>k)</sup>	42,13
[H]-Bilanz	97,2 %

a) Glucose<sub>Gesamt</sub>-Glucose<sub>Katabolismus</sub>

b) 6,45 mmol Glucose x 6 C-Atome

c) 6,45 mmol Glucose x 12 H-Atome

d) 38,7 C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> x 1,79

e) c) - d)

f) 6,45 mmol Glucose x 6 O-Atome

g) 38,7 C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>-Einheiten x 0,44

h) f) - g)

i) h) x 2

j) 45,3 mmol/g TG NADH aus GAP-Oxidation + 17,1 mmol/g TG F<sub>red</sub> aus Pyruvat-Oxidation - 45,4 mmol/g TG NADH für Reduktion von OAA zu Succinat (Abb. 25)

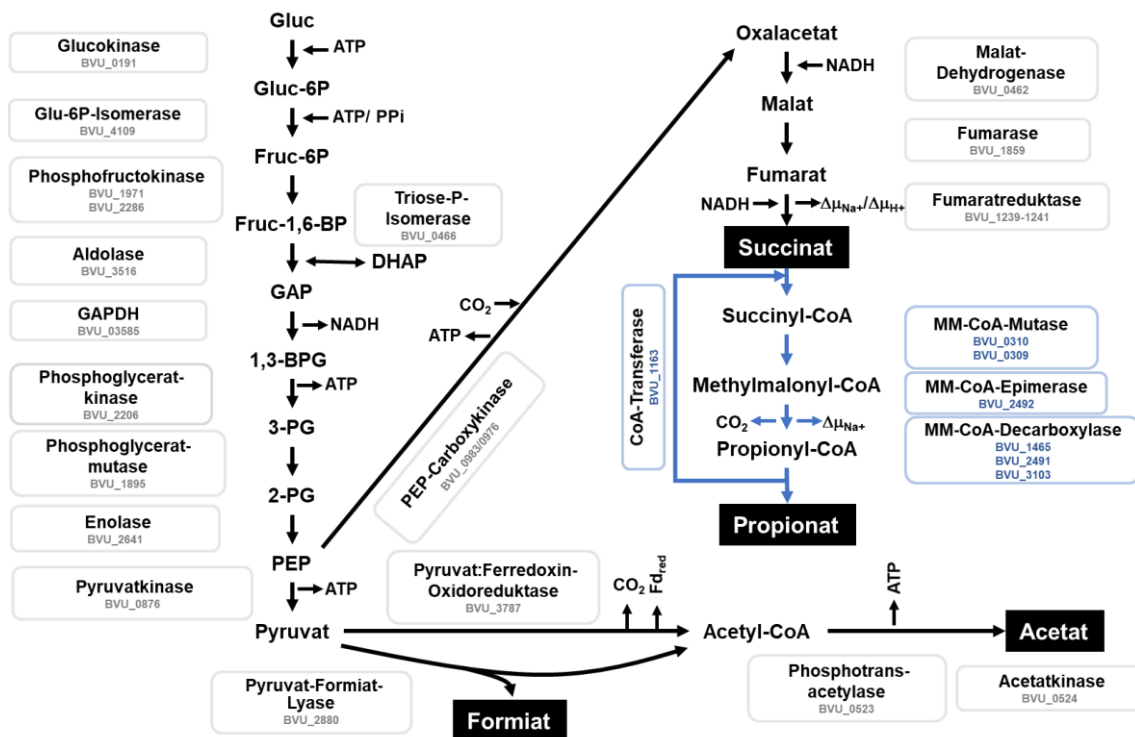
k) e) + j)

l) 42,13 x 100/43,34

### 4.3 Der zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus von *B. vulgatus* & *P. johnsonii*

#### 4.3.1 Bioinformatische Analyse des Zentralstoffwechsels von *B. vulgatus* und *P. johnsonii*

So wie in Kapitel 4.2.1 der Zentralstoffwechsel von *P. copri* bioinformatisch analysiert und aufbereitet wurde, erfolgte eine gleichartige Untersuchung für die Spezies *B. vulgatus* und *P. johnsonii*. Die Modellierung des jeweiligen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus erfolgte auch hier anhand von BLAST-Analysen mit Hilfe von Sequenzdaten gut charakterisierter Enzyme als Referenz (Abb. 26 und Abb. 27).



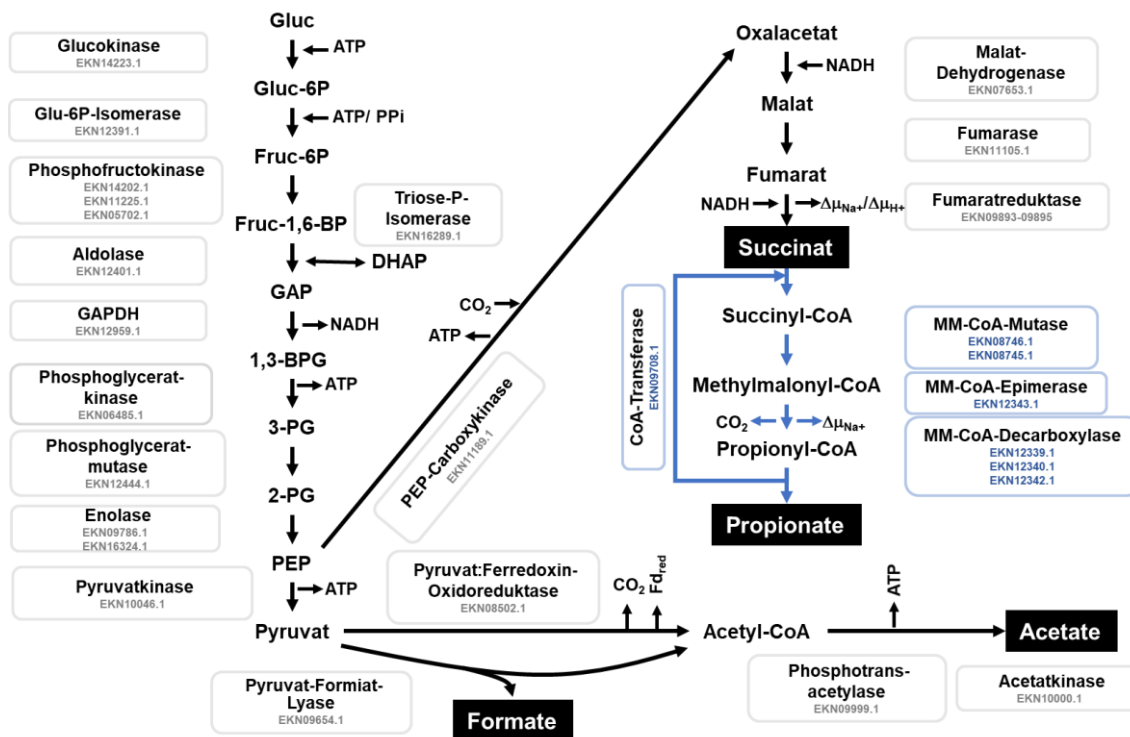
**Abb. 26: Postuliertes Modell des Kohlenstoffmetabolismus von *B. vulgatus*.** Als Referenz diente der Stamm *B. vulgatus* DSM 1447, dessen Gen-Nummern im Modell angegeben sind. Gluc = Glucose, Glu-6P = Glucose-6-phosphat, Fruc-6P = Fructose-6-phosphat, Fruc-1,6-BP = Fructose-1,6-bisphosphat, GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat.

*B. vulgatus* und *P. johnsonii* wiesen alle notwendigen Enzyme des EMP-Wegs auf. Im Gegensatz zu *P. copri* besaßen beide Spezies jedoch außerdem die Enzyme des oxidativen PPP (siehe vergleichend **Kapitel 4.2**), weswegen theoretisch die cytoplasmatische Verstoffwechslung von Zuckern bei beiden Organismen grundsätzlich sowohl über den EMP-Weg als auch über den PPP ablaufen kann. Hier sei anzumerken, dass das Gen der Transaldolase in *P. johnsonii* nicht gefunden wurde, und dass das als „Transaldolase“ annotierte Gen von *B. vulgatus* aufgrund von Sequenzhomologien wahrscheinlich eher für eine Fructose-6-phosphat-Aldolase kodiert, die im oxidativen PPP keine Funktion erfüllt (Schurmann and Sprenger, 2001). Da die Enzymaktivität der Transaldolase aber möglicherweise auch mit Hilfe der Aldolase und der PPI-PFK (siehe auch weiter unten) aus dem EMP-Weg umgangen werden kann (wird in **Kapitel 5.3** näher diskutiert), ist es wahrscheinlich, dass der oxidative PPP in einer alternativen Form in beiden Bakterien vollständig abläuft (Stincone *et al.*, 2015; Susskind *et al.*, 1982). Die Schlüsselenzyme des Entner-Doudoroff-Wegs waren in beiden Organismen nicht vorhanden.

Tab. 23: Nummern von Genen des oxidativen Pentosephosphatwegs in den Genomen von *B. vulgatus* DSM 1447 und *P. johnsonii* CLO2T12C29.

Enzym	<i>B. vulgatus</i> Gen-Nr.:	<i>P. johnsonii</i> Gen-Nr.:
Gluc-6P-Dehydrogenase	BVU_2796	EKN06516.1
6-Phosphogluconolactonase	BVU_2797	EKN06515.1
6-Phosphogluconat-Dehydrogenase	BVU_2795	EKN06518.1
Ribulosephosphat-3-Epimerase	BVU_2321	EKN05786.1
Ribulose-5-phosphat-Isomerase	BVU_2317	EKN05790.1
Transketolase	BVU_2318	EKN05789.1
Transaldolase	BVU_3333*	-*
Gluc-6P-Isomerase	BVU_4109	EKN12391.1
Aldolase	BVU_3516	EKN12401.1
Triose-P-Isomerase	BVU_0466	EKN16289.1
Fructose-1,6-bisphosphatase	BVU_2901	EKN11973.1

Interessanterweise befanden sich in den Genomen von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* wie auch in *P. copri* jeweils eine ATP-abhängige (*B. vulgatus*: BVU\_1971; *P. johnsonii*: EKN14202.1/EKN11225.1) und eine PPi-abhängige Phosphofruktokinase (*B. vulgatus*: BVU\_2286; *P. johnsonii*: EKN05702.1), die beide im EMP-Weg die Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat zu Fructose-1,6-bisphosphat durchführen können. Eine weitere mögliche Funktion der PPi-PFK wird auch in **Kapitel 5.3** diskutiert. Außerdem existieren zwei nichtidentische Gene für ATP-abhängige Phosphofruktokinasen in *P. johnsonii*. Welche physiologische Funktion hierbei von welcher der beiden ATP-PFKs im Zentralstoffwechsel von *P. johnsonii* übernommen wird, konnte anhand der bioinformatischen Analysen jedoch nicht geklärt werden.



**Abb. 27: Postuliertes Modell des Kohlenstoffmetabolismus von *P. johnsonii*.** Als Referenz diente der Stamm *P. johnsonii* CLO2T12C29, dessen Gen-IDs im Modell angegeben sind. Gluc = Glucose, Glu-6P = Glucose-6-phosphat, Fruc-6P = Fructose-6-phosphat, Fruc-1,6-BP = Fructose-1,6-bisphosphat, GAP = Glyceraldehyd-3-phosphat, DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, 1,3-BPG = 1,3-Bisphosphoglycerat, 3-PG = 3-Phosphoglycerat, 2-PG = 2-Phosphoglycerat, PEP = Phosphoenolpyruvat.

Die Modelle der Zentralstoffwechsel von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* zeigten, dass die Verstoffwechslung von Glucose ausgehend vom EMP-Weg und/oder PPP in beiden Organismen zunächst (analog zu *P. copri*) in PEP mündet, wo sich der jeweilige Stoffwechsel in zwei Wege aufteilt (Abb. 26 und Abb. 27). Der erste Weg dient zur Generierung von Fumarat und wird durch die Aktivität einer PEP-Carboxykinase initiiert, die PEP zunächst zu OAA carboxyliert, wobei ATP generiert wird. OAA wird anschließend durch eine Malatdehydrogenase zu Malat reduziert. Malat wiederum wird durch die Aktivität der Fumarase dehydriert, wodurch Fumarat entsteht. Als terminaler Elektronenakzeptor der anaeroben Atmungskette von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* wird Fumarat anschließend durch die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert. Da die Genome von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* im Gegensatz zum Genom von *P. copri* (siehe vergleichend Kapitel 4.2) die Gene des Methylmalonyl-CoA-Wegs zur Produktion von Propionat besaßen (Reichardt *et al.*, 2018), kann Succinat in *B. vulgatus* und *P. johnsonii* anschließend noch weiterverwendet werden. Dies geschieht, indem Succinat zunächst über die Reaktion einer CoA-Mutase (*B. vulgatus*: BVU\_II63; *P. johnsonii*: EKN09708.1) zu Succinyl-CoA umgewandelt wird, wobei das Succinyl-CoA wiederum von einer Methylmalonyl-CoA-Mutase (*B. vulgatus*: BVU\_0309-10); *P. johnsonii*: EKN08745-6.1) zu (R)-Methylmalonyl-CoA umgelagert wird. Mit Hilfe einer Methylmalonyl-

CoA-Epimerase erfolgt dann ein Rekonfiguration des (R)-Methylmalonyl-CoA zu (S)-Methylmalonyl-CoA, welches anschließend durch einen membranständigen Enzymkomplex, der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase (*B. vulgatus*: BVU\_1465/2491/3103; *P. johnsonii*: EKN12339.1/12340.1/12342.1), zu Propionyl-CoA decarboxyliert wird. Dabei entsteht CO<sub>2</sub> und es werden Natriumionen über die cytoplasmatische Membran transloziert, wodurch der Komplex wahrscheinlich zusätzlich einen Beitrag zur Energiekonservierung leistet. Die Decarboxylierung hat dabei außerdem den Vorteil, dass das freigesetzte CO<sub>2</sub> den CO<sub>2</sub>-Bedarf der PEP-Carboxykinase im Zuge der Fumarat-Produktion äquivalent kompensiert (ein möglicherweise hieraus resultierender Effekt ist in **Abb. 6** zu erkennen).

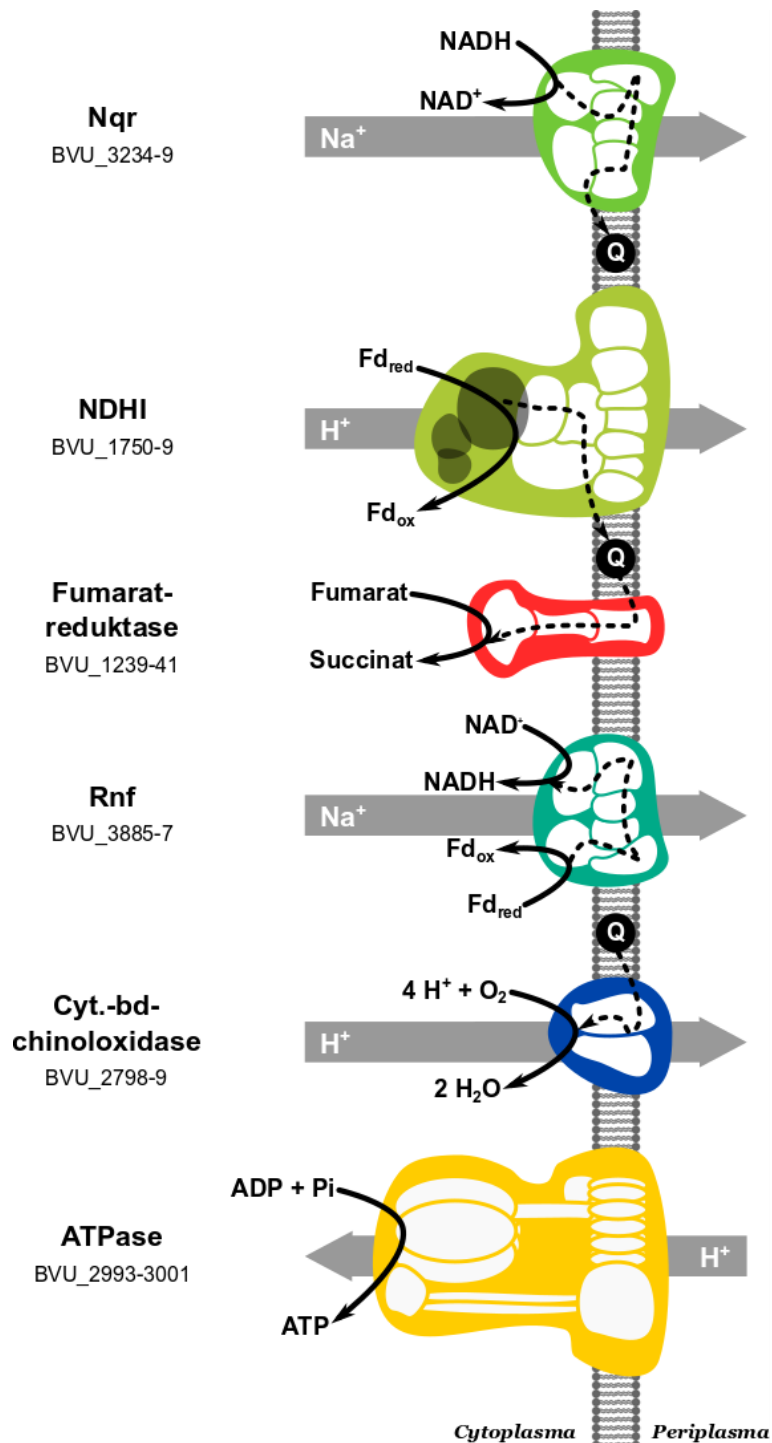


Abb. 28: Postuliertes Modell der anaeroben Atmungskette von *B. vulgatus*. Rnf = Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase, NDHI = NADH-Dehydrogenase I ohne die Untereinheiten NuoE-G, Nqr = Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon-Reduktase.

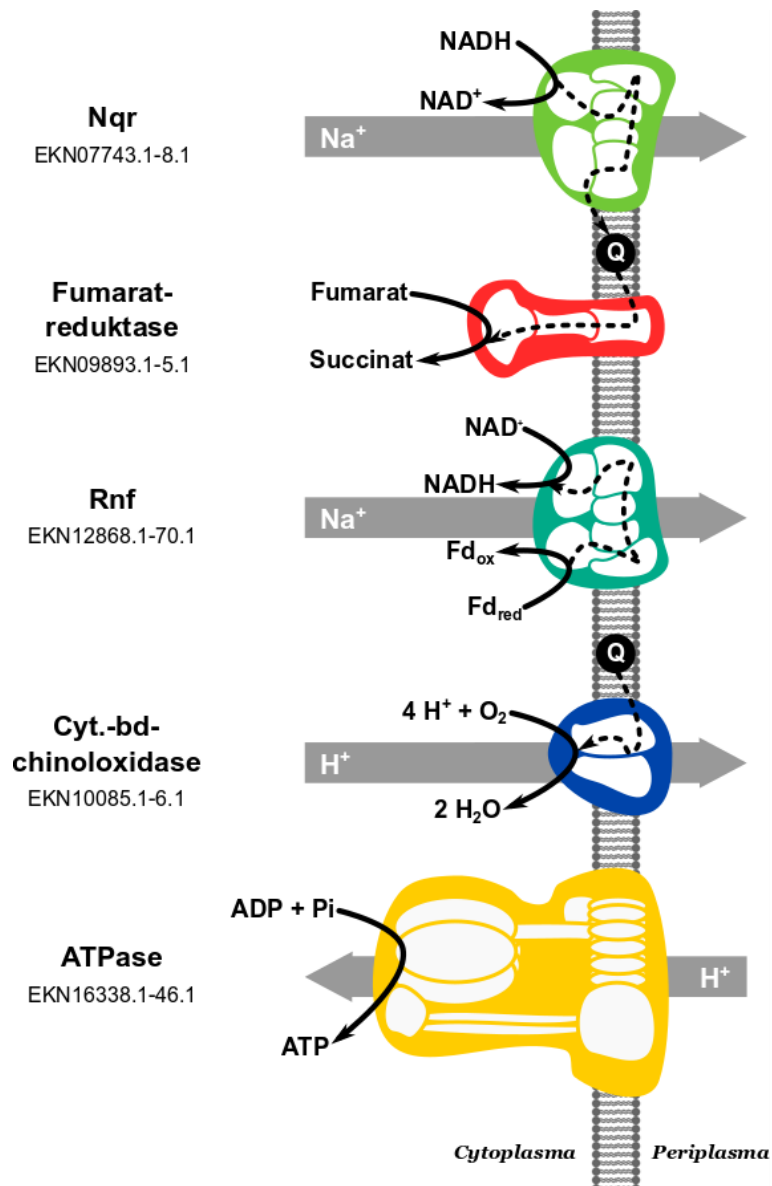
Es zeigte sich, dass die Atmungskette von *B. vulgatus* im Wesentlichen so aufgebaut ist wie die von *P. copri* (Abb. 9). Als Einschleusungspunkte für Elektronen dienen Nqr und NDHI (ebenfalls „kopflös“, siehe auch Kapitel 4.2), wobei die Elektronen letztlich durch eine Fumaratreduktase auf Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden. Zusätzlich lagen im Genom von *B. vulgatus* die Gene für eine Cytochrom-bd-Chinioxidase vor, die in *Bacteroides* spp. eventuell unter mikroaerophilen Bedingungen Elektronen auf Sauerstoff



überträgt und sich somit an der ATP-Generierung beteiligt (Baughn and Malamy, 2004). Im Gegensatz zu *P. copri* besaß *B. vulgatus* außerdem das Gen einer [FeFe]-Hydrogenase (BVU\_0347), die mutmaßlich dazu genutzt wird, überschüssige Reduktionsäquivalente ( $Fd_{red}$ ) zu recyceln, während sie molekularen Wasserstoff bildet (Wolf *et al.*, 2016). Die genaue physiologische Funktion solcher Hydrogenasen innerhalb der Bacteroidetes ist jedoch bisher nicht verstanden (Wolf *et al.*, 2016; Greening *et al.*, 2016).

Als ein wesentlicher Unterschied zu *B. vulgatus* und *P. copri* besaß *P. johnsonii* keine Gene der kopflosen NDHI (**Abb. 29**), wohingegen die Gene der Nqr, des Rnf-Komplexes und der Fumaratreduktase vorlagen. Auch die Gene der Cytochrom-bd-Chinioxidase konnten im Genom von *P. johnsonii* identifiziert werden. Somit verfügte der Organismus mit der Nqr nur über einen einzigen Einschleusungspunkt für Elektronen aus Reduktionäquivalenten des Katabolismus in die anaerobe Atmungskette. Auch hier dient Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor, welcher über die Fumaratreduktase zu Succinat reduziert wird. Alternativ kann möglicherweise Sauerstoff unter mikroaerophilen Bedingungen über die Cytochrom-bd-Chinioxidase als Elektronenakzeptor genutzt werden (siehe auch weiter oben).

Nicht auszuschließen ist, dass überschüssige Elektronen in *P. johnsonii* außerdem über eine bifurkierende Eisen-Hydrogenase (EKN07800-07802) entfernt werden, die NADH und  $Fd_{red}$  dazu nutzt, um molekularen Wasserstoff freizusetzen. Wie auch in anderen Bacteroidetes ist allerdings auch hier die physiologische Funktion nicht geklärt (Wolf *et al.*, 2016; Greening *et al.*, 2016).



**Abb. 29:** Postuliertes Modell der anaeroben Atmungskette von *P. johnsonii*. Rnf = Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase, NDHI = NADH-Dehydrogenase I ohne die Untereinheiten NuoE-G, Nqr = Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon-Reduktase.

Da sowohl *B. vulgatus* als auch *P. johnsonii* Enzymkomplexe in der Atmungskette besaßen, die Natriumionen über die Cytoplasmamembran translozieren, wurde wie schon in **Kapitel 4.2.4** für *P. copri* die Aminosäuresequenz von Untereinheit C der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* mit charakterisierten F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen verglichen, um anhand von Sequenzhomologien die Ionenspezifität des Enzymkomplexes zu bestimmen (**Abb. 30**). Es konnte gezeigt werden, dass beiden F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen drei der vier spezifischen Aminosäurereste zur Bindung von Na<sup>+</sup> fehlen, und dass die charakteristische Verlängerung des C-Terminus ebenfalls abwesend war. Anhand der Sequenzhomologien ist es daher sehr wahrscheinlich, dass die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthasen von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* ausschließlich H<sup>+</sup> zur Generierung von ATP nutzen. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass unter anaeroben

Bedingungen *B. vulgatus* nur einen und *P. johnsonii* sogar keinen einzigen Enzymkomplex in der Atmungskette besitzt, welcher H<sup>+</sup> über die Membran transloziert. Hinzu kommt, dass die Produktion von Propionat aus Succinat durch die Katalyse der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase ebenfalls Na<sup>+</sup> über die Membran transportiert. Das Schicksal des generierten  $\Delta\bar{\mu}_{\text{Na}^+}$  bleibt daher vorerst Spekulation und wird in **Kapitel 5.4** im Kontext eines möglicherweise vorhandenen Na<sup>+</sup>:H<sup>+</sup>-Antiporters näher diskutiert.



**Abb. 30: Multiple sequence alignment der Aminosäuresequenz von AtpE aus *B. vulgatus* und *P. johnsonii* mit charakterisierten F-Typ ATP-Synthasen.** Die bekannte Sekundärstruktur von AtpE aus *Acetobacterium woodii* ist oberhalb des Alignments angegeben. Weiße Buchstaben auf schwarzem Grund kennzeichnen gleiche Aminosäuren, fettgedruckte Buchstaben auf weißem Grund kennzeichnen physikochemisch ähnliche Aminosäuren. Aminosäurereste des Na<sup>+</sup>-Bindemotivs sind mit grauen Kreisen hinterlegt und durch Pfeile markiert. Awo = *Acetobacterium woodii*, Pmo = *Propiogenium modestum*, Cpa = *Clostridium paradoxum*, Smu = *Streptococcus mutans*, Eco = *Escherichia coli*, Bme = *Bacillus megaterium*, Bvu = *Bacteroides vulgatus*, Pjo = *Parabacteroides johnsonii*. Na<sup>+</sup> = Na<sup>+</sup>-abhängig, H<sup>+</sup> = H<sup>+</sup>-abhängig.

### 4.3.2 Kohlenstoff-, Redoxbilanz und Rekonstruktion des Zentralmetabolismus von *B. vulgatus* und *P. johnsonii*

Zur Rekonstruktion der zentralen Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* wurden Kulturen der beiden Spezies in DMMG in gleicher Weise wie in **Kapitel 4.2.6** beschrieben hinsichtlich des Substratverbrauchs, der fermentativen Endprodukte und der Zelltrockenmassen analysiert. Hierfür wurden die Kulturen in je 50 ml DMMG angezogen und Zellen bei unterschiedlichen OD<sub>600</sub> durch Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde anschließend für die Bestimmung der Zelltrockenmasse verwendet, während der Überstand zur Analyse von Stoffwechselendprodukten genutzt wurde.

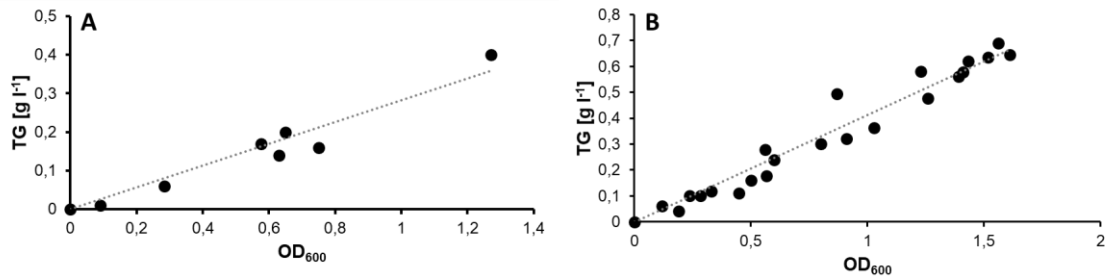


Abb. 31: Korrelation zwischen OD<sub>600</sub> und Zelltrockenmasse bei Kulturen in DMMG von *B. vulgatus* (A) und *P. johnsonii* (B). OD<sub>600</sub> = Optische Dichte bei 600 nm, TG = Zelltrockenmasse.

Es konnte eine klare Korrelation zwischen der optischen Dichte und dem Trockengewicht der Zellpellets ermittelt werden, die bei  $0,28 \pm 0,07 \text{ g l}^{-1}$  (*B. vulgatus*) bzw.  $0,41 \pm 0,08 \text{ g l}^{-1}$  (*P. johnsonii*) pro OD<sub>600</sub> von 1 lag (Abb. 31).

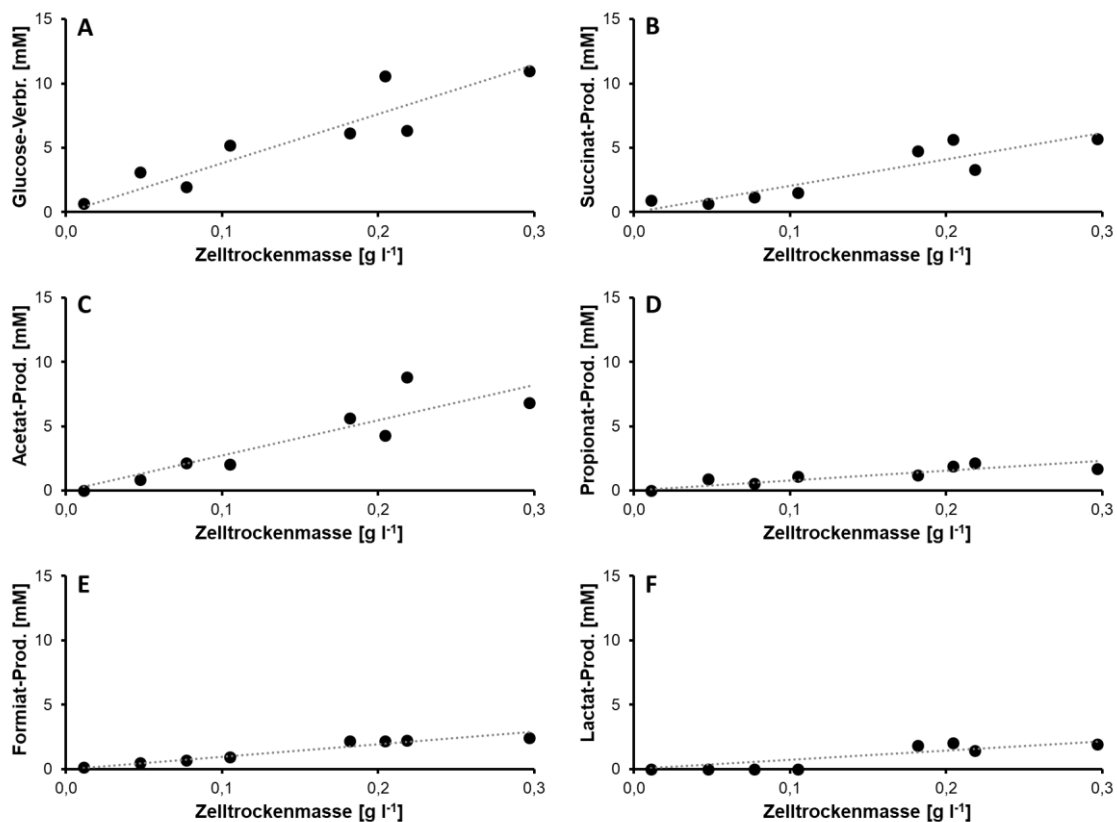


Abb. 32: Substratverbrauch und Produktbildung von *B. vulgatus* während des Wachstums auf Glucose. Glucose-Verbrauch (A), Succinat-Produktion (B), Acetat-Produktion (C), Propionat-Produktion (D), Formiat-Produktion (E) und Lactat-Produktion (F).

*B. vulgatus* verbrauchte 37,45 mmol Glucose pro g Zelltrockenmasse und produzierte dabei in gleicher Größenordnung Succinat (20,37 mmol/g TG) sowie Acetat (27,12 mmol/g TG) (Abb. 32). Zusätzlich wurden geringe Mengen Formiat (9,56 mmol/g TG), Lactat (7,06 mmol/g TG) und Propionat (7,69 mmol/g TG) gebildet. Der Wachstumsertrag entsprach aufgrund der konsumierten Glucose und der Zelltrockenmasse 26,7 g TG/mol. Anhand der ermittelten Daten

wurde nun der Fluss der Intermediate des Zentralstoffwechsels von *B. vulgatus* rekonstruiert (Abb. 33).

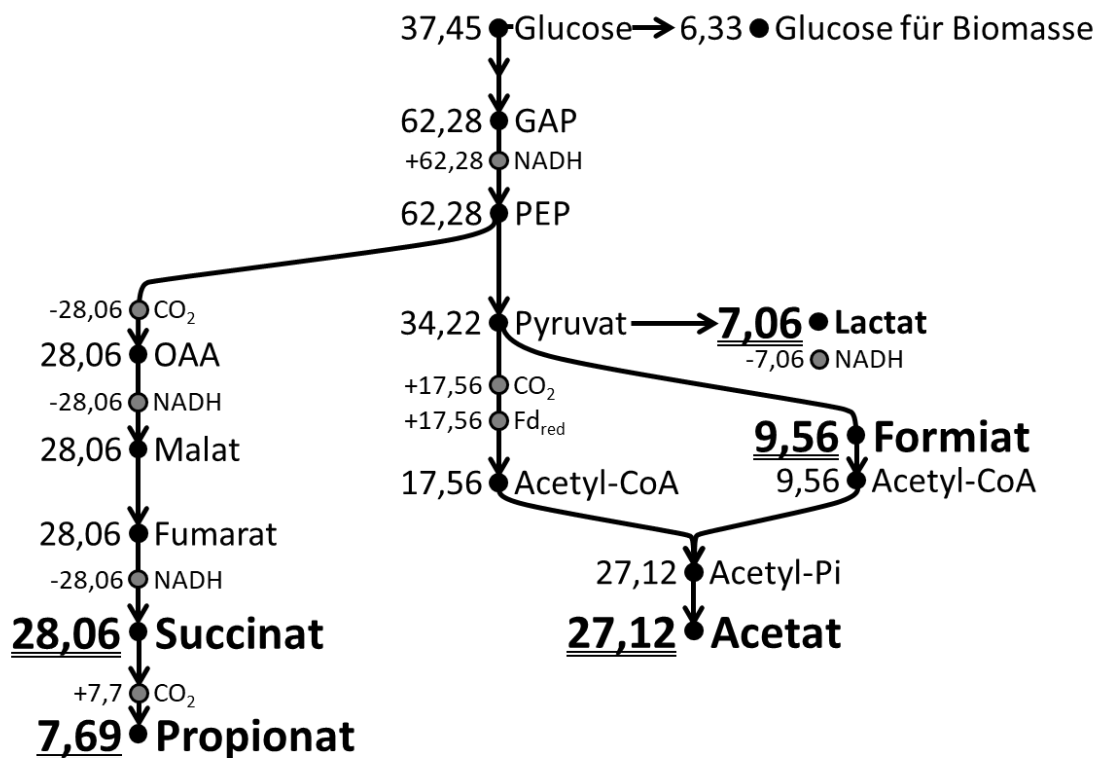
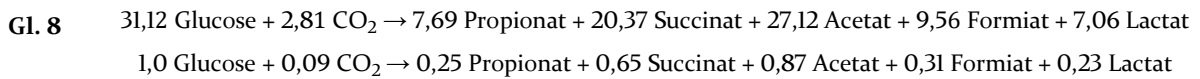


Abb. 33: Flussschema der Intermediate des zentralen C-Stoffwechsels von *B. vulgatus*. Die Zahlen repräsentieren die mmol der jeweiligen Substanz pro g Zelltrockenmasse. GAP = Glycerinaldehyd, PEP = Phosphoenolpyruvat, OAA = Oxalacetat, Fd<sub>red</sub> = reduziertes Ferredoxin, Pi = Phosphat.

Ähnlich zu den Ergebnissen von Kapitel 4.2.6 stellten sich Pyruvat und PEP als zentrale Intermediate des Stoffwechsels von *B. vulgatus* heraus. Während Pyruvat (34,22 mmol/g TG) entweder zu Acetyl-CoA und Formiat (je 9,56 mmol/g TG) durch die Pyruvat:Formiat-Lyase oder zu Acetyl-CoA, CO<sub>2</sub> und Fd<sub>red</sub> (je 17,56 mmol/g TG) durch die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase umgewandelt wurde, konnten außerdem geringe Mengen Lactat (7,06 mmol/g TG) gemessen werden, die durch die Aktivität der Lactatdehydrogenase aus Pyruvat gebildet wurden. Insgesamt wurden im Zuge der Glucose-Verstoffwechslung 62,3 mmol/g TG PEP generiert, das in die Produktion von Pyruvat und in den respiratorischen Weg des Stoffwechsels floss. Letzterer Anteil des verstoffwechselten PEP mündete so in Succinat (28,06 mmol/g TG) und Propionat (7,69 mmol/g TG) als Stoffwechselendprodukte des Glucose-Metabolismus. Ausgehend von der ermittelten Menge PEP konnte der Glucose-Verbrauch des Katabolismus (Glucose<sub>Katabolismus</sub>) berechnet werden, der mit 31,12 mmol/g TG den Hauptanteil der insgesamt konsumierten Glucose ausmachte. Die verbleibenden 6,33 mmol/g TG Glucose flossen folglich in den Anabolismus (Glucose<sub>Anabolismus</sub>) und wurden zum Aufbau von Biomasse benutzt. Im Zuge der Verstoffwechslung des Substrats wurden außerdem 28,06 mmol/g TG CO<sub>2</sub> bei der

Carboxylierungsreaktion der PEP-Carboxykinase inkorporiert, während 25,25 mmol/g TG CO<sub>2</sub> durch die Decarboxylierungsreaktionen der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und der Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase freigesetzt wurden. Der Netto-Bedarf des zentralen Kohlenstoffmetabolismus von *B. vulgatus* an CO<sub>2</sub> lag entsprechend bei 2,81 mmol/g TG, und damit deutlich niedriger als der in **Kapitel 4.2.6** bestimmte Wert für *P. copri*. Insgesamt ergaben die Daten folgende Fermentationsgleichung (**Gl. 8**):



Außerdem ließ sich aus den Daten ableiten, dass *B. vulgatus* 37,98 mmol/g TG Kohlenstoff (entspricht 6,33 mmol/g TG anabol konsumierter Glucose) zur Generierung von 1 g Zelltrockenmasse zur Verfügung standen. Analog zur Elementaranalyse von *P. copri* (siehe **Kapitel 4.2.6**) entsprach dies im Bezug zur verfügbaren Kohlenstoffmenge einer Bilanz von 94 %. Der Bedarf an Kohlenstoff wurde also weitestgehend durch die Glucose-Fermentation gedeckt. Der restliche Kohlenstoff stammte sehr wahrscheinlich aus Cystein, das ebenfalls im Medium enthalten war.

Um den aufgestellten Fluss der Intermediate zu verifizieren, wurde das Stoffwechselmodell auch auf eine ausgeglichene Redox-Bilanz hin überprüft. Wie in **Abb. 33** zu sehen ist, wurden im Zuge der Verstoffwechslung von Glucose insgesamt 159,62 mmol/g TG Reduktionsäquivalente [H] (aus NADH und Fd<sub>red</sub>) generiert, wobei hiervon 126,38 mmol/g TG bereits durch den Katabolismus (bei der Reduktion von OAA zu Fumarat und Pyruvat zu Lactat) wieder verbraucht wurden. Dementsprechend standen *B. vulgatus* 33,23 mmol/g TG [H] zur Produktion von Biomasse zur Verfügung. Aus der Elementaranalyse (siehe Kapitel 4.2.5) ist bekannt, dass im Wesentlichen die Einheit C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> (Glucose) in die Einheit C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,44</sub> (Biomasse) umgewandelt werden muss. Dies bedeutete, dass *B. vulgatus* pauschal 37,98 mmol/g TG C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> (berechnet anhand der konsumierten Glucose<sub>Anabolismus</sub>) zu 37,98 mmol/g TG C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,44</sub> (berechnet anhand der Zelltrockenmasse) reduziert hat. Folglich wurden 75,93 mmol/g TG [H]-Äquivalente der Glucose in 67,96 mmol/g TG [H]-Äquivalente der Biomasse umgewandelt werden, was einer Differenz von 7,97 mmol/g TG [H]-Äquivalenten entsprach (**Tab. 24**). Bezogen auf Sauerstoff musste 37,97 mmol/g TG [O]-Äquivalente der Glucose auf 16,33 mmol/g TG reduziert werden, was einer Differenz von 21,64 mmol/g TG [O] entspricht. Da letztlich auch hier [O] in Form von H<sub>2</sub>O entfernt werden musste, lag die notwendige Menge an [H] bei 43,28 mmol/g TG. Es standen 33,23 mmol/g TG [H] aus den katabolen Prozessen zur Verfügung, wozu sich der Überschuss von 7,97 mmol/g TG [H]-Äquivalenten aus der Umwandlung von Glucose

zu Biomasse hinzuaddierte. Insgesamt standen daher 41,21 mmol/g TG [H] zur Verfügung, die den aufgeführten Bedarf mit einer Bilanz von 95,21 % abdeckten.

Tab. 24: Berechnung der Redox-Bilanz von *B. vulgatus* während der Fermentation von Glucose.

Bestandteil	[mmol/g TG]
Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>a)</sup>	6,33
C <sub>1</sub> H <sub>2</sub> O <sub>1</sub> -Einheiten <sup>b)</sup>	37,98
[H]-Äquivalente aus Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>c)</sup>	75,93
[H]-Äquivalente für Zellbiomasse (C <sub>1</sub> H <sub>1,79</sub> O <sub>0,44</sub> ) <sup>d)</sup>	67,96
Zu entfernende [H]-Äquivalente <sup>e)</sup>	7,97
[O]-Äquivalente aus Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>f)</sup>	37,98
[O]-Äquivalente für Zellbiomasse (C <sub>1</sub> H <sub>1,79</sub> O <sub>0,44</sub> ) <sup>g)</sup>	16,33
Zu entfernende [O]-Äquivalente <sup>h)</sup>	21,64
[H]-Bedarf für [O]-Entfernung (als H <sub>2</sub> O) <sup>i)</sup>	43,28
[H] aus Katabolismus <sup>j)</sup>	33,23
Summe [H] für [O]-Entfernung <sup>k)</sup>	41,21
[H]-Bilanz <sup>l)</sup>	95,21 %

a) Glucose<sub>Gesamt</sub>-Glucose<sub>Katabolismus</sub>

b) 6,33 mmol Glucose x 6 C-Atome

c) 6,33 mmol Glucose x 12 H-Atome

d) 37,98 C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> x 1,79

e) c) - d)

f) 6,33 mmol Glucose x 6 O-Atome

g) 37,98 C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>-Einheiten x 0,44

h) f) - g)

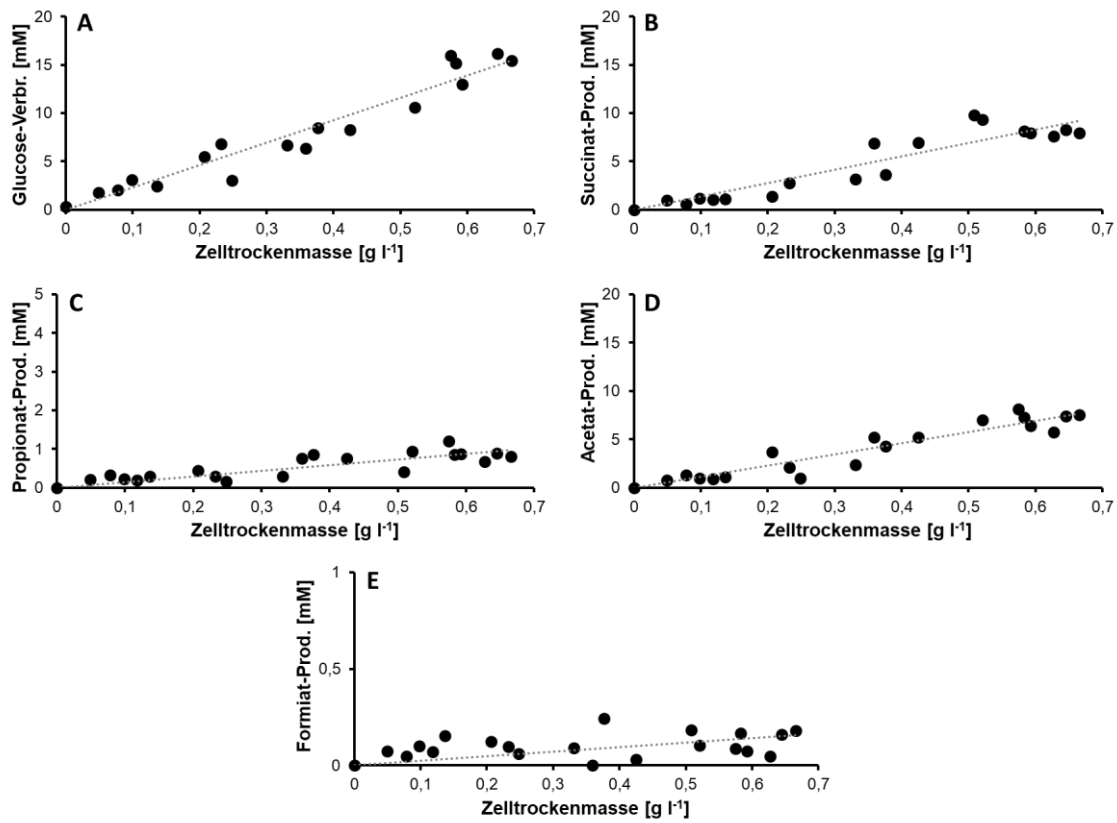
i) h) x 2

j) 62,28 mmol NADH aus GAP-Oxidation + 17,56 mmol Fd<sub>red</sub> aus Pyruvat-Oxidation - 56,12 mmol NADH für Reduktion von OAA zu Succinat - 7,06 mmol NADH für die Reduktion von Pyruvat zu Lactat (Abb. 33)

k) e) + j)

l) 41,28 x 100/43,28

Im Vergleich hierzu verbrauchte *P. johnsonii* 23,24 mmol Glucose pro g produzierte Zelltrockenmasse und bildete hauptsächlich Succinat (13,79 mmol/g TG) und Acetat (11,54 mmol/g TG) als Produkte der Glucose-Fermentation (Abb. 34). Des Weiteren wurden 1,43 mmol/g TG Propionat und geringe Mengen Formiat (0,24 mmol/g TG) gemessen, die als Endprodukte in das Medium abgegeben wurden. Insgesamt konnte für *P. johnsonii* außerdem anhand des Substratverbrauchs und der Biomasseproduktion ein Wachstumsertrag von 43 g pro Mol konsumierter Glucose ermittelt werden.



**Abb. 34: Substratverbrauch und Produktbildung von *P. johnsonii* während des Wachstums auf Glucose.** Glucose-Verbrauch (A), Succinat-Produktion (B), Propionat-Produktion (C), Acetat-Produktion (D) und Formiat-Produktion (E).

Wie zuvor wurde anhand der quantitativen Bestimmung des Produktspektrums der Fluss der Intermediate im Zentralstoffwechsel von *P. johnsonii* kalkuliert. Das Ergebnis ist in **Abb. 35** dargestellt.



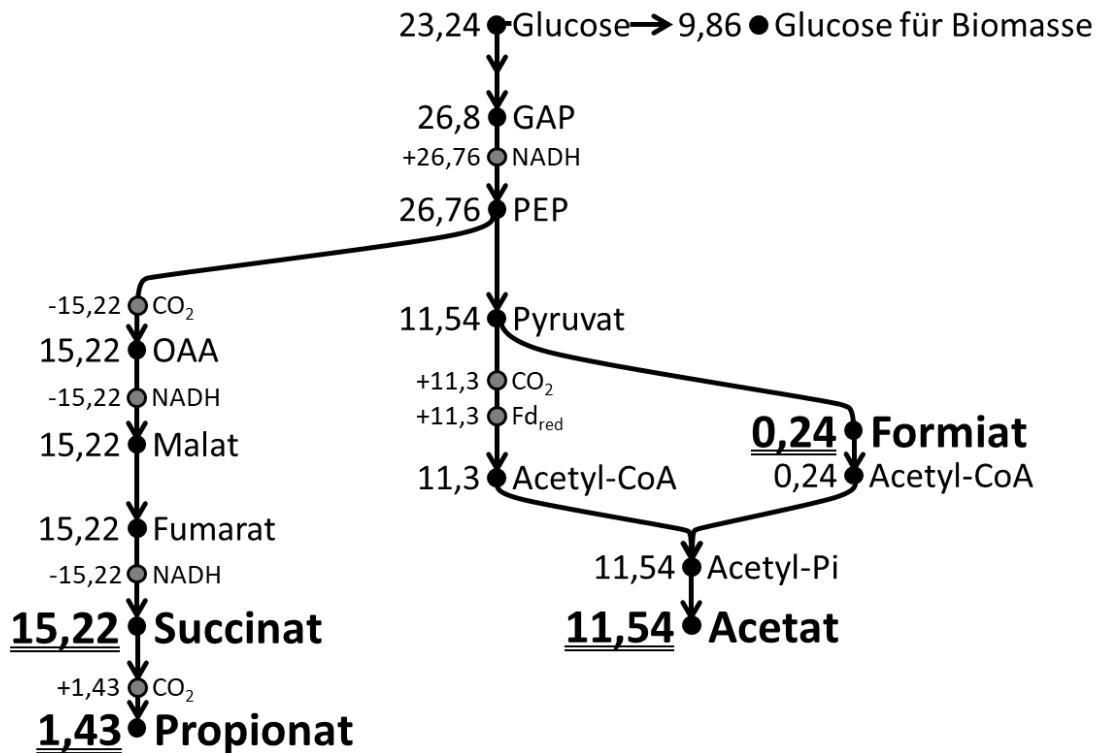
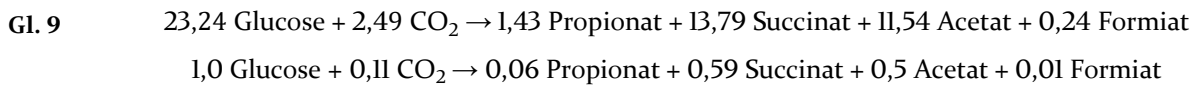


Abb. 35: Flussschema der Intermediate des zentralen C-Stoffwechsels von *P. johnsonii*. Die Zahlen repräsentieren die mmol der jeweiligen Substanz pro g Zelltrockenmasse. GAP = Glycerinaldehyd, PEP = Phosphoenolpyruvat, OAA = Oxalacetat, Fd<sub>red</sub> = reduziertes Ferredoxin, Pi = Phosphat.

Wie auch bei *B. vulgatus* stellte Pyruvat (11,54 mmol/g TG) ein Schlüsselintermediat im Zentralstoffwechsel von *P. johnsonii* dar. Hiervon ausgehend wurde hauptsächlich durch die Aktivität der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase Acetat (11,54 mmol/g TG) produziert, wobei ein geringer Anteil auch auf die Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase zurückzuführen war - erkennbar an der produzierten Menge Formiat (0,24 mmol/g TG). Als zweites Schlüsselintermediat konnte ebenfalls PEP identifiziert werden, wovon ausgehend sich der Stoffwechsel in den respiratorischen und fermentativen Ast aufteilte. Der Anteil, der hierbei nicht zu Pyruvat umgewandelt wurde, floss durch die Aktivität der PEP-Carboxykinase über OAA und Malat in die Produktion des terminalen Elektronenakzeptors Fumarat bis schließlich hin zu dem primären Endprodukt Succinat (jeweils 15,22 mmol/g TG). Ein geringerer Anteil (1,43 mmol/g TG) reagierte außerdem weiter zu Propionat. Des Weiteren konnte anhand der gebildeten Endprodukte ermittelt werden, dass 13,38 mmol/g TG der insgesamt konsumierten Glucose in den Katabolismus flossen, während die verbleibenden 9,86 mmol/g TG für anabole Prozesse zur Verfügung standen. Aufgrund der Aktivität der PEP-Carboxykinase wurden für die Generierung des Elektronenakzeptors 15,22 mmol/g TG CO<sub>2</sub> inkorporiert, während 12,73 mmol/g TG CO<sub>2</sub> durch die Decarboxylierungsreaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase und der MM-CoA-Decarboxylase freigesetzt wurden. Der Netto Bedarf an CO<sub>2</sub> lag für die

Verstoffwechslung von Glucose daher bei 2,49 mmol/g TG. Aus den Ergebnissen ließ sich die im Folgenden angegebene Fermentationsgleichung (**Gl. 9**) aufstellen:



Um die Kohlenstoffbilanz zu überprüfen, wurde ein Kohlenstoffgehalt von 40,4 mmol/g TG für die Zelltrockenmasse von *P. johnsonii* angenommen (siehe **Kapitel 4.2.5**), welcher durch die anabole Verstoffwechslung des Substrats abgedeckt sein sollte. Mit 59,16 mmol/g TG (ausgehend von 9,86 mmol/g TG Glucose<sub>Anabolismus</sub>) war der theoretische Bedarf an Kohlenstoff jedoch zu 146 % abgedeckt. Der deutliche Überschuss an Kohlenstoff wird zusammen mit dem folgenden Abschnitt in **Kapitel 5.6** diskutiert.

Zusätzlich zur Kohlenstoffbilanz wurde auch der Redox-Haushalt der Zelle während der Verstoffwechslung von Glucose rekapituliert. Wie in **Abb. 35** dargestellt, produzierte *P. johnsonii* im Zuge der Glucose-Fermentation 76,12 mmol/g TG [H]-Äquivalente, wovon im Katabolismus 60,88 mmol/g TG für die Generierung von Fumarat verstoffwechselt wurden. So blieben dem Anabolismus noch 15,24 mmol/g TG [H]-Äquivalente, die zur Transformation von 59,16 mmol/g TG C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> (Glucose) in 59,16 mmol/g TG C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,44</sub> (Biomasse) eingesetzt werden konnten (**Tab. 25**). Die Umwandlung des Substrats in Biomasse benötigte für *P. johnsonii* ultimativ die Entfernung von 12,42 mmol/g TG [H]-Äquivalenten und 33,72 mmol/g TG [O]-Äquivalenten in Form von H<sub>2</sub>O. Durch den Anteil an zu entfernendem [H] und den 15,24 mmol/g TG [H]-Äquivalenten aus dem Katabolismus standen folglich insgesamt 27,66 mmol/g TG [H]-Äquivalente für die Entfernung von [O] zur Verfügung, womit rechnerisch eine Redox-Bilanz von 41,01 % erzielt wurde. Die mögliche Ursache für die beobachtete Diskrepanz wird in **Kapitel 5.6** näher erläutert.

Tab. 25: Berechnung der Redox-Bilanz von *P. johnsonii* während der Fermentation von Glucose.

Bestandteil	[mmol/g TG]
Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>a)</sup>	9,86
C <sub>1</sub> H <sub>2</sub> O <sub>1</sub> -Einheiten <sup>b)</sup>	59,16
[H]-Äquivalente aus Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>c)</sup>	118,32
[H]-Äquivalente für Zellbiomasse (C <sub>1</sub> H <sub>1,79</sub> O <sub>0,44</sub> ) <sup>d)</sup>	105,90
Zu entfernende [H]-Äquivalente <sup>e)</sup>	12,42
[O]-Äquivalente aus Glucose <sub>Anabolismus</sub> <sup>f)</sup>	59,16
[O]-Äquivalente für Zellbiomasse (C <sub>1</sub> H <sub>1,79</sub> O <sub>0,44</sub> ) <sup>g)</sup>	25,44
Zu entfernende [O]-Äquivalente <sup>h)</sup>	33,72
[H]-Bedarf für [O]-Entfernung (als H <sub>2</sub> O) <sup>i)</sup>	67,44
[H] aus Katabolismus <sup>j)</sup>	15,24
Summe [H] für [O]-Entfernung <sup>k)</sup>	27,66
[H]-Bilanz <sup>l)</sup>	41,01 %

a) Glucose<sub>Gesamt</sub>-Glucose<sub>Katabolismus</sub>

b) 9,86 mmol Glucose x 6 C-Atome

c) 9,86 mmol Glucose x 12 H-Atome

d) 59,16 C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub> x 1,79

e) c) - d)

f) 9,86 mmol Glucose x 6 O-Atome

g) 59,16 C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>-Einheiten x 0,44

h) f) - g)

i) h) x 2

j) 26,76 mmol NADH aus GAP-Oxidation + 11,3 mmol Fd<sub>red</sub> aus Pyruvat-Oxidation - 30,44 mmol NADH für Reduktion von OAA zu Succinat (Abb. 35)

k) e) + j)

l) 27,66 x 100/67,44

#### 4.4 Biotechnologische Produktion von Succinat mit *P. copri*

Succinat zählt weltweit zu den bedeutendsten Plattformchemikalien, die aus Biomasse gewonnen werden können (Dessie *et al.*, 2018). Mit einer jährlichen Wachstumsrate von 27,4 % erreicht Succinat 2025 einen voraussichtlichen Marktanteil von 1,8 Milliarden USD, die einer Menge von 768 Millionen Megatonnen und einem Preis von 2,3 USD/kg entsprechen (Nghiem *et al.*, 2017). Als Plattformchemikalie findet Succinat eine Vielzahl verschiedener Anwendungsgebiete, wie z.B. als Lebensmittelzusatzstoff, Vorstufe von Detergenzien, in Kosmetika, Pigmenten und Färbemitteln, sowie als Zusatzstoff von Zement und Flussmitteln (Dessie *et al.*, 2018; Nghiem *et al.*, 2017; Zeikus *et al.*, 1999). Weitere Anwendungsgebiete sind die Herstellung von biobasierten Polymeren und Lösungsmitteln (Nghiem *et al.*, 2017).

Aufgrund der wachsenden Nachfrage und dem gesteigerten Interesse an nachhaltigen Produktionswegen, haben sich biotechnologische Methoden zur Herstellung von Succinat im industriellen Maßstab mittlerweile gegen rein chemische Verfahren durchgesetzt (Nghiem *et*

al., 2017). Die Produktion erfolgt in der Regel mit Hilfe von Mikroorganismen in Fermentationsanlagen. Da die meisten Organismen Succinat im Zuge des oxidativen Citratzyklus oder des reduktiven Citratzyklus generieren, gibt es mittlerweile eine entsprechend große Auswahl an Stämmen, die in der industriellen Produktion von Succinat Verwendung finden. Die am Häufigsten eingesetzten Mikroorganismen stammen dabei ursprünglich aus dem Rumen von Wiederkäuern, so z.B. *Actinobacillus succinogenes* (Dessie et al., 2018).

#### 4.4.1 Produktion von Succinat mit *P. copri* in anaeroben Serumflaschen

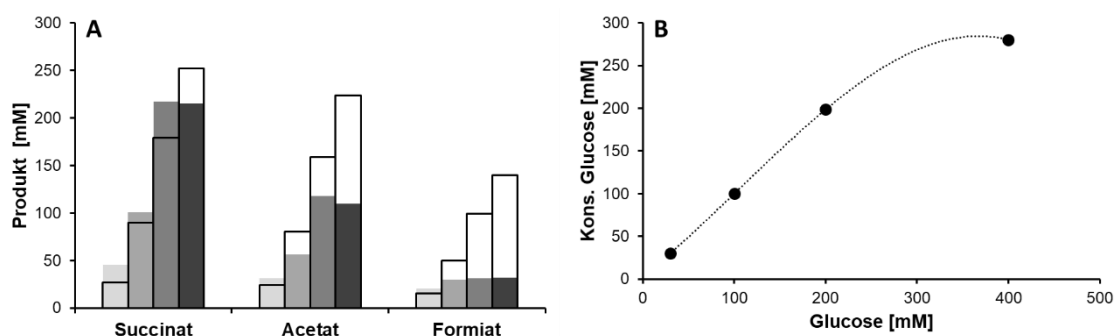
Wie in Kapitel 4.2 gezeigt werden konnte, beruht der Zentralstoffwechsel von *P. copri* im Wesentlichen auf der anaeroben Veratmung von Fumarat und der Vergärung von Pyruvat zu Acetat und Formiat. Damit hinterlässt *P. copri* als einzige Endprodukte des Zentralstoffwechsels nur drei verschiedene Carbonsäuren, von denen Succinat einen wesentlichen Anteil ausmacht. So wurden unter nur leicht gepufferten Standardbedingungen (siehe Kapitel 4.2.6) bereits ~16 mM Succinat aus ~22 mM Glucose gebildet, sodass *P. copri* einen vielversprechenden Kandidaten für die biotechnologische Produktion von Succinat darstellt. Mit seinem Ertrag von 0,45 g Succinat pro g Glucose lag *P. copri* bereits ohne jedwede Optimierungsversuche in demselben Bereich wie einige bekannte Succinat-Produzenten, wie z.B. *A. succinogenes* (McKinlay et al., 2007).

Um die natürliche Produktion von Succinat durch *P. copri* zu maximieren, wurden zunächst Versuche mit PYG-Kulturen in Serumflaschen mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen vorgenommen, die zusätzlich mit 400 mM CaCO<sub>3</sub> versetzt wurden. Ziel war es, eine geeignete Substratkonzentration zur Herstellung von Succinat im Batch-Verfahren zu finden und gleichzeitig mit Hilfe des CaCO<sub>3</sub> den pH-Wert der Kulturen zu stabilisieren, indem die saure Wirkung der von *P. copri* gebildeten Endprodukte abgefangen werden sollte. CaCO<sub>3</sub> liegt in wässrigen Systemen und bei einem neutralen pH-Wert als weitestgehend unlöslicher Feststoff vor, sodass das CaCO<sub>3</sub> keinen direkten Einfluss auf die Kulturen haben sollte. Die pH-puffernde Wirkung des CaCO<sub>3</sub>-Depots sollte nun durch die Interaktion mit den von *P. copri* ausgeschiedenen Endprodukten einsetzen, indem deren sauer reagierende Carboxylgruppen Protonen auf CaCO<sub>3</sub> übertragen. Hierdurch entsteht letztlich CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und das jeweilige Calciumcarboxylat (Calciumsuccinat, Calciumacetat und Calciumformiat). Während das CO<sub>2</sub> nun weitestgehend in die Gasatmosphäre der Serumflaschen entweichen und von *P. copri* als Netto-CO<sub>2</sub>-Konsument verstoffwechselt werden sollte, sind Calciumsalze von Carbonsäuren bei einem neutralen pH-Wert nur schwer löslich und sollten dementsprechend im Medium ausfallen. So sollte verhindert werden, dass die Anhäufung der Endprodukte (schwache Säuren) aufgrund ihrer Membranpermeabilität in protonierter Form zu einer Entkopplung der

Atmungskette, und somit zu einer Inhibierung des Wachstums führt. Außerdem sollte die Präzipitation der Endprodukte bereits einen ersten Aufreinigungsschritt zur Produktion von Succinat darstellen.

Für die Messung der gebildeten Endprodukte und des Substratverbrauchs wurden die Zellen zusammen mit den Calciumpräzipitaten abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC analysiert. Zusätzlich wurde das Pellet in  $H_2SO_4$  resuspendiert, um die Calciumpräzipitate zu lösen. Auch hier erfolgte anschließend eine Analyse der Endprodukte mittels HPLC. Um außerdem die  $OD_{600}$  der Kulturen trotz Präzipitat zu bestimmen, wurden Proben mit Essigsäure angesäuert, sodass die Calciumsalze gelöst wurden, während die Zellen jedoch intakt blieben.

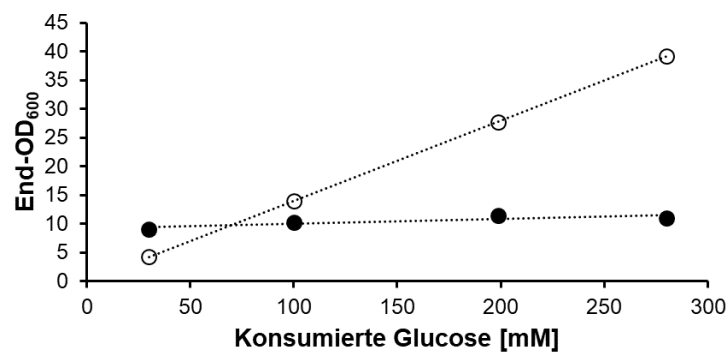
*P. copri* bildete in  $CaCO_3$ -gepuffertem PYG-Medium bei einem stabilen pH-Wert von  $\sim 7,3$  die erwarteten Endprodukte des Glucose-Stoffwechsels Succinat, Acetat und Formiat (**Abb. 36**). Um festzustellen, inwiefern das  $CaCO_3$  einen Einfluss auf das Wachstum und die Produktion von Succinat hatte, wurden anhand des jeweiligen Glucoseverbrauchs theoretische Messwerte für die Endprodukte errechnet, die auf den Ergebnissen aus **Kapitel 4.2.6** beruhen. So hätte bspw. die Kultur mit ursprünglich 30 mM Glucose und vollständigem Verbrauch des Substrats theoretisch das 0,9-Fache der Glucose an Succinat (27 mM), das 0,8-Fache an Acetat (24 mM) und das 0,5-Fache an Formiat (15 mM) produzieren sollen, wie es in PYG-Medium ohne  $CaCO_3$  der Fall gewesen wäre. Tatsächlich wurden von der Kultur jedoch aus 30 mM verbrauchter Glucose 45,7 mM Succinat, 31,1 mM Acetat und 20,3 mM Formiat produziert.



**Abb. 36: Endproduktkonzentration (A) und Substratverbrauch (B) der Glucose-Verstoffwechslung von *P. copri* in  $CaCO_3$ -gepuffertem PYG-Medium.** Dargestellt in A) sind die gemessenen Konzentrationen als graue Balken und die anhand der verbrauchten Glucose kalkulierten, theoretischen Konzentrationen als schwarze Rahmen. Von jeweils links nach rechts und in dunkler werdenden Graustufen sind die Daten angegeben für: 30 mM Glucose, 100 mM Glucose, 200 mM Glucose und 400 mM Glucose. Für die Berechnung der Werte wurden die Ergebnisse aus Kapitel 4.1.1 für PYG-Medium verwendet. B) zeigt den Substratverbrauch bei den unterschiedlich eingesetzten Substratkonzentrationen.

Auch die Kulturen mit 100 mM und 200 mM Glucose produzierten mit 101 mM und 217 mM insgesamt mehr Succinat als es theoretisch ohne  $CaCO_3$  bei gleichem Substratverbrauch der Fall gewesen wäre. Gleichzeitig wurde deutlich weniger Acetat (56,5 statt 80 mM bzw. 118 statt 158,9 mM) und Formiat (29,76 statt 50 mM bzw. 31 statt 99,31 mM) gebildet. In beiden Fällen wurden

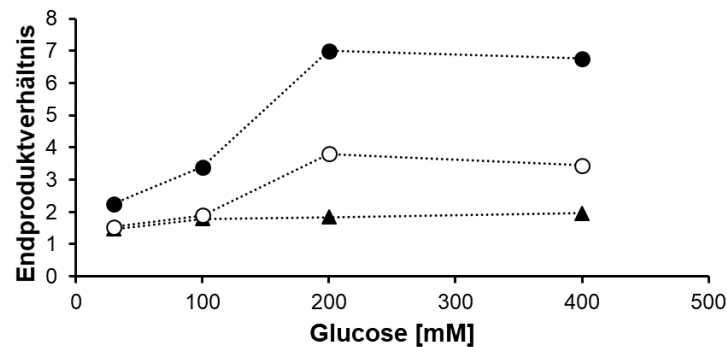
wie auch bei der Kultur mit 30 mM Glucose 100 % des eingesetzten Substrats verbraucht. Im Vergleich hierzu wurden bei 400 mM Glucose insgesamt weniger Endprodukte (215 mM Succinat, 109,5 mM Acetat und 31,8 mM Formiat) erzeugt, als es theoretisch bei dem gegebenen Substratverbrauch unter Standardbedingungen der Fall gewesen wäre (252 mM Succinat, 224 mM Acetat und 140 mM Formiat). Außerdem wurden nur etwa 70 % der verfügbaren Glucose konsumiert, obwohl das Wachstum bereits über einen längeren Zeitraum stagnierte. Somit erzeugte die Kultur mit 200 mM verfügbarer Glucose mit 217 mM die größte Menge an Succinat im getesteten,  $\text{CaCO}_3$ -gepufferten Batch-Verfahren, was einer Produktionsrate von 0,7 g Succinat pro g konsumierter Glucose entsprach. Zum Vergleich bildete der in der Industrie bereits eingesetzte Stamm *Basfia succiniciproducens* bei seiner Erstbeschreibung im Batchverfahren 0,6 g Succinat pro g Glucose und ein bereits optimiertes Produktionsverfahren mit *Corynebacterium glutamicum* etwa 1,1 g Succinat pro g konsumierter Glucose (Scholten and Dägele, 2008; Chung *et al.*, 2017).



**Abb. 37: Korrelation zwischen konsumierter Glucose und der erreichten End-OD<sub>600</sub> von *P. copri* Kulturen in  $\text{CaCO}_3$ -gepuffertem PYG-Medium.** Dargestellt sind die ermittelten (●) und die anhand der konsumierten Glucose und den Daten aus Kapitel 4.1 errechneten theoretischen (○) Werte.

Die Kulturen erreichten mit aufsteigender Konzentration (zwischen 30 und 200 mM) an Glucose eine relativ konstante maximale End-OD<sub>600</sub> von 9 bis 11,5 (Abb. 37). Bemerkenswerterweise lagen die End-OD<sub>600</sub> damit insgesamt in einem niedrigeren Bereich als aufgrund des Substratverbrauchs unter Standardbedingungen theoretisch möglich gewesen wäre. So ist für die Standardbedingungen bekannt, dass *P. copri* 7,15 mM Glucose konsumiert, um eine OD<sub>600</sub> von 1 zu erreichen. Bei einem Verbrauch von knapp 200 mM hätten die Kulturen unter Standardbedingungen theoretisch also eine End-OD<sub>600</sub> von 27,8 erreichen können. Somit wäre rein rechnerisch mit zunehmendem Substratverbrauch ein End-OD<sub>600</sub>-Bereich von 4,2 bis 39,2 möglich gewesen, der in diesem Versuch jedoch nicht erreicht wurde. Obwohl der Substratverbrauch tatsächlich deutlich zunahm, wurde unter den untersuchten Bedingungen nicht deutlich mehr Biomasse gebildet. Die Zellen befanden sich unabhängig von der verbliebenen Substratkonzentration bei einer OD<sub>600</sub> von ungefähr 10 bereits in der stationären

Phase des Wachstums und konsumierten die restliche Glucose nur noch im Zuge ihres Erhaltungsstoffwechsels. Die Zellen verhielten sich folglich ab einem gewissen Zeitpunkt annähernd wie ruhende Zellen (siehe auch **Kapitel 4.2.4**). Dabei kam es auch zu einer Verschiebung der Endprodukt-Verhältnisse (**Abb. 38**). So veränderte sich zwar das Verhältnis von Succinat und Acetat von 1,47 auf 1,96 nur geringfügig, allerdings nahm die Menge an gebildetem Formiat im Verhältnis zu Succinat und Acetat sehr deutlich ab – erkennbar an den steigenden Verhältnissen von Succinat zu Formiat (von 2,25 auf 7) und Acetat zu Formiat (von 1,5 zu 3,8). Da die Zellen einen Großteil der Glucose nicht zum Aufbau von Biomasse verwendeten, mussten entsprechend weniger bis keine Reduktionsäquivalente des Katabolismus für den Anabolismus zur Verfügung gestellt werden. So standen letztlich auch mehr Reduktionsäquivalente zur Reduktion von Fumarat zur Verfügung, was sich in dem Anstieg an Succinat bemerkbar machte.



**Abb. 38:** Endproduktverhältnisse während der Glucose-Fermentation durch *P. copri* in  $\text{CaCO}_3$ -gepuffertem PYG-Medium mit unterschiedlichen Substratkonzentrationen. ▲ = Succinat/Acetat, ● = Succinat/Formiat und ○ = Acetat/Formiat.

Obwohl die Zellen einen Großteil der Glucose erst nach Erreichen der stationären Wachstumsphase verbraucht haben müssen, wurde mit einem zunehmenden Substratverbrauch die verhältnismäßige Formiat-Konzentration immer geringer. Besonders auffällig waren dabei die Kulturen mit ursprünglich 200 und 400 mM Glucose, die fast die gleiche Konzentration an Formiat aufwiesen, wie die Kultur mit ursprünglich 100 mM Glucose. Dies ist insofern erstaunlich, als dass die Produktion von Formiat über die Pyruvat-Formiat-Lyase keine Reduktionsäquivalente erzeugt und daher eigentlich bevorzugt dann genutzt werden sollte, wenn Reduktionsäquivalente im Überschuss vorhanden sind. Die Reaktion der Pyruvat-Formiat-Lyase fungiert in *P. copri* nach den Daten aus **Kapitel 4.2** also als eine Art Ausgleichsmaßnahme des Stoffwechsels, um den Redoxhaushalt auszubalancieren. Es ist daher anzunehmen, dass Zellen von *P. copri* in der stationären Phase des Wachstums eher vermehrt Pyruvat über die Pyruvat-Formiat-Lyase verstoffwechseln als über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase, da Letztere Reduktionsäquivalente erzeugt, die normalerweise der Versorgung

des Anabolismus dienen und zu diesem Zeitpunkt nicht mehr oder nur geringfügig benötigt werden. Die Daten dieses Versuchs vermitteln jedoch aufgrund der relativ konstanten Formiatkonzentrationen den Eindruck, als hätten die Kulturen unabhängig der verfügbaren Substratmenge Formiat gebildet, bis die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von ~10 erreicht hatten, um anschließend nur noch Succinat und Acetat zu produzieren. Inwiefern die pH-Stabilisierung durch CaCO<sub>3</sub> und die höhere Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> für die Verschiebung des Endproduktprofils verantwortlich waren, konnte an dieser Stelle nicht mehr abschließend geklärt werden und wird in **Kapitel 5.7** näher diskutiert. Fakt ist, dass die Pufferung des Mediums mit CaCO<sub>3</sub> den direkten Einsatz von höheren Konzentrationen an Glucose im Batch-Verfahren erlaubte, sodass erstmalig Kulturen mit einem Succinat-Titer von 217 mM erreicht werden konnten. Die Verschiebung des Endproduktprofils zu Gunsten von Succinat war hierbei ein begünstigender Nebeneffekt.

Interessanterweise kam es entgegen der ursprünglichen Annahme nicht zu einer Ausfällung der Stoffwechselendprodukte durch den Einsatz von CaCO<sub>3</sub>. Tatsächlich befanden sich mindestens 98 % des jeweiligen Endprodukts im Überstand der Proben und entsprechend nur ein geringer Prozentanteil im abzentrifugierten Calciumpräzipitat (**Tab. 26**). Es ist anzunehmen, dass das Erreichen einer wachstumslimitierenden Endproduktkonzentration durch die Pufferung mit CaCO<sub>3</sub> nicht verhindert werden konnte. Gründe für den beobachteten Effekt wurden in Kapitel 4.4.3 näher untersucht.

**Tab. 26: Endproduktkonzentration im Probenüberstand (ÜS) und Pellet von *P. copri*-Kulturen in CaCO<sub>3</sub>-gepuffertem PYG-Medium mit unterschiedlichen Glucosekonzentrationen.**

Glucose [mM]	Succinat [mM]		Acetat [mM]		Formiat [mM]	
	ÜS	Pellet	ÜS	Pellet	ÜS	Pellet
30	45,73	0	31,13	0	20,33	0
100	99,77	1,23	55,37	1,13	29,76	0
200	215	2	115,74	2,26	31	0
400	212,98	2,02	107,41	2,09	31,8	0

#### 4.4.2 Produktion von Succinat mit *P. copri* im anaeroben Kleinfärmenter

Parallel zu dem untersuchten Batch-Verfahren zur Produktion von Succinat mit *P. copri* in Serumflaschen wurde versucht einen gleichartigen Prozess als Fed-Batch-Fermentation in einem anaeroben Kleinfärmenter durchzuführen. Dabei sollten Zellen von *P. copri* in PYG-Medium mit zunächst 200 mM Glucose angezogen werden, wobei zusätzlich 160 mM Glucose im späteren Verlauf der Fermentation nachgefüllt werden sollten. Zur Stabilisierung des pH-Werts sollte in diesem Versuch im Gegensatz zum Batch-Verfahren in Serumflaschen (siehe



**Kapitel 4.4.1**) kein  $\text{CaCO}_3$ -Depot vorgelegt, sondern eine anaerobe  $\text{Ca(OH)}_2$ -Suspension nach Bedarf in den Fermenter geleitet werden. Auch hier war das Ziel, die saure Wirkung der Carboxylgruppen der Endprodukte von *P. copri* zu neutralisieren. In diesem Fall allerdings durch die zugeführten  $\text{OH}^-$ -Ionen. Zusätzlich sollten auch hier die deprotonierten Carbonsäuren zusammen mit den Calciumionen als weitestgehend unlösliche Salze aus der Lösung fallen, um einer Inhibierung des Stoffwechsels von *P. copri* durch die Akkumulation der schwachen Säuren vorzubeugen. Entsprechend sollte die Neutralisation mit  $\text{Ca(OH)}_2$  letztlich nur  $\text{H}_2\text{O}$  und die jeweiligen Calciumcarboxylate erzeugen.

Um die anaeroben Wachstumsbedingungen zur Anzucht von *P. copri* zu gewährleisten, und um den Organismus mit dem notwendigen  $\text{CO}_2$  zu versorgen, wurde ein Gasgemisch mit 80 %  $\text{N}_2$  und 20 %  $\text{CO}_2$  mit einer konstanten Flussrate in den Kleinfermenter geleitet. Da der verwendete Fermenter ursprünglich für die Anzucht von Aerobiern genutzt wird, wurden sämtliche Schraubgewinde vor dem Zusammenbau der Anlage mit Teflonband abgewickelt und sämtliche Dichtungen, wenn nötig, erneuert. Sonstige Eintrittsstellen für Sauerstoff wurden mit gasdichtem Klebeband abgeklebt. Der Aufbau der Fermentationsanlage umfasste den Kleinfermenter mit Temperatur- und pH-Sonde, einem Magnetrührer, Heizmanschette, Zu- und Abluft für das Gasgemisch, sowie Steuereinheiten zur Temperatur- und pH-Kontrolle (**Abb. 1**). Proben wurden ähnlich wie in **Kapitel 4.4.1** abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC auf Substrat- und Produktkonzentrationen analysiert. Das aus Zellen und Calciumpräzipitat bestehende Pellet wurde mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  angesäuert, um die Calciumsalze zu lösen, und ebenfalls mittels HPLC untersucht.

Nach Beimpfung des Mediums benötigte *P. copri* in der Fermentationsanlage etwa 48 h, um die ursprüngliche Menge von 200 mM Glucose auf 30,4 mM zu reduzieren (**Abb. 39**). Daher wurde dem System nach weiteren 24 h zusätzliche 160 mM Glucose zugeführt, die im Verlauf von weiteren 72 h auf eine Restkonzentration von 66 mM Glucose verstoffwechselt wurden. Es wurde eine End- $\text{OD}_{600}$  von 13 erreicht. *P. copri* produzierte dabei im Verlauf der gesamten Fermentation 213 mM Succinat, 156 mM Acetat und 80 mM Formiat aus insgesamt 294 mM konsumierter Glucose. Dies entsprach einer Menge von 25 g/l Succinat und einem Ertrag von etwa 0,5 g Succinat pro g Glucose.

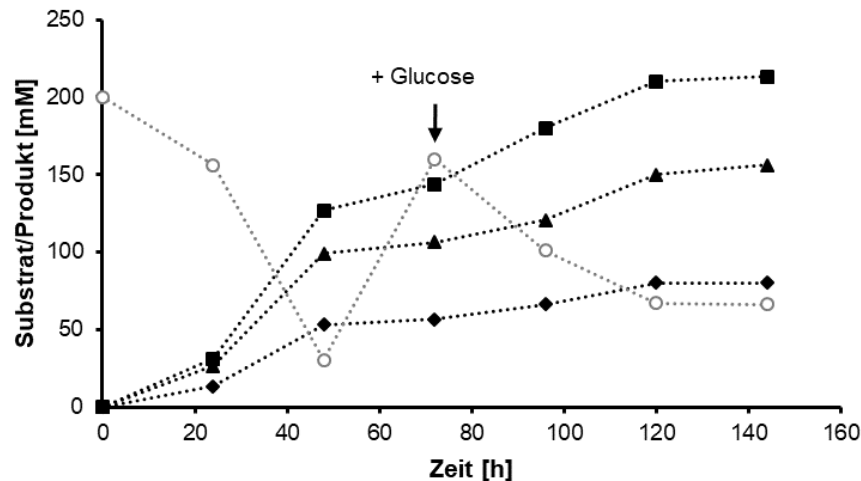


Abb. 39: Substratverbrauch und Produktbildung während der Glucose-Fermentation von *P. copri* im anaeroben Kleinfärmenter. ■ = Succinat, ▲ = Acetat, ◆ = Formiat und ○ = Glucose. Der Zeitpunkt der Nachfütterung von 160 mM Glucose ist vermerkt.

Der Verlauf der Fermentation zeigte einen biphasischen Verlauf, der durch die Nachfütterung mit Glucose zustande kam. Während die ersten 200 mM Glucose von *P. copri* relativ schnell verstoffwechselt wurden, sank die Produktion und der Substratverbrauch in der zweiten Hälfte der Fermentation auf etwa 40 % der ursprünglichen Rate und kam nach etwa 120 h vollständig zum Erliegen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen aus **Kapitel 4.4.1** waren die Verhältnisse der Endprodukte in diesem Versuch über den gesamten Zeitraum relativ konstant. Die einzige Ausnahme stellten dabei die ersten 24 h des Wachstums dar, bei denen die erzeugten Endprodukte in ungefähr den Verhältnissen der nicht gepufferten Standardbedingungen vorlagen. Im Anschluss veränderte sich das Verhältnis und es wurde im Durchschnitt die 1,34-fache Menge Succinat im Vergleich zu Acetat, die 2,55-fache Menge Succinat im Vergleich zu Formiat und die 1,89-fache Menge Acetat im Vergleich zu Formiat gebildet. Insgesamt bildete *P. copri* in der Fermentationsanlage somit im Verhältnis weniger Formiat und etwas mehr Acetat als unter Standardbedingungen. Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass das Pyruvat im Stoffwechsel von *P. copri* unter den getesteten Bedingungen vermehrt über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase statt über die Pyruvat-Formiat-Lyase (siehe hierzu auch **Kapitel 4.2**) umgesetzt wurde. Ein möglicher Grund für den beobachteten Effekt lag eventuell im hier verwendete  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  zur Neutralisierung der von *P. copri* gebildeten Säuren. So wird  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  unter anderem auch als  $\text{CO}_2$ -Falle genutzt, da es zusammen mit  $\text{HCO}_3^-$  zu  $\text{CaCO}_3$  reagiert, welches als weitestgehend unlöslicher Feststoff ausfällt. Zwar reagiert auch das feststoffliche  $\text{CaCO}_3$  mit den gebildeten Säuren, wodurch das  $\text{CO}_2$  wieder freigesetzt wird, allerdings akkumuliert dieses in dem offenen System des Kleinfärmenters nicht in der Gasatmosphäre, sondern entweicht längerfristig über

die Abluft. Daher ist denkbar, dass trotz einer konstanten Zufuhr mit einem CO<sub>2</sub>-haltigen Gasmisch, die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> im Medium vergleichsweise gering war. Als Resultat könnte die CO<sub>2</sub>-freisetzende Reaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase bevorzugt abgelaufen sein, und zwar nicht nur zur Kompensierung der möglicherweise verminderten CO<sub>2</sub>-Konzentration, sondern auch weil das Ca(OH)<sub>2</sub> durch seine CO<sub>2</sub>-fällende Wirkung die Reaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase theoretisch in Richtung Produkte verschiebt.

Gleichzeitig lag die erreichte End-OD<sub>600</sub> von B3 deutlich unter dem für den Substratverbrauch theoretisch möglichen Wert. So hätte die Kultur unter Standardbedingungen bei insgesamt 294 mM verbrauchter Glucose und einem Verhältnis von 7,15 mM konsumierter Glucose pro OD<sub>600</sub> von 1 eine rechnerische End-OD<sub>600</sub> von etwa 41 erreichen können. Nicht-limitierende Wachstumsbedingungen vorausgesetzt. Das Ergebnis des Kleinfermenters ähnelte damit den Daten aus Kapitel 4.4.1, bei denen die Kulturen von *P. copri* in CaCO<sub>3</sub>-gepufferten PYG trotz hohem Substratverbrauch nur eine maximale End-OD<sub>600</sub> von 11 erreichen konnte. Damit lag auch bei der Kultivierung im Kleinfermenter eine Wachstumslimitierung vor und die Zellen verstoffwechselten einen Großteil der Glucose vermutlich erst nach Erreichen der End-OD<sub>600</sub>.

Ein Grund für das limitierte Wachstum lag vermutlich wie auch in **Kapitel 4.4.1** in der Akkumulation der Endprodukte im Medium. Auch hier führte der Einsatz von Calciumsalzen nicht zur gewünschten Ausfällung der von *P. copri* gebildeten Endprodukte und etwa 98 % der Carbonsäuren befand sich im Überstand der Proben. So sorgte zwar die pH-Kontrolle der Fermentationsanlage immerhin für eine längere Wachstumsphase als unter nur schwachgepufferten Standardbedingungen möglich gewesen wäre, allerdings führte die Akkumulation der schwachen Säuren wahrscheinlich trotzdem irgendwann zu einer wachstumshemmenden Wirkung. Grund hierfür ist vermutlich, dass die schwachen Säuren aufgrund ihrer pK<sub>s</sub>-Werte auch bei einem neutralen pH-Wert teilweise protoniert vorliegen und in ihrer protonierten Form membranpermeabel sind. Die Membranpermeabilität und die pK<sub>s</sub>-Werte zwischen 3,77 und 5,61 sorgten vermutlich für eine Entkopplung der Atmungskette von *P. copri*, wodurch der Stoffwechsel bei einer ausreichenden Konzentration an schwachen Säuren weitestgehend zum Erliegen kam. Gründe für die Akkumulation der Endprodukte wurden im folgenden Kapitel näher untersucht.

Trotz der unerwünschten Akkumulation der Stoffwechselendprodukte im Medium, konnte hier das erste Mal eine anaerob betriebene Fermentationsanlage zur erfolgreichen Anzucht des menschlichen Darmbakteriums *P. copri* genutzt werden. So konnte mit dieser Methode außerdem eine vielversprechende Menge der Plattformchemikalie Succinat produziert werden,

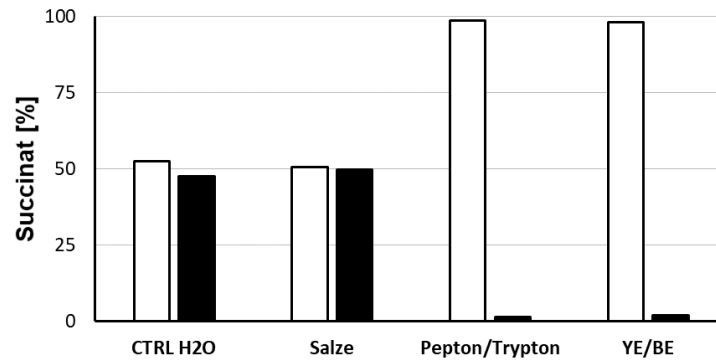
was *P. copri* zu einem interessanten Kandidaten für zukünftige biotechnologische Verfahren zur Produktion von Succinat macht.

#### 4.4.3 Löslichkeitsverhalten von Calciumsuccinat in Anwesenheit von Medienbestandteilen

Viele Calciumsalze von Carbonsäuren sind in Wasser und bei einem neutralen pH-Wert nur schwer löslich (Cannan and Kibrick, 1938). Im Besonderen weist Calciumsuccinat bei Raumtemperatur nur eine Löslichkeit von 1,28 g pro 100 ml Wasser auf, weswegen sich Bernsteinsäure relativ einfach mit Calciumionen aus wässrigen Lösungen ausfällen lässt. Diese Eigenschaft macht sich auch die biotechnologische Industrie zu Nutze, und die klassische Methode zur Isolierung von Bernsteinsäure/Succinat aus Fermentationsbrühen beinhaltet in der Regel die Zufuhr von Calciumionen in Form von bspw. Kalkmilch (Thakker *et al.*, 2012; Kurzrock and Weuster-Botz, 2010). Dieser Vorgang ist vor allem deshalb weit verbreitet, da das Calciumsuccinat anschließend sehr einfach durch Filtrations- und Aufreinigungsschritte von den restlichen Bestandteilen der Fermentationsbrühe abgetrennt und durch Umsalzungen zum gewünschten Produkt raffiniert werden kann (Thakker *et al.*, 2012; Kurzrock and Weuster-Botz, 2010).

Das Grundprinzip dieser simplen Methode sollte auch in den Versuchen aus **Kapitel 4.4.1** und **4.4.2** dazu genutzt werden, um die Anhäufung der fermentativen Endprodukte von *P. copri* durch Ausfällung mit Calciumionen zu verhindern. Wie sich herausstellte, führte der Einsatz der Calciumionen jedoch nicht zu dem gewünschten Effekt und die Stoffwechselendprodukte verblieben weitestgehend in Lösung (siehe auch **Kapitel 4.4.1** und **4.4.2**).

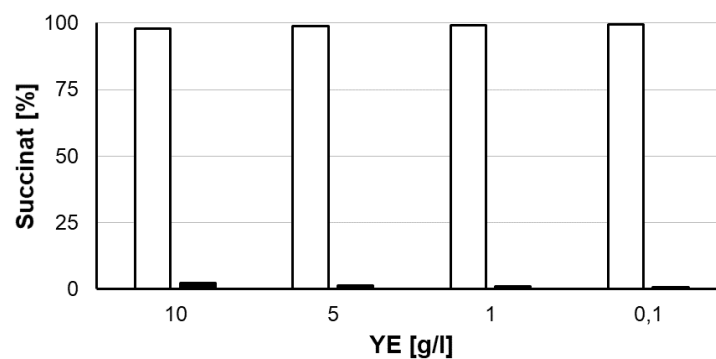
Um zu untersuchen, inwiefern Medienbestandteile das Löslichkeitsverhalten der Calciumcarboxylate beeinflusst haben könnten, wurden zunächst Lösungen mit 200 mM Bernsteinsäure und verschiedenen Medienbestandteilen von PYG angefertigt, die anschließend mit einer  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ -Suspension auf pH ~7 neutralisiert wurden. Die neutralisierten Lösungen wurden anschließend abzentrifugiert und der Überstand mittels HPLC auf die Succinatkonzentration hin untersucht. Das entstandene Pellet der Calciumpräzipitate wurde mit konzentrierter Schwefelsäure gelöst und anschließend ebenfalls mittels HPLC analysiert. Es stellte sich heraus, dass die komplexen Bestandteile des PYG-Mediums maßgeblich die Ausfällung der Bernsteinsäure in Form von Calciumsuccinat beeinflussten (**Abb. 40**).



**Abb. 40: Prozentuale Verteilung von Succinat nach Neutralisierung von Bernsteinsäure mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  unter Anwesenheit verschiedener PYG-Medienbestandteile.** Weiße Balken stellen die Proben der Überstände, schwarze Balken die Proben der Calciumpräzipitate dar. CTRL H2O = Kontrolle (Wasser), Salze = PYG-Salzlösung +  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Pepton/Trypton = Pepton und Trypton, YE/BE = Hefeextrakt und Fleischextrakt.

Während die Bernsteinsäure gelöst in Wasser oder in der Salzlösung durch die Neutralisierung zu etwa 50 % aus der Lösung gefällt wurde (nicht vollständig aufgrund des mittleren  $\text{pK}_{\text{S1}}$ -Werts von Bernsteinsäure), sorgte die Anwesenheit der komplexen PYG-Bestandteile dafür, dass sich trotz pH 7 annähernd 100 % des Succinats im Überstand der Proben befand statt teilweise ausgefällt im Präzipitat. Diese Beobachtung stimmte mit den Ergebnissen aus **Kapitel 4.4.1** und **4.4.2** überein und zeigte, dass die Neutralisierung der Stoffwechselendprodukte von *P. copri* durch  $\text{CaCO}_3$  oder  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in dem gewählten Medium nicht zu einer Ausfällung von Calciumsuccinat führen konnte, da die komplexen Bestandteile von PYG mit diesem Vorgang interferierten.

Um zu überprüfen, ob dieser Effekt von der Konzentration der komplexen Bestandteile im Medium abhängt, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie zuvor gewählt, jedoch wurden die Bernsteinsäurelösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen an Hefeextrakt versehen. Auch hier zeigte sich, dass schon sehr geringe Mengen an Hefeextrakt zu der bereits erwähnten Beobachtung führten (**Abb. 41**).



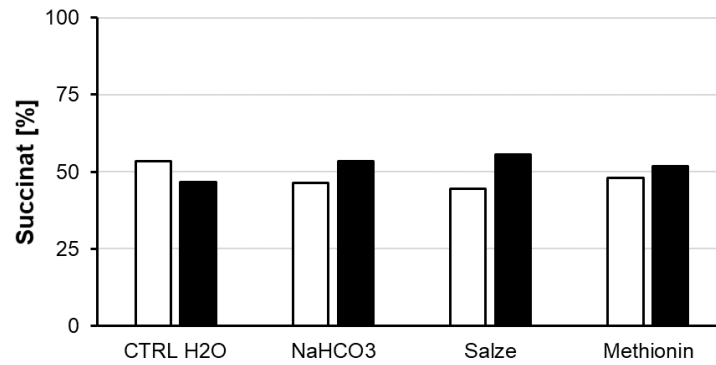
**Abb. 41: Prozentuale Verteilung von Succinat nach Neutralisierung von Bernsteinsäure mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  unter Anwesenheit verschiedener Hefeextraktkonzentrationen.** Weiße Balken stellen die Proben der Überstände, schwarze Balken die Proben der Calciumpräzipitate dar. YE = Hefeextrakt.

So kam es selbst bei einer 100-fach niedrigeren Konzentration an Hefeextrakt, als im PYG-Medium normalerweise enthalten ist, zur fehlenden Ausfällung des Calciumsuccinats.

Es ist bekannt, dass Proteine, Peptide und Aminosäuren über ihre Carboxylgruppen mit  $\text{Ca}^{2+}$  interagieren bzw. komplexieren können (Bao *et al.*, 2008). So ist denkbar, dass die komplexen Medienbestandteile, welche hohe Anteile an Proteinen, Peptiden und Aminosäuren aufwiesen, bevorzugt mit den Calciumionen interagierten und daher als Konkurrenzreaktion die Präzipitation der Bernsteinsäure verhinderten. In der Industrie tritt dieses Problem vermutlich gar nicht auf, da Fermentationsbrühen in der Regel eine Vorbehandlung erfahren, in der Bestandteile wie z.B. Zellen und lösliche Proteine entfernt werden, bevor die Präzipitation der Bernsteinsäure/des Succinats mittels Calciumionen stattfindet (Li *et al.*, 2016).

Insgesamt zeigte sich, dass die Wahl von PYG als Kulturmedium für die Beobachtungen aus **Kapitel 4.4.1** und **4.4.2** verantwortlich war. Der Wechsel zu einem Medium mit geringerem Proteinanteil oder der Einsatz eines Minimalmediums könnte somit eine erfolgsversprechende Alternative sein, um bei sonst gleichem Versuchsaufbau die Produktion von Succinat in Serumflaschen oder im Kleinfärmenter deutlich zu steigern.

Um zu überprüfen, ob das in dieser Arbeit bereits für *P. copri* etablierte DMMG (siehe auch **Kapitel 4.1**) sich als potenzielles Fermentationsmedium für die Produktion von Succinat unter Ausfällung mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  eignet, wurden auch diese Bestandteile wie bereits für PYG aufgeführt untersucht. Die Medienbestandteile von DMMG zeigten dabei kaum Veränderung im Verteilungsmuster des Succinats nach Neutralisierung und Ausfällung mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (**Abb. 42**). So befanden sich grundsätzlich etwa 50 % des ursprünglichen Succinats im löslichen Überstand der neutralisierten Proben, während der Rest im ausgefällten Calciumpräzipitat zu finden war. Tatsächlich lag der Anteil an ausgefälltem Succinat im Vergleich zur Kontrolle sogar zwischen 51 % und 55 %, was die gewünschte Entfernung des Endprodukts aus der Lösung entsprechend begünstigen würde.



**Abb. 42: Prozentuale Verteilung von Succinat nach Neutralisierung von Bernsteinsäure mit  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  unter Anwesenheit verschiedener DMMG-Medienbestandteile.** Weiße Balken stellen die Proben der Überstände, schwarze Balken die Proben der Calciumpräzipitate dar. CTRL H2O = Kontrolle mit Wasser,  $\text{NaHCO}_3$  =  $\text{NaHCO}_3$ .

Da die einzelnen Bestandteile des Mediums somit keine nachteiligen Auswirkungen auf die Verteilung der Bernsteinsäure in den zwei erzeugten Phasen hatten, stellt DMMG somit vermutlich eine geeignete Alternative zu PYG dar, um Succinat unter Einsatz von  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  mit *P. copri* herzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies jedoch nicht mehr überprüft, und zukünftige Experimente werden zeigen, inwiefern die natürliche Succinatproduktion von *P. copri* mit DMMG und dem Einsatz von  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  gesteigert werden kann.

## 5 Diskussion

Der menschliche Gastrointestinaltrakt zählt zu den komplexesten mikrobiellen Habitaten, die in der Natur vorkommen. Die Komplexität des Habitats ergibt sich dabei nicht nur durch die Vielzahl von verschiedenen Arten, sondern auch durch die große Anzahl an wechselseitigen Beziehungen, die zwischen den einzelnen Spezies und ihrem Wirt existieren (Quigley, 2013). Zusätzlich beeinflussen übergeordnete Faktoren, wie Genetik, Alter, Lebensstil, Ernährung und Medikamenteneinnahme die Organismen der Darmmikrobiota und ihren Wirt. Und selbst weniger offensichtliche Faktoren wie die psychische Verfassung und der circadiane Rhythmus spielen bei der Formung der Darmflora eine bemerkenswerte Rolle (Yatsunenکو *et al.*, 2012; Foster and McVey Neufeld, 2013; Deaver *et al.*, 2018; Parkar *et al.*, 2019). Die Mikrobiota kann sich dabei aus über 1000 (uns bekannten) Spezies zusammensetzen, die allerdings vornehmlich aus den vier großen Phyla der Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria und Proteobacteria stammen (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Die Verteilung der Spezies auf die einzelnen Phyla und deren jeweiliger Anteil an der Darmflora ist bei jeder Person unterschiedlich. Innerhalb einer Familie oder eines gemeinsamen Haushalts kann sich die phylogenetische Zusammensetzung jedoch durchaus ähneln (Dill-McFarland *et al.*, 2019). Gleichzeitig ist die intestinale Mikrobiota nicht konstant und passt sich bei veränderten Lebensumständen und Bedingungen an neue Situationen an (Lozupone *et al.*, 2012). Nichtsdestotrotz gibt es universelle Muster, die es ermöglichen die Komplexität dieser mikrobiellen Gemeinschaft auf ihre wesentlichen Aspekte zu reduzieren und entsprechend zu vereinfachen. So spiegelt das Konzept distinkter Enterotypen die Prädominanz von einer durchaus überschaubaren Menge an Organismen wider, die der Darm des Menschen als eine Art „Kernmikrobiota“ beheimatet (Arumugam *et al.*, 2011). Dabei überwiegen in jedem Enterotypen verschiedene Leitorganismen, die phylogenetisch entweder zu verschiedenen Gattungen innerhalb der Firmicutes oder zu der Gattung *Bacteroides* bzw. *Prevotella* aus dem Phylum Bacteroidetes gehören (Arumugam *et al.*, 2011). Diese Gruppen machen den größten Masseanteil an Mikroben im Darmtrakt des Menschen aus und gewährleisten unter anderem mit einer Vielzahl an primären und sekundären Polysaccharidverwertern basale Funktionen des Colons (Flint *et al.*, 2008; Flint *et al.*, 2015; Cockburn and Koropatkin, 2016). Da sich diese überschaubare Menge an Organismen gegen unzählige andere Mikroben behaupten muss, stellt sich die Frage, welche Faktoren und Eigenschaften letztlich für den Erfolg dieser Spezies verantwortlich sind. Insbesondere ist auch die gegenseitige Konkurrenz von Bedeutung, da in der Regel immer nur eine dieser phylogenetischen Gruppen die Dominanz über das Habitat Dickdarm besitzt (Arumugam *et al.*, 2011).



Aufgrund der multifaktoriellen Natur dieses Habitats, herrschen im Darm sehr wandelbare Bedingungen vor, die sich selbst bei einem konstanten Lebensstil z.B. aufgrund von Ernährung und Tagesrhythmus regelmäßig verändern (Lozupone *et al.*, 2012; Voigt *et al.*, 2016; David *et al.*, 2014a). Die Fähigkeit, sich z.B. mit Hilfe eines breit aufgestellten Metabolismus an veränderte Situationen anzupassen, kann hier genauso über den Erfolg einer Spezies entscheiden wie die optimale Spezialisierung auf eine einzelne ökologische Nische. In diesem Kontext ist die Physiologie prädominanter Darmbewohner aufgrund ihrer universellen Verbreitung und Relevanz für die gesamte Darmflora ein entscheidender Schlüssel für die Erforschung solcher zentralen Mechanismen innerhalb des Colons.

Während in den 1970er und 1980er Jahren bereits einige physiologische Daten zu intestinalen *Bacteroides* spp. generiert wurden (Varel and Bryant, 1974; Macy *et al.*, 1975; Macy *et al.*, 1978; Macy and Probst, 1979; Lindner *et al.*, 1979; Chen and Wolin, 1981; Caspari and Macy, 1983; Salyers, 1984; Eley *et al.*, 1985), fehlen diese bisher in hinreichender Form für viele andere Vertreter der dominanten Spezies des Darms. So ist aufgrund massiver Fortschritte in der Sequenzierungstechnologie schon relativ gut bekannt, wer den Dickdarm des Menschen besiedelt, jedoch nicht, welche physiologischen Eigenschaften diese Organismen besitzen. Mit dem Zugang zu immer mehr Genomsequenzen müssen nun also noch biochemische Daten erhoben werden, um die entstandene Lücke zu schließen.

Als der wohl wichtigste Vertreter der Gattung *Prevotella* im Intestinaltrakt des Menschen stellte *P. copri* am Anfang dieser Arbeit einen besonders gut geeigneten Kandidaten dar, um mit dem Schließen dieser Lücke zu beginnen. Zielsetzung dieser Arbeit war es also zunächst den zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus des Organismus zu entschlüsseln, Wachstumsparameter zu bestimmen und physiologische Eigenheiten auszuarbeiten, die die Stellung von *P. copri* innerhalb der Darmmikrobiota verdeutlichen. Zusätzlich sollten diese Daten mit denen von zwei weiteren wichtigen Vertretern der intestinalen Bacteroidales verglichen werden, wozu die zentralen Stoffwechsel von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* ebenfalls analysiert wurden. Des Weiteren sollte die Fragestellung untersucht werden, ob sich *P. copri* aufgrund seines Stoffwechsels und den Wachstumsparametern zur biotechnologischen Produktion der vielseitigen Plattformchemikalie Succinat eignet. Hierfür wurden Versuche in einem anaeroben Fermentersystem durchgeführt.

## 5.1 Die Wachstumsparameter von *P. copri* und $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ als Modulator der menschlichen Darmflora

Betrachtet man die genetische Ausstattung von *P. copri*, wird klar, dass sich dieses Bakterium deutlich von den meisten anderen human-assoziierten Spezies der Gattung *Prevotella*

unterscheidet. Besonders deutlich ist dieser Unterschied in der Substratspezialisierung des Organismus. Die vornehmlich in der Mundhöhle des Menschen vorkommenden *Prevotella*-Arten (z.B. *P. intermedia* und *P. nigrescens*) sind hauptsächlich an die Verstoffwechslung stickstoffhaltiger Substrate angepasst, was sowohl Proteine, Peptide und Aminosäuren als auch Amino-zuckerverbindungen miteinschließt (Takahashi and Yamada, 2000). *P. copri* hingegen ist auf den Abbau von verschiedenen Polysacchariden spezialisiert, die in großen Mengen den Dickdarm des Menschen erreichen. Mit einem immensen Repertoire an Enzymen, die pflanzliche Ballaststoffe wie Stärke, Xylan und Pectin zerkleinern, ähnelt die Spezies somit eher intestinalen *Bacteroides* spp. oder Pansen-assoziierten *Prevotella* spp. (Sonnenburg *et al.*, 2010; Flint *et al.*, 2008; Accetto and Avguštin, 2018). Diese Spezialisierung auf Saccharide ließ sich auch im Wachstumsexperiment zeigen, da *P. copri* selbst in Komplexmedium auf Glucose als Substrat angewiesen war und nicht alleine auf den Proteinen, Peptiden und Aminosäuren des Mediums wachsen konnte (**Abb. 4**). Gleichzeitig zeichnete sich das Bakterium außerdem durch ein äußerst konkurrenzfähiges, anaerobes Wachstum aus, das es *P. copri* ermöglicht, sich gegen die Vielzahl von anderen Darmbewohnern durchzusetzen: So war es dem Organismus unter Laborbedingungen möglich, beachtliche Zelldichten mit relativ kurzen Verdopplungszeiten zu erreichen (Siehe **Kapitel 4.1**;  $td=40$  min und  $OD_{600}=2,6$  in PYG bzw.  $td=2,5$  h und  $OD_{600}=1,5$  in DMMG), die als Parameter zwar nicht zwangsläufig die natürliche Situation innerhalb des Darms widerspiegeln müssen, aber gute Indizien hierfür darstellen. Untermauert werden diese Ergebnisse durch den hohen Masseanteil, den *P. copri* innerhalb der intestinalen Mikrobiota annehmen kann, sowie der Vergleichbarkeit dieser Daten mit Ergebnissen zu anderen dominanten Darmspezies (Human Microbiome Project Consortium, 2012; Eley *et al.*, 1985; Hamilton *et al.*, 1989). Außerdem ist die Darmflorazusammensetzung durchaus größeren Schwankungen ausgesetzt ist, sodass z.B. selbst eine *Bacteroides*-dominierte Darmflora durch temporäre Ernährungsumstellung kurzzeitig von der Gattung *Prevotella* dominiert werden kann (Wu *et al.*, 2015; Cheng and Ning, 2019; David *et al.*, 2014b). Ein effektives Wachstum ist somit gerade bei den am häufigsten vorkommenden Darmorganismen eine wichtige Eigenschaft, um sich die Prädominanz über das Habitat zu sichern.

Hierbei hilft es *P. copri* Glycogen als Speicherpolysaccharid einzulagern (siehe **Kapitel 4.2.5**). Da der Mensch in der Regel seine Nahrung in Intervallen zu sich nimmt, wird auch die Darmflora nur unregelmäßig mit frischen Substraten versorgt, die anschließend bis zur nächsten Nahrungszufuhr kontinuierlich abgebaut werden (Parkar *et al.*, 2019; Kaczmarek *et al.*, 2017). Die Möglichkeit einen Vorrat anzulegen, um die Zeit bis zur nächsten Substratzufuhr zu überbrücken, ist dementsprechend eine praktische Anpassung, um den regelmäßigen Substratmangel zu kompensieren. Die Fähigkeit Glycogen zu synthetisieren ist unter

intestinalen Bakterien sogar ubiquitär verbreitet und gilt als essenziell notwendig, um sich dauerhaft und konkurrenzfähig im Gastrointestinaltrakt von Säugetieren anzusiedeln (Goh and Klaenhammer, 2014). Es ist also nicht verwunderlich, dass ein so erfolgreiches Darmbakterium wie *P. copri*, das beim *Prevotella*-Enterotyp bis zu 80 % der menschlichen Intestinalmikrobiota ausmachen kann, über diese Fähigkeit verfügt. Die in dieser Arbeit ermittelte Glycogenmenge von *P. copri* war interessanterweise stark abhängig von der Wachstumsphase. So war insgesamt die Menge an eingelagertem Glycogen in der stationären Phase am höchsten, während von der *lag*-Phase ausgehend die Glycogenmenge in der exponentiellen Wachstumsphase kontinuierlich abnahm (siehe **Kapitel 4.2.5**). Da die stationäre Phase Bedingungen mit Nährstoffknappheit oder anderweitigen Einschränkungen widerspiegelt, und die *lag*-Phase sozusagen den Übergang in einen substratreichen Zustand, lassen sich die Ergebnisse gut mit den oben bereits erwähnten, natürlichen Gegebenheiten des menschlichen Darms in Verbindung bringen. Bemerkenswerterweise lag die Glycogenmenge in PYG-Medium insgesamt niedriger als in DMMG und zeigte keinen Wachstumsphasen-abhängigen Verlauf. Da die Substratverfügbarkeit in PYG eigentlich auch noch bei den hohen OD<sub>600</sub> der stationären Phase gegeben war (vergleiche mit Ergebnissen aus **Kapitel 4.2.6**), kann man davon ausgehen, dass hier eher die Akkumulation der Stoffwechselprodukte (schwache organische Säuren) das Wachstum limitierte als die Substratverfügbarkeit. Dadurch war die Glycogenbildung hier vermutlich weniger an die Wachstumsphase gekoppelt als es in DMMG der Fall gewesen war, in dem eine Substratknappheit neben der Endproduktinhibierung insgesamt schneller eintreten konnte (vergleiche hierzu auch die Ergebnisse aus **Kapitel 4.2.6**). Mit einem ermittelten Maximalwert von 13 % der Zelltrockenmasse lag der Glycogengehalt in *P. copri* deutlich niedriger als z.B. bei der artverwandten Spezies *Prevotella ruminicola*, bei der bis zu 60 % der Zelltrockenmasse aus eingelagertem Glycogen bestehen kann (Lou *et al.*, 1997). Allerdings wurden in diesem Fall deutlich andere Bedingungen untersucht als in der vorliegenden Arbeit, sodass unter anderen Umständen auch *P. copri* zu einer höheren Glycogenmenge fähig sein könnte. Dies ist vor allem deshalb möglich, da der Glycogenstoffwechsel von Bakterien stark reguliert wird und intrazellulär mit einer Vielzahl anderer Stoffwechselwege vernetzt ist (Wilson *et al.*, 2010). Welche Faktoren den Glycogenstoffwechsel von *P. copri* also genau regulieren, und inwiefern hierdurch die Fitness des Bakteriums bei der Besiedelung des menschlichen Darms beeinflusst wird, werden zukünftige Experimente klären.

Neben dem effektiven Wachstum und der Möglichkeit einen Glycogenspeicher anzulegen, besitzt *P. copri* zusätzlich nur relativ geringe Wachstumsansprüche. So konnte der Organismus mit einem einfach zusammengesetzten Minimalmedium (DMMG) kultiviert werden, welches im Wesentlichen aus einer überschaubaren Menge an verschiedenen Salzen und Glucose

besteht. Als essenziell für das Bakterium stellten sich hier Vitamin K1 und Hämin heraus, die als Zusätze zum Medium hinzugefügt werden mussten und auch nicht in dem verwendeten Komplexmedium (PYG) ausgespart werden konnten. Beide Zusätze supplementieren zentrale Biosynthesewege, die in *P. copri* nicht vollständig vorliegen. Vitamin K1 dient als Vorstufe von Menachinon, während Hämin vor allem für die Produktion von Häm b benötigt wird. Da sowohl Menachinon als auch Häm b unabdingbare Bestandteile der anaeroben Atmungskette von *P. copri* sind, ist der Organismus also darauf angewiesen zumindest Vorstufen aus einer externen Quelle zu beziehen. Im Kontext darmmikrobieller Konkurrenz spielt dieser Fakt jedoch kaum eine Rolle. Zum einen sind die meisten anderen Darmorganismen ebenfalls nicht in der Lage Menachinone oder Häme *de novo* zu synthetisieren, und zum anderen gelangen sowohl Vitamin K1 als auch Hämin durch Nahrungsmittel in größeren Mengen in den Dickdarm des Menschen, sodass in der Regel beide Substanzen als Ressource ausreichend zur Verfügung stehen (Shearer *et al.*, 2012; Hooda *et al.*, 2014; Yilmaz and Li, 2018).

Als Mitglied des Phylums Bacteroidetes benötigte *P. copri* außerdem entweder Vitamin B12 oder L-Methionin, um den Mangel eines fehlenden Vitamin B12 Biosynthesewegs auszugleichen (Varel and Bryant, 1974; Bacic and Smith, 2008; Rakoff-Nahoum *et al.*, 2014). Cobalamin (Vitamin B12) wird ähnlich wie Vitamin K oder Hämin vom Menschen über die Nahrung aufgenommen. Grundsätzlich ist die Biosynthese von Vitamin B12 allerdings ausschließlich auf die Domänen Bacteria und Archaea beschränkt, sodass sämtliches verfügbares Vitamin B12 aus mikrobieller Fermentation stammt (Fang *et al.*, 2017). Dies hat zur Folge, dass Cobalamin in nennenswerten Mengen fast ausschließlich in tierischen Lebensmitteln zu finden ist, da das Vitamin im Verlauf der Nahrungskette in Tieren akkumuliert (Gille and Schmid, 2015). Außerdem produzieren eine Vielzahl von Pansen-assoziierten Mikroorganismen Vitamin B12, sodass gerade Produkte von und aus Wiederkäuern besonders hohe Konzentrationen des Vitamins aufweisen (Gille and Schmid, 2015; Fang *et al.*, 2017). Zusätzlich findet sich Vitamin B12 wenn auch in sehr niedrigen Konzentrationen in einigen fermentierten pflanzlichen Lebensmitteln wie z.B. Sojasoße oder Tempeh (Gille and Schmid, 2015). Aufgrund der Exklusivität von Vitamin B12 in tierischen Lebensmitteln kann es bei einer rein pflanzlichen Ernährung ohne ausreichende Supplementierung längerfristig zu einem Mangel an Vitamin B12 kommen, der neben dem Wirt auch die Darmflora betrifft. Zwar gibt es innerhalb der Darmflora durchaus Organismen, die Cobalamin produzieren, allerdings machen diese nur 25 % der Mikroflora aus, während aber die Mehrzahl der im Darm lebenden Mikroorganismen Cobalamin-abhängige Enzyme besitzen, sodass in den meisten Fällen der mikrobielle Bedarf an Vitamin B12 endogen nicht gedeckt werden kann (Rowley and Kendall, 2019). Hinzu kommt, dass Vitamin B12 vom Menschen im Dünndarm absorbiert wird, wodurch nur der Überschuss

an nicht-absorbiertem Cobalamin aus dem Ileum in das Colon gelangt (Nielsen *et al.*, 2012; Kozyraki and Cases, 2013). Entsprechend ist die Versorgung der Darmflora mit Vitamin B12 durchaus abhängig von der Ernährungsweise des Wirts, die jedoch in den meisten Fällen bei einer ausgewogenen Ernährung (omnivor, ovo-lacto vegetarisch und supplementiert vegan) zu einer ausreichenden Zufuhr des Vitamins führt (Gille and Schmid, 2015; Zeuschner *et al.*, 2013; Obeid *et al.*, 2019; Green *et al.*, 2017). Vitamin B12 spielt somit als Modulator der Darmflora in vielen Fällen wahrscheinlich eher eine untergeordnete Rolle.

Ein weiterer Faktor, der allerdings einen sehr großen Einfluss auf die Prädominanz von *P. copri* haben dürfte, ist die  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentration innerhalb des Darms. Zwar gibt es kaum Daten zur intestinalen  $\text{CO}_2$ -Konzentration beim Menschen, jedoch legen die Ergebnisse der Stuhlprobenanalysen in dieser Arbeit (siehe **Kapitel 4.1.1**) nahe, dass die  $\text{CO}_2$ -Konzentration im Colon insgesamt starken Schwankungen ausgesetzt ist. Dies war sowohl zwischen den Probanden als auch innerhalb der unterschiedlichen Proben eines Individuums der Fall. So schwankten die Proben insgesamt in einem Bereich von 10 mM bis 40 mM  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  und konnten innerhalb eines Individuums Differenzen von über 20 mM besitzen. Gleichzeitig war das Wachstum von *P. copri* stark  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -abhängig und der Organismus benötigte rund 20 mM  $\text{HCO}_3^-$  für ein nicht-limitiertes Wachstum in DMMG (**Abb. 6**). Entsprechend lagen bei einigen Probanden intestinale Bedingungen des menschlichen Darms vor, bei denen *P. copri* vermutlich nur eingeschränkt wachsen kann. Im Gegensatz hierzu konnte die für die Gattung *Bacteroides* repräsentative Spezies *B. vulgatus* auch mit deutlich niedrigeren  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen wachsen, sodass der Organismus im Falle einer direkten Konkurrenz einen entscheidenden Vorteil gegenüber *P. copri* hätte. Unter der Annahme, dass die diversen anderen Spezies der Darmmikrobiota ebenfalls unterschiedlich auf die  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentration des Darms reagieren, hat dieser Faktor vermutlich weitreichende Konsequenzen für die allgemeine Darmflorazusammensetzung.  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  gelangt primär über zwei Wege in den Gastrointestinaltrakt des Menschen. Zum einen über das Kohlensäure-Bicarbonat-System des Bluts, das Bicarbonat zur pH-Regulierung in die gastrische Mucosa abgibt. Zum anderen durch die Darmflora selbst, die  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  durch Fermentation freisetzt (Rowland *et al.*, 2018). Mikrobielle Fermentation erzeugt den Großteil des intestinalen  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  und ist direkt abhängig von der Verfügbarkeit decarboxylierbarer Substrate (Rowland *et al.*, 2018). Entsprechend der zyklischen Nahrungsaufnahme des Wirts verläuft auch die Zu- und Abnahme der  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentration in Intervallen, wobei die Dauer und Intensität der fermentativen Phase bzw. die  $\text{CO}_2$ -Erzeugung von der Art des Substrats und von der Darmflorazusammensetzung abhängt (Jensen and Jørgensen, 1994; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2018; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2019; Marthinsen and Fleming, 1982). Substanzen, die ein großes Potenzial

besitzen, die  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentration im Dickdarm in die Höhe zu schrauben, sind vor allem pflanzliche Polysaccharide, die allgemein unter dem Begriff „Ballaststoffe“ zusammengefasst werden und vom Menschen selbst nicht verstoffwechselt werden können. Diese Verbindungen gelangen weitestgehend unverdaut in den Dickdarm, wo die entsprechenden Oligo- und Monosaccharide der Darmflora als Hauptnahrungsquelle dienen. Da viele dieser Polysaccharide, wie bspw. Pectin stark verzweigte und komplexe Polymere darstellen, wird für deren jeweiligen Abbau eine Reihe von sehr unterschiedlichen Enzymen benötigt, um die verschiedenen Bindungstypen innerhalb des Moleküls zu spalten (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2014; Flint *et al.*, 2008). Das dabei notwendige Netzwerk an Enzymen kann nur durch das interspezifische Zusammenspiel verschiedener Organismen innerhalb der Darmflora gewährleistet werden, sodass die Darmflorazusammensetzung auch darüber entscheidet, in welchem Maß und in welche Endprodukte (so auch  $\text{CO}_2$ ) die Polysaccharide verstoffwechselt werden (Zmora *et al.*, 2019; Kalantar-Zadeh *et al.*, 2019). Umgekehrt moduliert auch eine längerfristige Anpassung der Diät mit Ballaststoffen die Darmflorazusammensetzung und somit die Effektivität und die Art des mikrobiellen Abbaus der Polysaccharide (Cockburn and Koropatkin, 2016; Flint *et al.*, 2008; David *et al.*, 2014b; Sonnenburg *et al.*, 2010; Martens *et al.*, 2014). Neben den pflanzlichen Polysacchariden werden im Dickdarm prinzipiell auch Proteine und Aminosäuren von der Darmflora verstoffwechselt und können daher zur  $\text{CO}_2$ -Bildung beitragen (Rowland *et al.*, 2018; Scott *et al.*, 2013). Hierbei werden im Besonderen das proteinöse Rückgrat des Mucins, Proteine abgestorbener Zellen und im Gastrointestinaltrakt gebildete Exoenzyme abgebaut (Rowland *et al.*, 2018). Auch eine sehr proteinreiche Ernährung kann dazu führen, dass Proteine und Aminosäuren über den Dünndarm hinaus in das Colon gelangen und dort verstoffwechselt werden können (Rowland *et al.*, 2018). Insgesamt haben Proteine im Vergleich zu Polysacchariden jedoch aufgrund der saccharolytischen Natur der Dickdarmflora ein geringeres Potenzial durch intestinale Fermentation  $\text{CO}_2$  freizusetzen (Rowland *et al.*, 2018). Eine proteinreiche und eher ballaststoffarme Diät führt in der Regel also zu niedrigeren  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen, woran man erkennen kann, wie sehr die Ernährungsweise des Wirts einen Einfluss auf diesen Faktor hat (Kalantar-Zadeh *et al.*, 2019). Für *P. copri* bedeutet dies, dass eine ballaststoffreiche Ernährung des Wirts die Prädominanz des Bakteriums in den meisten Fällen begünstigt, da eine erhöhte  $\text{CO}_2$ -Produktion eine der Bedingungen für das Wachstum von *P. copri* schafft. Interessanterweise korreliert der *Prevotella*-Enterotyp tatsächlich mit einer ballaststoffreichen, pflanzlichen Ernährung (Ley, 2016; Yatsunenکو *et al.*, 2012; Cheng and Ning, 2019; Wu *et al.*, 2015). Die  $\text{CO}_2$ -Abhängigkeit von *P. copri* könnte somit eine der Triebfedern darstellen, die für diese Korrelation verantwortlich sind. Im Gegensatz hierzu sind vermutlich viele intestinale *Bacteroides* spp. in der Lage, sich auch bei niedrigeren  $\text{CO}_2$ -Konzentrationen

innerhalb der Darmflora durchzusetzen (**Abb. 6**), wie es z.B. in der Regel bei einer proteinreichen und ballaststoffarmen Ernährung der Fall sein dürfte. Auch hier gibt es ähnlich wie beim *Prevotella*-Enterotyp bereits Korrelationen, die den *Bacteroides*-Enterotyp in der Tat mit einer westlichen und somit eher proteinreichen und ballaststoffarmen Diät in Verbindung bringen (Wu *et al.*, 2015; Cheng and Ning, 2019).

## 5.2 Der zentrale Energie- und Kohlenstoffmetabolismus von *P. copri*

### 5.3 Der cytoplasmatische Zentralstoffwechsel von *P. copri*

Als eine der dominanten Spezies der intestinalen Mikrobiota des Menschen benötigt *P. copri* einen effektiven anaeroben Zentralstoffwechsel, der es dem Organismus ermöglicht, sich gegen eine Vielzahl bakterieller Konkurrenten durchzusetzen. Dabei ist *P. copri* auf den Abbau und die Verstoffwechslung von Polysacchariden spezialisiert und nutzt sein breitgefächertes Repertoire an hierfür notwendigen hydrolytischen Enzymen, um den cytoplasmatischen Zentralstoffwechsel mit energiereichen Monosacchariden zu versorgen (Accetto and Avguštin, 2015; Accetto and Avguštin, 2018). *P. copri* verstoffwechselt die Monosaccharide im Verlauf von drei funktionellen Abschnitten des Zentralstoffwechsels, die sich um das zentrale Intermediat PEP verteilen: (1) der glykolytische Abbau der Monosaccharide, (2) der respiratorische Abschnitt zur Generierung von Fumarat und (3) der fermentative Abschnitt zur Generierung von Reduktionsäquivalenten. Im ersten Abschnitt werden die Monosaccharide, hier beispielhaft Glucose, zunächst über den EMP-Weg bis hin zu PEP bzw. Pyruvat verstoffwechselt. Interessanterweise besitzt *P. copri* in der Phosphorylierungsphase des EMP-Wegs zwei unterschiedliche Phosphofruktokinasen (ATP- bzw. PPi-abhängig), die unter den getesteten Bedingungen gleichzeitig exprimiert vorlagen und deren enzymatische Aktivitäten mit Fructose-6-Phosphat in der Cytoplasmafraktion des Organismus gemessen werden konnten (siehe **Kapitel 4.2.2-4.2.3**). Dabei zeigte sich, dass das Gen der PPi-PFK stärker transkribiert vorlag und die Aktivität des entsprechenden Enzyms im Cytoplasma von *P. copri* deutlich höhere Werte erreichte als die ATP-abhängige Variante. Entsprechend spielt die PPi-PFK *in vivo* wahrscheinlich die wichtigere Rolle innerhalb des Zuckerstoffwechsels. Eine PPi-abhängige Phosphofruktokinase wurde erstmalig in dem einzelligen Parasiten *Entamoeba histolytica* entdeckt und seit dem in verschiedenen Bacteria, Archaea und Pflanzen nachgewiesen (Mertens, 1991). Bis heute ist die physiologische Funktion dieser Enzymklasse nicht vollständig verstanden, allerdings werden PPi-PFKs bereits mit Glykolyse und Anaerobiose assoziiert (Mertens, 1991). Da die PPi-PFK Pyrophosphat statt ATP zur Phosphorylierung von Fructose-6-phosphat nutzt, kann so innerhalb des EMP-Wegs ein ATP für die zweite Phosphorylierung des Zuckers eingespart werden. Da PPi vor allem als Nebenprodukt von verschiedenen, vor allem konzentrationsabhängigen Gleichgewichtsreaktionen, wie z.B. der DNA- und RNA-Synthese,

entsteht, muss es im Normalfall von der Zelle abgebaut werden, um die Reversibilität der Reaktionen zu unterbinden bzw. das Reaktionsgleichgewicht in Richtung der Polymerisierung zu verschieben (Kukko and Heinonen, 1982; Heinonen, 2013a; Heinonen, 2013b). Dies geschieht vor allem über Pyrophosphatasen, die PPi teilweise in anorganisches Phosphat umwandeln (Baykov *et al.*, 2013). Die Nutzung von PPi zur Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat stellt somit eine sehr effiziente und ressourcenschonende Energieeinsparung für die Zelle dar. Grundvoraussetzung hierfür ist allerdings eine durch die Biosynthese von Makromolekülen gedeckte intrazelluläre PPi-Bildungsrate, die den glykolytischen Fluss des EMP-Wegs ausreichend mit dem Diphosphat versorgt. Zwar wurde dies für *P. copri* zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht bestimmt, allerdings liegt die intrazelluläre PPi-Konzentration von Prokaryoten in der Regel im Bereich von 1 bis 10 mM (Mijakovic *et al.*, 2002; Heinonen, 1974; Keltjens *et al.*, 1988). Da der Km-Wert der PPi-PFK (PREVCOP\_03899) für PPi bei 0,08 mM liegt (persönliche Mitteilung Laura Garschagen, IfMB, Universität Bonn 2016), befindet sich die intrazelluläre PPi-Konzentration durch die Bildung von Makromolekülen (vor allem in der exponentiellen Wachstumsphase) vermutlich auch bei *P. copri* im Sättigungsbereich des Enzyms. Dies gewährleistet, dass die grundsätzlich reversible Reaktion aufgrund des chemischen Gleichgewichts in die glykolytische Richtung verläuft (Mertens, 1991). In diesem Zusammenhang ist möglicherweise auch das Vorhandensein einer zusätzlichen ATP-PFK von Bedeutung. Je nachdem wieviel PPi tatsächlich für die Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zur Verfügung steht, kann die Zelle also auch über die ATP-PFK den EMP-Weg aufrechterhalten und kompensiert somit eventuelle Schwankungen in der Substratverfügbarkeit der PPi-PFK. Der hybride Einsatz von zwei unterschiedlichen PFKs hat also womöglich eine regulatorische Funktion innerhalb des Stoffwechselwegs und ermöglicht gleichzeitig eine nennenswerte Einsparung an ATP.

Zusätzlich existiert wahrscheinlich eine weitere Funktion der PPi-PFK, die mit dem glykolytischen Abbau von Pentosen zusammenhängt und im Folgenden näher betrachtet wird. Wie bereits in **Kapitel 4.2** erwähnt, besitzt *P. copri* keinen vollständigen oxidativen PPP, da dem Bakterium die Gene der notwendigen Schlüsselenzyme Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase fehlen. Außerdem besitzt *P. copri* das Gen der Transaldolase nicht, sodass der nicht-oxidative Teil des klassischen PPP ebenfalls unvollständig vorliegt. Da der Organismus allerdings auf den Abbau von pflanzlichen Polysacchariden spezialisiert ist, und ein beachtlicher Teil an Ballaststoffen aus C5-Körpern und Pentose-haltigen Seitenketten aufgebaut ist (z.B. Xylan und Pectin), muss *P. copri* eine Möglichkeit besitzen Pentosen zu verstoffwechseln. Interessanterweise existiert ein ähnliches Phänomen in *E. histolytica*, in dem ursprünglich auch die PPi-PFK entdeckt wurde (Mertens, 1991). In diesem



Organismus umgeht die Zelle die Reaktion der Transaldolase, indem die P<sub>Pi</sub>-PFK Seduheptulose-7-phosphat zu Seduheptulose-1,7-bisphosphat phosphoryliert, welches anschließend über die Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase des EMP-Wegs zu Erythrose-4-Phosphat und DHAP umgewandelt wird (Stincone *et al.*, 2015). Diese alternativen Schritte stellen Reaktionen dar, die normalerweise innerhalb des Calvin-Zyklus revers ablaufen und dort Teil des sogenannten reduktiven Pentosephosphatwegs zur Regenerierung von Ribulose-5-phosphat sind. Aufgrund der ähnlichen Situation in *E. histolytica* ist es sehr wahrscheinlich, dass *P. copri* über eine solche alternative Form des PPP verfügt und die fehlende Reaktion der Transaldolase mit Hilfe der P<sub>Pi</sub>-PFK auf gleiche Weise umgangen wird. Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass dies tatsächlich der Fall ist (persönliche Mitteilung Laura Garschagen, IfMB, Universität Bonn, 2019). Bemerkenswerterweise besitzen viele Spezies der Darmflora (vor allem Bacteroidetes) ebenfalls eine P<sub>Pi</sub>-PFK aber simultan keine Transaldolase. Die alternative Form des PPP könnte somit innerhalb des Gastrointestinaltrakts einen weitverbreiteten Stoffwechselweg darstellen, der die Verstoffwechslung von Pentosen durch die Darmflora gewährleistet.

Für *P. copri* bedeutet ein funktionierender, wenn auch leicht abgewandelter PPP, dass Pentosen intrazellulär phosphoryliert und anschließend bis hin zu Fructose-6-phosphat und Glycerinaldehyd-3-phosphat umgelagert werden. Beide Substanzen können dann wie auch Hexosen über den EMP-Weg abgebaut werden. Als Dreh- und Angelpunkt des zentralen Metabolismus von *P. copri* werden so sämtliche Monosaccharide letztendlich zu PEP umgewandelt, von dem aus sich der Zentralstoffwechsel nach dem glykolytischen Abbau aufsplittet. Der respiratorische Bereich des Stoffwechsels beginnt hier mit der Carboxylierung von PEP zu OAA. Dieser Schritt ist aus zwei Gründen besonders wichtig für das Bakterium: Erstens leitet dieser Schritt die Bildung des einzigen Elektronenakzeptors der anaeroben Atmungskette von *P. copri* ein und zweitens generiert der Organismus an dieser Stelle ein ATP pro PEP. Würde der Organismus OAA erst vom Pyruvat ausgehend mit Hilfe einer Pyruvat-Carboxylase bilden, so wäre dieser ATP-Nettogewinn nicht gegeben, da eine Pyruvat-Carboxylase für die Katalyse dieser Reaktion ATP benötigen würde (Sauer and Eikmanns, 2005). Für den strikt anaeroben Organismus bedeutet jedoch jeder Zugewinn an ATP einen enormen Unterschied im Energiehaushalt, weil die Limitierung auf Fumarat als Elektronenakzeptor verhältnismäßig wenig Energie über die Elektronentransportphosphorylierung zur Verfügung stellt. Zum Vergleich hat das Paar Fumarat/Succinat ein deutlich negativeres Redoxpotenzial ( $E^{0'} = +30 \text{ mV}$ ) als z.B.  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  ( $E^{0'} = +0,82 \text{ V}$ ), wodurch die Kombination mit  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ( $E^{0'} = -0,32 \text{ V}$ ) oder  $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}_{\text{red}}$  ( $E^{0'} \approx -0,42 \text{ V}$ ) nur einer Änderung der freien Energie (**Gl. 10**) von  $\Delta G^{0'} = -67,55$  bzw.  $-86,85 \text{ kJ mol}^{-1}$  entspricht (Kröger *et al.*, 1992).

$$\text{Gl. 10} \quad \Delta G^{0'} = -n * F * \Delta E^{0'}$$

$n$  := Anzahl der Elektronen  
 $F$  := Faraday-Konstante  
 $\Delta E^{0'}$  := Differenz der Redoxpotentiale

Da sowohl NADH als auch  $\text{Fd}_{\text{red}}$  in der Atmungskette verwendet werden (siehe auch **Kapitel 4.2**), stehen also durchschnittlich  $\Delta G^{0'} = -77,2 \text{ kJ mol}^{-1}$  für die Bildung von ATP zur Verfügung. Weil Zellen unter anaeroben Bedingungen aber in der Regel nur maximal 50 % der freien Energie zur Phosphorylierung von ADP verwenden können, erzeugt die Fumaratatmung von *P. copri* je nach intrazellulärem Zustand der Zelle und einem Energiebedarf von etwa  $44 \text{ kJ mol}^{-1}$  ATP vermutlich weniger als 0,44 ATP pro Elektron (Thauer *et al.*, 1977; Kröger *et al.*, 1992; Kröger *et al.*, 2002). Mit Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor wäre es mehr als doppelt so viel (Kröger *et al.*, 2002). Entsprechend wichtig sind Reaktionen der Substratkettenphosphorylierung wie die der PEP-Carboxykinase für den gesamten Energiehaushalt von *P. copri*.

Nebenbei stellt die Carboxylierungsreaktion an dieser Stelle den gesamten  $\text{CO}_2$ -Bedarf des Zentralstoffwechsels dar. Die  $\text{CO}_2$ -Fixierung ist notwendig, um den C4-Körper des terminalen Elektronenakzeptors aufzubauen und somit essenziell für die anaerobe Fumaratatmung (Kröger *et al.*, 1992). Die anschließenden Reaktionen dienen dann nur noch der Umwandlung von OAA zu Fumarat, sind jedoch aufgrund der Reversibilität der Reaktion der PEP-Carboxykinase auch für die Ausrichtung des chemischen Gleichgewichts entscheidend. Schlussendlich wird innerhalb der Atmungskette von *P. copri* das gebildete Fumarat zu Succinat reduziert, welches in das umliegende Medium abgegeben wird und so das Ende des respiratorischen Abschnitts markiert. Im Vergleich zur Konkurrenz-Gattung *Bacteroides* stellt dies einen großen Unterschied dar, denn in *Bacteroides* spp. existiert noch die Möglichkeit, Succinat durch die Aktivierung zu Succinyl-CoA und wenigen Folgereaktionen in Propionat umzuwandeln (Reichardt *et al.*, 2014). Dabei wird zum einen der zuvor aufgebaute C4-Körper des Succinats wieder decarboxyliert, wodurch der  $\text{CO}_2$ -Verbrauch des respiratorischen Abschnitts ausgeglichen wird, und zum anderen wird die Energie der Decarboxylierung in Form eines über die Cytoplasmamembran verlaufenden elektrochemischen Natriumionengradienten konserviert (Reichardt *et al.*, 2014). *P. copri* fehlt dieser Stoffwechselweg und das Bakterium schöpft somit das energetische Potenzial seines Endprodukts Succinat nicht weiter aus. Im Zusammenhang mit Prädominanz und Konkurrenz von intestinalen Bakterien können solche feinen Unterschiede wahrscheinlich durchaus große Auswirkungen haben.

Der fermentative Bereich des Zentralstoffwechsels von *P. copri* beginnt ebenfalls beim PEP und wird durch die Dephosphorylierungsreaktion der Pyruvatkinase gestartet. Hierbei wird die

Energie des PEP genutzt, um ATP zu generieren und es entsteht Pyruvat als zweite Schlüsselsubstanz des Stoffwechsels. Von hier aus wird über eine Verkettung von Enzymreaktionen Acetat gebildet, in deren Verlauf über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase  $Fd_{red}$  entsteht. Da die Menge an im EMP-Weg gebildetem NADH ausreicht, um sowohl die Bildung von Fumarat als auch den Antrieb der Atmungskette mit anschließender Succinatbildung zu gewährleisten, dienen die im fermentativen Abschnitt gebildeten Reduktionsäquivalente in Form von  $Fd_{red}$  theoretisch exklusiv den Biosynthesen im Zuge des Anabolismus von *P. copri*. Das bei der Decarboxylierungsreaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase freigesetzte  $CO_2$  vermindert zudem den  $CO_2$ -Bedarf des Zentralstoffwechsels. Bei einer eins-zu-eins Verteilung des metabolischen Flusses auf den respiratorischen und fermentativen Abschnitt des Zentralstoffwechsel und bei einem gleichzeitig perfekt ausgeglichenen Redox-Haushalt der Zelle, ließe sich theoretisch der  $CO_2$ -Bedarf der PEP-Carboxykinase mit Hilfe der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase sogar stöchiometrisch exakt decken. Tatsächlich sorgt jedoch vermutlich gerade der Redox-Haushalt dafür, dass eben dies nicht geschieht (siehe **Kapitel 4.2.6**). Erkennbar ist dieser Effekt auch anhand der Anwesenheit eines zweiten wichtigen Enzyms des fermentativen Abschnitts: Der Pyruvat-Formiat-Lyase. Dieses Enzym erzeugt Acetyl-CoA aus Pyruvat und bildet zusätzlich Formiat als eines der metabolischen Endprodukte von *P. copri*. Die Pyruvat-Formiat-Lyase erzeugt weder  $CO_2$  noch Reduktionsäquivalente, was entscheidend für den gesamten Metabolismus des Bakteriums ist. Denn Formiat dient dem Organismus durch die Bildung von Acetyl-CoA ohne  $Fd_{red}$  als indirekter *redox sink*, der einen Überschuss an Reduktionsäquivalenten verhindert und so die Aufrechterhaltung des Metabolismus gewährleistet. Die Produktion von Formiat ist somit direkt an die Ausbalancierung des Redox-Haushalts gekoppelt, sorgt aber gleichzeitig dafür, dass die  $CO_2$ -Bilanz des Zentralstoffwechsels einen negativen Wert erhält (siehe hierfür auch **Kapitel 4.2.6**). Im Gesamtbild des Zentralstoffwechsels wird somit klar, dass der Nettobedarf an  $CO_2$  in *P. copri* vor allem durch den  $CO_2$ -Bedarf des respiratorischen Abschnitts und die notwendige Ausbalancierung des Redox-Haushalts durch die Bildung von Formiat entsteht.

Insgesamt ähnelt das Grundgerüst des cytoplasmatischen Zentralstoffwechsels von *P. copri* denen von *Bacteroides* spp. Im Vergleich weist *P. copri* jedoch eine fast schon minimalistische enzymatische Ausstattung auf, die im Grunde nur auf die nötigsten Elemente des *Bacteroides*-Zentralstoffwechsels reduziert ist (siehe auch **Kapitel 4.2**). Der zentrale Metabolismus von *P. copri* ist somit ein fein abgestimmtes System, das wahrscheinlich im Gegenzug wenig Flexibilität ermöglicht. Im Kontext darmmikrobiotischer Konkurrenz könnte dies bedeutet, dass *P. copri* nur unter eng definierten Bedingungen den Dickdarm besiedeln kann, dies jedoch dann sehr erfolgreich tut. *P. copri* als dominante Spezies, spezialisiert auf bestimmte Bedingungen des

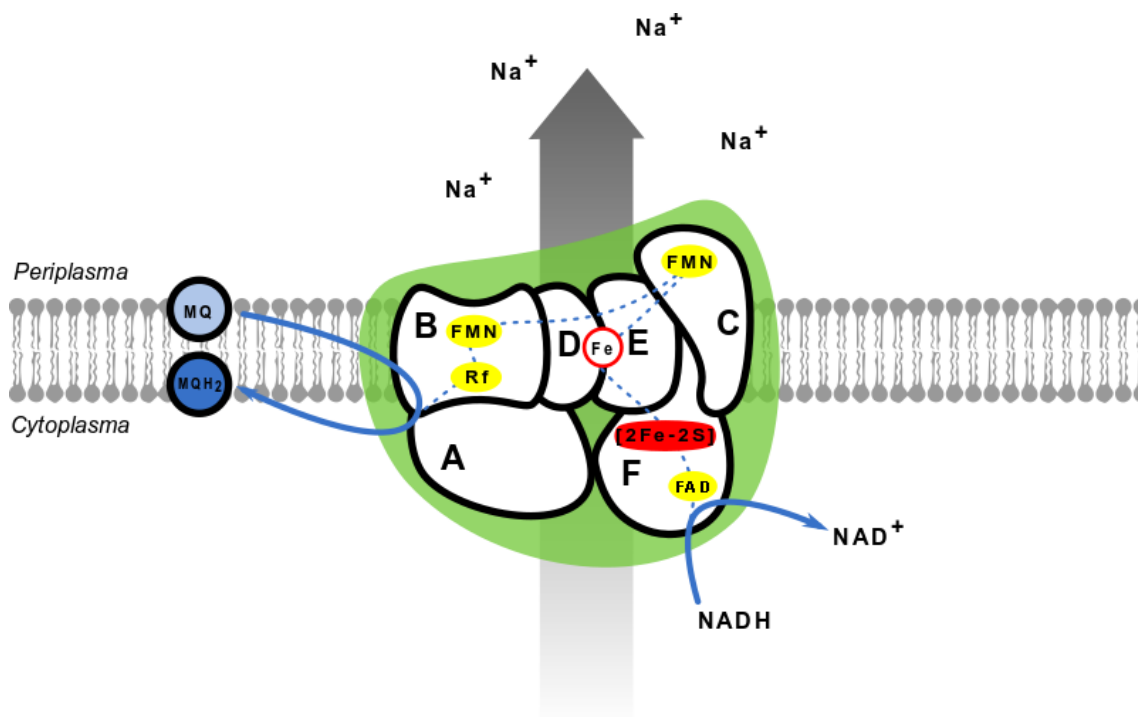
Colons, kann damit als eine Art Sichtfenster genutzt werden, um die Entstehung der distinkten Enterotypen und deren Darmflorazusammensetzung innerhalb des menschlichen Colons besser zu verstehen.

#### 5.4 Die Atmungskette von *P. copri*

Neben dem cytoplasmatischen Teil des Zentralstoffwechsels besitzt *P. copri* eine anaerobe Atmungskette, die aus insgesamt 6 Transmembrankomplexen besteht: (1) Nqr, (2) „kopfloste“ NDHI, (3) Fumaratreduktase, (4) Rnf, (5) Cytochrom-bd-chinoxidase und (6) F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase. Die Elektronen der im Cytoplasma fixierten Reduktionsäquivalente werden über die Nqr und den „kopflosten“ NDHI-Komplex in die Atmungskette geschleust und auf Menachinon übertragen, womit sie für die Fumaratreduktase zur Verfügung stehen. Letztere überträgt die Elektronen terminal auf Fumarat als Elektronenakzeptor und es entsteht Succinat, das als Endprodukt in das umliegende Medium der Zelle abgegeben wird. Durch die Übertragung der Elektronen von den Reduktionsäquivalenten auf Fumarat wird außerdem Energie konserviert, indem die Nqr Natriumionen und der „kopfloste“ NDHI-Komplex Protonen über die Cytoplasmamembran translozieren. Der elektrochemische Ionengradient aus Na<sup>+</sup> und H<sup>+</sup> wird anschließend von der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase genutzt, um ADP zu phosphorylieren. Zuvor müssen hierfür jedoch die translozierten Na<sup>+</sup> gegen H<sup>+</sup> ausgetauscht werden, da die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase von *P. copri* protonenabhängig ist (siehe **Kapitel 4.2.4**). Hierfür benutzt *P. copri* vermutlich einen Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antiporter. Der wahrscheinlichste Kandidat hierfür ist ein NhaD-Typ Antiporter, der von dem Gen PREVCOP\_04139 codiert wird, welches wiederum im Genom von *P. copri* unmittelbar neben dem Gencluster der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase liegt. In der Transkriptomanalyse des Organismus besaß die zugehörige RNA dieses Gens zudem einen ähnlich hohen RPKM-Wert wie die Transkripte der Atmungskettengene. Dabei stellt die zusätzliche Nutzung von Natriumionen bei der Energiekonservierung möglicherweise eine Anpassung an den Lebensraum „Colon“ dar, in welchem z.B. leicht erhöhte pH-Werte und Gallensalze als natürliche Protonophore den Aufbau eines elektrochemischen Protonengradienten erschweren können (Dibrov *et al.*, 2017; Carey, 1984; Mulkidjanian *et al.*, 2008). Insgesamt sind solche Natriumionen-Kreisläufe in Darmorganismen allerdings noch nicht verstanden, sodass auch bei *P. copri* die genaue ökologische Funktion der Nqr nicht klar ist (Deusch *et al.*, 2019; Dibrov *et al.*, 2017).

Die Na<sup>+</sup>-translozierende NADH:Chinon-Oxidoreduktase (Nqr) besteht aus den sechs Untereinheiten NqrABCDEF (**Abb. 43**) (Steuber *et al.*, 2015). Während NqrBDE integrale Membranproteine darstellen und NqrF und NqrC mit Membranankern in der Cytoplasmamembran befestigt sind, besitzt NqrA als einzige Untereinheit des Komplexes keine

Transmembranhelix und ist nur über NqrB mit der Membran assoziiert (Steuber *et al.*, 2015). Katalysiert wird die Oxidation von NADH an NqrF und die Elektronen werden über insgesamt sechs Redox-Co-Faktoren (Flavine und Eisen-Schwefel-Cluster) an NqrA auf Menachinon übertragen, wobei die exergone Reaktion genutzt wird, um durch NqrB  $2\text{Na}^+/2\text{e}^-$  über die Cytoplasmamembran in das Periplasma zu translozieren (Steuber *et al.*, 2015). Damit besitzt die Nqr einen grundsätzlich anderen Aufbau als z.B. die NDHI (als ebenfalls NADH-oxidierendes Pendant) und ähnelt strukturell eher dem Rnf-Komplex (Steuber, 2001; Steuber *et al.*, 2015; Westphal *et al.*, 2018). Tatsächlich geht man sogar davon aus, dass sich die Nqr aus dem Rnf-Komplex als ursprünglichem Vorläufer entwickelt hat (Reyes-Prieto *et al.*, 2014). Die Nqr kommt in vielen Gram-negativen Prokaryoten vor, insbesondere in marinen Organismen (Steuber, 2001). Doch auch in einer Vielzahl von Säugetier-assoziierten Darmbewohnern lässt sich dieser Membrankomplex finden (Deusch *et al.*, 2019). In *P. copri* ist die Nqr von essenzieller Bedeutung, da der Membrankomplex die einzige Möglichkeit zur Einspeisung von Elektronen aus NADH in die anaerobe Atmungskette darstellt. Somit ist die Nqr ein wesentlicher Bestandteil der Energiekonservierung des Bakteriums.



**Abb. 43: Aufbau der Na<sup>+</sup>-translozierenden NADH:Chinon-Oxidoreduktase (Nqr).** A-F markieren die Untereinheiten NqrA-F, Rf = Riboflavin, FMN = Flavinmononukleotid, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid, Fe = Eisen, [2Fe-2S] = 2-Eisen-2-Schwefel-Cluster, MQ = Menachinon, MQH<sub>2</sub> = Menachinol. Der gestrichelte Pfad zeigt den schematischen Elektronenfluss im Enzymkomplex. Der graue Pfeil stellt die Na<sup>+</sup>-Translokation dar.

Interessanterweise besitzt *P. copri* einen nicht-kanonischen NDHI-Komplex, welcher aus nur 11 Untereinheiten besteht. In Mitochondrien und vielen Prokaryoten existiert die Protonen-translozierende NADH:Chinon-oxidoreduktase (NDHI; Komplex I) aus den insgesamt 14

Untereinheiten NuoABCDEFGHIJKLMN, die drei Module ausbilden (Friedrich and Scheide, 2000; Berrisford *et al.*, 2016). Der erste Teil des Enzymkomplexes wird als N-Modul, oder auch „Kopf“ bezeichnet und besteht aus den drei Untereinheiten NuoE, NuoF und NuoG. Dieser Teil des Enzyms ist über das Q-Modul, bestehend aus NuoBCDI, mit dem P-Modul verbunden, das aus den restlichen Untereinheiten aufgebaut ist (Berrisford *et al.*, 2016). Das N-Modul dient als Elektroneneinspeisungsmodul und besitzt die Dehydrogenasefunktion, die im kanonischen Enzymkomplex NADH zu NAD<sup>+</sup> oxidiert (Berrisford *et al.*, 2016). Über ein FMN und verschiedene Eisen-Schwefel-Cluster werden die so freigesetzten Elektronen auf die Eisen-Schwefel-Cluster des Q-Moduls übertragen, die anschließend ein Chinon in der Cytoplasmamembran reduzieren (Berrisford *et al.*, 2016). Das P-Modul wiederum dient als Membrananker des Proteinkomplexes und transloziert durch Konformationsänderungen, die während der Katalyse des Enzyms erfolgen, Protonen über die Membran (Berrisford *et al.*, 2016). Da *P. copri* NuoEFG nicht besitzt, fehlt dem NDHI-Komplex das Elektroneneinspeisungsmodul und der Organismus kann an dieser Stelle NADH nicht zu NAD<sup>+</sup> oxidieren (Abb. 44).

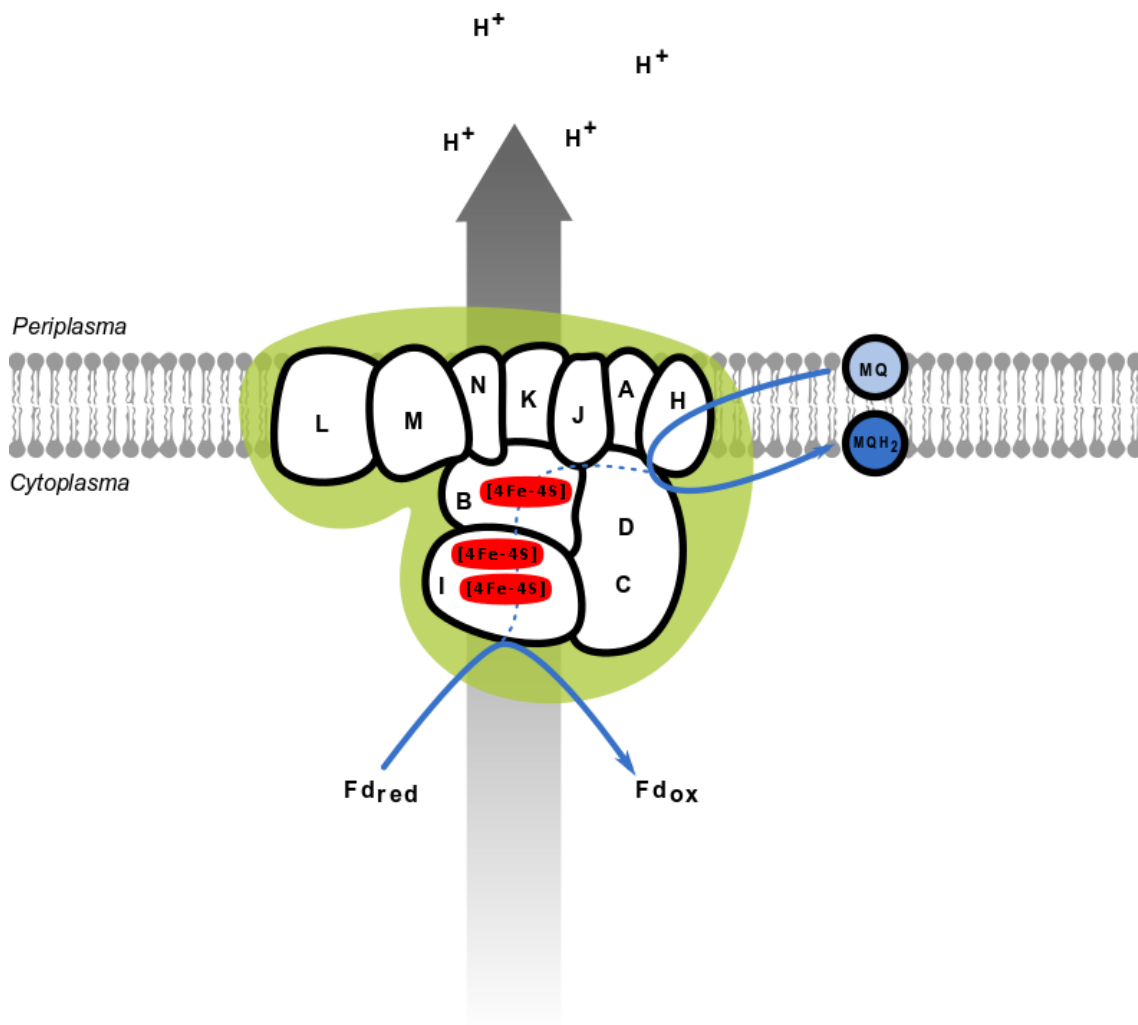


Abb. 44: Aufbau der „kopflosten“ H<sup>+</sup>-translozierenden NADH:Chinon-Oxidoreduktase (NDHI). A-N markieren die Untereinheiten NuoA-N. NuoEFG fehlen in der „kopflosten“ Variante des Enzymkomplexes. Fd<sub>red</sub>/Fd<sub>ox</sub>

= reduziertes bzw. oxidiertes Ferredoxin, [4Fe-4S] = 4-Eisen-4-Schwefel-Cluster, [2Fe-2S] = 2-Eisen-2-Schwefel-Cluster, MQ = Menachinon, MQH<sub>2</sub> = Menachinol. Der gestrichelte Pfad zeigt den schematischen Elektronenfluss im Enzymkomplex. Der graue Pfeil symbolisiert die H<sup>+</sup>-Translokation.

Tatsächlich existieren in der Natur zwei weitere Formen des Komplex I, die innerhalb verschiedener Organismengruppen weit verbreitet sind (Moparthy and Hägerhäll, 2011; Efremov and Sazanov, 2012). Die erste Version besteht in der Regel aus nur 12 Untereinheiten, wobei das Q- und das P-Modul konserviert sind, aber das N-Modul durch ein alternatives Elektroneneinspeisungsmodul ersetzt ist. Ein Beispiel hierfür ist der Fpo-Komplex, der innerhalb der Archaea existiert und mit Hilfe der alternativen „Kopf“-Untereinheit FpoF den Elektronendonator F<sub>420</sub>H<sub>2</sub> statt NADH oxidiert. So z.B. in dem methanogenen Archaeon *Methanosarcina mazei* (Welte and Deppenmeier, 2011b). Alternative Elektroneneinspeisungsmodule gibt es jedoch auch in z.B. ε-Proteobakterien wie *Campylobacter jejuni*. Diesem Bakterium fehlen die Gene für NuoE und NuoF, wobei die beiden Untereinheiten durch zwei neue, funktionell andersartige Proteine, NuoX und NuoY, ersetzt sind (Weerakoon and Olson, 2008). Auch wenn hier die physiologische Funktion des alternativen Komplex I noch nicht geklärt werden konnte, zeigen neuere Erkenntnisse, dass NuoX und NuoY vermutlich mit FADH (bzw. einem FAD-haltigen Elektronendonator) interagieren (Calderon-Gomez *et al.*, 2017). Da im zentralen Energiestoffwechsel von *C. jejuni* NADH kaum eine Rolle spielt (Weerakoon and Olson, 2008), ist das alternative „Kopf“-Modul eine entsprechende Anpassung und zeigt die Flexibilität des modularen Aufbaus vom Komplex I. Abgesehen von alternativen Elektroneneinspeisungsmodulen gibt es noch eine weitere Variante von Komplex I, die nur 11 Untereinheiten besitzt, und zu denen auch der Enzymkomplex von *P. copri* zählt. Hier besteht der Komplex I ebenfalls aus dem Q- und P-Modul, wohingegen NuoEFG fehlt. Allerdings lässt sich in diesem Fall kein alternativer „Kopf“ finden, der das N-Modul funktionell ersetzt (Efremov and Sazanov, 2012). Diese „kopfloze“ Variante stellt vermutlich den ursprünglichen Vorläufer des kanonischen NDHI-Komplexes dar, welcher erst nachträglich im Laufe der Evolution und in zwei Schritten die Untereinheiten NuoG und anschließend NuoEF als N-Modul akquirierte (Moparthy and Hägerhäll, 2011). Komplex I-Derivate ohne „Kopf“ existieren in vielen Bakterien, Archaeen und den Thylakoidmembranen von Chloroplasten (Efremov and Sazanov, 2012; Moparthy and Hägerhäll, 2011). Es wird generell angenommen, dass diese Komplex I-Varianten den Elektronendonator Ferredoxin oxidieren, was bspw. für Cyanobakterien jüngst bestätigt werden konnte (Schuller *et al.*, 2019). Auch bei den methanogenen Archaeen *Methanosaeta thermoacetophila* und *Methanomassiliococcus luminyensis* konnte eine Oxidation von Fd<sub>red</sub> durch den Fpo-Komplex ohne FpoF gezeigt werden (Welte and Deppenmeier, 2011a; Kröninger *et al.*, 2019). Aufgrund der Homologien ist es sehr wahrscheinlich, dass auch der „kopfloze“ NDHI-Komplex von *P. copri* Fd<sub>red</sub> als Elektronendonator verwendet. Entsprechend müsste der Komplex

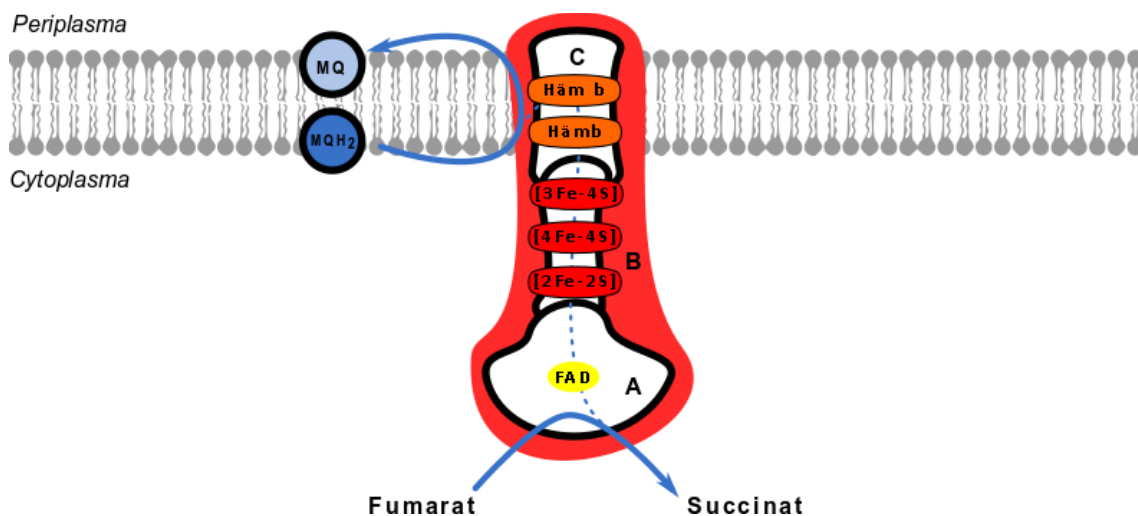
korrekterweise als „Protonen-translozierende Ferredoxin:Chinon-Oxidoreduktase“ bezeichnet werden.

Insgesamt sind solche „kopflösen“ Komplex I-Derivate innerhalb des menschlichen Gastrointestinaltrakts vermutlich bemerkenswert häufig anzutreffen, da die Gene für NuoEFG z.B. innerhalb der Bacteroidetes und auch Firmicutes bis jetzt nicht gefunden werden konnten (Moparthi and Hägerhäll, 2011). Da *P. copri* und eben auch viele andere Darmbewohner innerhalb des Zentralstoffwechsels  $Fd_{red}$  generieren, ist die Verwendung dieses Elektronenüberträgers in der anaeroben Atmungskette eine logische Konsequenz. Darüber hinaus entspricht der Unterschied in den Redoxpotentialen von  $NAD^+/NADH$  ( $E^{0'} = -0,32$  V) und  $Fd_{ox}/Fd_{red}$  ( $E^{0'} \approx -0,42$  V) ungefähr  $-19,3$  kJ/mol (Biegel *et al.*, 2011), wodurch die Verwendung von Ferredoxin theoretisch mehr Energie für die anaerobe Atmungskette liefert. Ob „kopflöse“ Komplex I-Derivate jedoch auch entsprechend mehr Energie in Form von translozierten Protonen konservieren, ist bisher nicht bekannt und nach aktuellem Stand eher unwahrscheinlich, da hierfür ein weiterer funktionaler Protonenkanal im P-Modul notwendig wäre. Zwar gibt es Hinweise darauf, dass es Komplex I-Varianten ohne das kanonische N-Modul gibt, die ein zweites NuoM und eine verlängerte amphipathische, transversale Helix von NuoL (notwendig für die konformationsabhängige Protonen-Translokation) im P-Modul besitzen, und somit theoretisch Protonen mit einer Stöchiometrie von 5 statt  $4H^+/2e^-$  translozieren können, allerdings wurde die Funktionalität dieser Modifikation experimentell noch nicht bestätigt (Chadwick *et al.*, 2018). Zudem ließ sich die hier beschriebene typische Dopplung von *nuoM* und die Sequenzverlängerung der transversalen Helix von *nuoL* im Gencluster des NDHI-Komplexes bei *P. copri* nicht wiederfinden. Da es bei der theoretischen Translokationsstöchiometrie außerdem auch auf das Redoxpotential des genutzten Menachinons ankommt, ist es denkbar, dass *P. copri* durch die Nutzung von Ferredoxin lediglich das notwendige Energieniveau für  $4H^+/2e^-$  einhält. Dennoch stellt der „kopflöse“ Komplex I damit insgesamt den effizientesten Membrankomplex der anaeroben Atmungskette von *P. copri* dar. Zum Vergleich transloziert die Nqr als zweites elektroneneinspeisendes Enzym lediglich die Hälfte an Ionen pro zwei Elektronen über die Cytoplasmamembran (Steuber, 2001).

Übertragen werden die Elektronen in der anaeroben Atmungskette von *P. copri* letztlich auf Fumarat. Die Reduktion von Fumarat zu Succinat geschieht dabei an der Fumaratreduktase des Organismus. Der Enzymkomplex besteht insgesamt aus drei Untereinheiten, wobei Untereinheit C den Komplex in der Membran verankert (Abb. 45)(Lancaster *et al.*, 1999). In Untereinheit C befinden sich außerdem zwei Häm b, die die Elektronen von Menachinol entgegennehmen, die dann wiederum über mehrere Eisen-Schwefel-Cluster der Untereinheit B zum Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) des katalytischen Kopfes (Untereinheit A) des Enzyms



transportiert werden (Iverson *et al.*, 1999; Lancaster *et al.*, 1999; Kröger *et al.*, 2002). Untereinheit A überträgt anschließend die Elektronen auf Fumarat, wodurch Succinat entsteht. Die Fumaratreduktase stellt in *P. copri* den terminalen Enzymkomplex der anaeroben Atmungskette dar und ist damit essenziell für den Organismus. Aufgrund des relativ ungeschützten Flavins in der Untereinheit A ist die Fumaratreduktase in *Bacteroides* spp. bei Kontakt mit O<sub>2</sub> außerdem ein ursächlicher Grund für die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), weswegen der Enzymkomplex zusammen mit z.B. der sehr ROS-empfindlichen Fumarase oder Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase hauptverantwortlich für die strikte Anaerobiose des Phylums ist (Meehan and Malamy, 2012; Pan and Imlay, 2001).



**Abb. 45: Aufbau der Fumaratreduktase.** A, B und C markieren die Untereinheiten A bis C des Enzymkomplexes. [4Fe-4S] = 4-Eisen-4-Schwefel-Cluster, [3Fe-4S] = 3-Eisen-4-Schwefel-Cluster, [2Fe-2S] = 2-Eisen-2-Schwefel-Cluster, MQ = Menachinon, MQH<sub>2</sub> = Menachinol, FAD = Flavin-Adenin-Dinukleotid. Der gestrichelte Pfad zeigt den schematischen Elektronenfluss im Enzymkomplex.

Neben der funktionellen Einheit aus „kopfflosem“ NDHI-Komplex, Nqr, Fumaratreduktase und F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPsynthase besitzt *P. copri* zwei weitere Enzymkomplexe, die Teil der Atmungskette sind. Der Rnf-Komplex und die Cytochrom-bd-Chinoloxidase. Der Rnf-Komplex weist evolutiv gesehen ein nahes Verwandtschaftsverhältnis zur Nqr auf und besteht ebenso wie dieser Enzymkomplex aus 6 Untereinheiten (Reyes-Prieto *et al.*, 2014; Hess *et al.*, 2013). Der Komplex überträgt Elektronen von Fd<sub>red</sub> auf NAD<sup>+</sup> und nutzt die Differenz der Redoxpotentiale, um Natriumionen über die cytoplasmatische Membran zu translozieren. Er stellt z.B. in dem acetogenen Bakterium *Acetobacterium woodii* den einzigen energiekonservierenden Transmembrankomplex in der sehr minimalistischen Atmungskette dieses Organismus dar (Schuchmann and Müller, 2014). In *P. copri* trägt der Komplex somit theoretisch ebenso zur Energiekonservierung bei. Tatsächlich waren in *P. copri* die Transkriptionslevel aller zugehörigen Gene jedoch bei den in dieser Arbeit untersuchten Bedingungen so niedrig, dass hier eine zentrale Funktion in der Atmungskette des Bakteriums ausgeschlossen werden kann.

Prinzipiell ist die vom Rnf-Komplex katalysierte Reaktion jedoch reversibel, sodass unter Energieverbrauch Ferredoxin auch mit Hilfe von NADH reduziert werden kann (Hess *et al.*, 2013). In *A. woodii* spielt diese Tatsache sogar unter physiologischen Bedingungen eine Rolle, da der Organismus bei Substraten mit niedrigem Energiegehalt die reverse Reaktion katalysieren muss, um seinen Redoxhaushalt zu regulieren und  $\text{Fd}_{\text{red}}$  für bspw. Biosynthesen zur Verfügung stellen zu können (Westphal *et al.*, 2018). Es ist folglich denkbar, dass *P. copri* den Rnf-Komplex als Redoxregulator verwendet, um, je nachdem welche Form von Reduktionsäquivalenten für zellinterne Prozesse benötigt wird, NADH und  $\text{Fd}_{\text{red}}$  ineinander umwandeln zu können.

Der letzte Enzymkomplex der Atmungskette von *P. copri* ist die Cytochrom-bd-Chinioxidase. Grundsätzlich besteht dieses Enzym aus zwei transmembranen Untereinheiten, die insgesamt zwei b-Typ Häme und ein d-Typ Häm enthalten (Borisov *et al.*, 2011). Die Oxidase überträgt Elektronen von einem Chinol (hier Menachinol) auf molekularen Sauerstoff, wodurch zusammen mit Protonen Wasser entsteht. Obwohl der Transmembrankomplex keine Protonen pumpt, erzeugen die skalaren Reaktionen von Chinol-Oxidation und Sauerstoff-Reduktion gleichzeitig einen Protonengradienten über der cytoplasmatischen Membran, wodurch sich das Enzym auch an dem Aufbau des elektrochemischen Protonengradienten beteiligt und somit einen direkten Beitrag zur ATP-Bildung leistet (Giuffrè *et al.*, 2014; Borisov *et al.*, 2011). Die Cytochrom-bd-Chinioxidase bietet *P. copri* damit theoretisch die Möglichkeit Sauerstoff als alternativen Elektronenakzeptor in der Atmungskette zu verwenden, der theoretisch auch noch mehr ATP liefert als Fumarat. Zwar konnte das Enzym in *P. copri* in der vorliegenden Arbeit weder auf Transkript- noch auf Proteinebene detektiert werden, allerdings wurden die entsprechenden Experimente auch unter strikt anoxischen Bedingungen durchgeführt. Es ist also denkbar, dass *P. copri* in einem Milieu mit nanomolaren Sauerstoffkonzentrationen die Gene der Cytochrom-bd-Chinioxidase transkribiert und das Enzym als Ersatz für die Fumaratreduktase nutzt. In diesem Fall würde *P. copri* tatsächlich zu der von Baughn and Malamy, (2004) definierten Gruppe der „nanoaerophilen“ Bakterien zählen.

Obwohl die Verwendung von Sauerstoff bei einem ansonsten obligaten Anaerobier zunächst paradox erscheint, gibt es jedoch entscheidende Vorteile, die z.B. bereits bei der artverwandten Gattung *Bacteroides* gezeigt werden konnten (Baughn and Malamy, 2004). Zum einen existiert im Gegensatz zur allgemeinen Wahrnehmung tatsächlich Sauerstoff im Dickdarm des Menschen, der als niedrigkonzentrierter Diffusionsgradient vom durchbluteten Gewebe der Peripherie bis hin zum vollständig anoxischen Darmlumen reicht (Pocevičute and Ismagilov, 2019; Albenberg *et al.*, 2014). Die Nutzung von nanomolaren Konzentrationen an Sauerstoff, vor allem im Bereich der Mucusschicht, bietet somit wahrscheinlich einen bemerkenswerten Wachstumsvorteil gegenüber Organismen ohne Chinioxidase (Baughn and Malamy, 2004).

Besonders relevant ist diese Eigenschaft vermutlich in längeren Hungerphasen, in denen die Mucusschicht selbst als letzte verbleibende Nahrungsquelle der Darmflora dient und entsprechend stärker besiedelt wird (Albenberg *et al.*, 2014; Tailford *et al.*, 2015). Des Weiteren besitzt die Cytochrom-bd-Chinoloxidase nicht nur eine hohe Affinität gegenüber  $O_2$ , sondern auch gegenüber  $H_2O_2$ , und zeigt außerdem „Catalase/Peroxidase“-Aktivität (Giuffrè *et al.*, 2014; Al-Attar *et al.*, 2016). Vermutlich ist der Abbau von  $H_2O_2$  allerdings auf die chemische Reaktion mit den Häm-Gruppen des Enzyms zurückzuführen und nicht durch aktive Katalyse (Giuffrè *et al.*, 2014). Dennoch dient die Oxidase damit prinzipiell auch der Entgiftung von ROS (Giuffrè *et al.*, 2014). Man kann daher davon ausgehen, dass die Cytochrom-bd-Chinoloxidase generell die Resilienz des Organismus gegenüber kurzfristiger Sauerstoff-Exposition erhöht. Bedeutend ist dies z.B. bei der Neubesiedelung eines Wirts, um die Situation bis zur vollständigen Anaerobiose zu überbrücken. Ebenso spielen ROS bei der intestinalen Abwehr von pathogenen Mikroorganismen eine Rolle, sodass durch das Immunsystem des Wirts durchaus bemerkenswerte ROS-Konzentrationen im Bereich der Mucose freigesetzt werden können (Craig and Slauch, 2009; Slauch, 2011; Miller and Britigan, 1997). In diesem Zusammenhang gilt die Cytochrom-bd-Chinoloxidase in manchen Fällen sogar als Pathogenitätsfaktor (Borisov *et al.*, 2011; Giuffrè *et al.*, 2014). Um nicht Opfer eines immunologischen Kollateralschadens zu werden, kann es daher auch für kommensale Mikroorganismen (wozu *P. copri* gezählt wird) erforderlich sein, selbst bei sonst anoxischen Standardbedingungen über ROS-abwehrende Enzyme zu verfügen. Der Besitz einer Cytochrom-bd-Chinoloxidase stellt damit vermutlich eine Anpassung vieler Darmbewohner dar, um mit den Herausforderungen des wechselhaften Habitats „Colon“ zurechtzukommen.

Damit besitzt *P. copri* theoretisch zwei Varianten seiner Atmungskette, die sich prinzipiell nur in der terminalen Reduktase unterscheiden müssen. Als funktionelle Einheit besteht die erste Variante aus Nqr, „kopflosem“ NDHI-Komplex und der Fumaratreduktase. Unter der Annahme, dass bei *P. copri* die Nqr Natriumionen im Verhältnis von  $Na^+/e^- = 1$  und der „kopflose“ NDHI Protonen im Verhältnis von  $H^+/e^- = 2$  pumpen (Steuber *et al.*, 2000; Dibrov *et al.*, 2017; Efremov and Sazanov, 2012), werden bei einer theoretischen 1:1-Umsetzung von NADH und  $Fd_{red}$  formal durchschnittlich 3 Ionen pro Fumaratreduktion (benötigt 2 Elektronen) transloziert. Da für die Phosphorylierung von ADP über die  $F_1F_0$ -ATP-Synthase wiederum 3-5 Protonen benötigt werden (Steigmiller *et al.*, 2008; Watt *et al.*, 2010; Stahlberg *et al.*, 2001), erzeugt die Reduktion von Fumarat in der anaeroben Atmungskette von *P. copri* insgesamt 0,6-1 ATP, was ungefähr dem aus den Redoxpotentialen berechneten, theoretischen Wert von 0,44 ATP/ $e^-$  (0,88 ATP pro Fumaratreduktion; siehe **Kapitel 5.3**) entspricht. Zum Vergleich bewirkt der Austausch der Fumaratreduktase gegen die Cytochrom-bd-Chinoloxidase in der zweiten Variante der

Atmungskette einen Anstieg der Effizienz der Ionentranslokation. Genauer, werden aufgrund der skalaren Reaktionen 2 zusätzliche Protonen pro  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  in den periplasmatischen Raum transportiert (Borisov *et al.*, 2011). Diese werden zu den 6 translozierten Ionen der Nqr und des „kopflosten“ NDHI-Komplexes hinzuaddiert, was bei insgesamt 8 translozierten Ionen  $\sim 2$  ATP entspricht. Berechnet man die gebildete ATP-Menge über die Redoxpotentiale von  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{Fd}_{\text{ox}}/\text{Fd}_{\text{red}}$  und  $\frac{1}{2}\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  ergibt sich ein ähnlicher Wert: So führt die Reaktion von  $\text{NADH}$  und  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  zu einer Änderung der freien Energie von  $\Delta G^{0'} = -220 \text{ kJ mol}^{-1}$  und die Reaktion von  $\text{Fd}_{\text{red}}$  und  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  zu einem  $\Delta G^{0'}$  von  $-347 \text{ kJ mol}^{-1}$ , weswegen im Durchschnitt eine Energie von  $\Delta G^{0'} = -283,5 \text{ kJ mol}^{-1}$  bei der Reduktion von  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  freigesetzt wird. Unter der Annahme, dass diese freie Energie nur zu etwa 50% genutzt werden kann, würde die Reduktion von  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  entsprechend zur Phosphorylierung von maximal 3,2 ADP führen (Thauer *et al.*, 1977). Da die Cytochrom-bd-Chinioxidase allerdings im Gegensatz zu vielen anderen terminalen Oxidasen nur zwei statt vier Protonen pro  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  transloziert und damit die freie Energie dieser Reaktion ineffizienter nutzt, werden effektiv wahrscheinlich nur  $\sim 2$  ATP durch diese Elektronentransportphosphorylierung generiert (Borisov *et al.*, 2011). Damit liegt in *P. copri* der direkte Unterschied zwischen Fumarat und  $\frac{1}{2}\text{O}_2$  als Elektronenakzeptor bei 1-2 ATP in Bezug auf die terminale Reduktion. Somit ist es zwar tatsächlich denkbar, dass *P. copri* einen Nettogewinn an ATP durch die Nutzung von nanomolarem Sauerstoff generiert, allerdings ist die Substratverfügbarkeit für die Cytochrom-bd-Chinioxidase generell deutlich seltener gegeben als bei der Fumaratreduktase, sodass der alternative Elektronenakzeptor vermutlich nur selten und situationsabhängig genutzt wird. Damit verbleiben Nqr, „kopfloster“ NDHI-Komplex und die Fumaratreduktase als die zentrale funktionelle Einheit der anaeroben Atmungskette innerhalb des zentralen Energiemetabolismus von *P. copri*.

### 5.5 Kohlenstoff- und Redoxbilanzen im zentralen Energie- und Kohlenstoffmetabolismus von *P. copri*

Das Leben auf der Erde folgt naturgemäß den gleichen thermodynamischen Prinzipien, weswegen die kleinste Einheit von Biomasse bei allen Organismen sehr ähnlich gestaltet ist und hauptsächlich aus den vier Elementen Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff und Wasserstoff besteht (Stockar and Liu, 1999). Aufgrund der relativ gleichbleibenden elementaren Zusammensetzung ergibt sich für Bakterien folgende durchschnittliche Einheit als universeller Baustein der Biomasse:  $\text{C}_1\text{H}_{1,66}\text{O}_{0,41}\text{N}_{0,21}$  (Stockar and Liu, 1999; Popovic, 2019). Auch die ermittelte Biomasseeinheit von *P. copri* besitzt sehr ähnliche Verhältnisse, die nur über geringfügig mehr Wasserstoff verfügt:  $\text{C}_1\text{H}_{1,79}\text{O}_{0,43}\text{N}_{0,23}$ . Um diese universellen Bausteine zu erhalten, müssen Organismen Substrate der Umgebung umwandeln. Im Falle von *P. copri* als chemoorganoheterotrophes Bakterium und Spezialist im Abbau von Polysacchariden sind dies

hauptsächlich Monosaccharide. Die Umwandlung von Substraten in Zellmaterial reduziert grundsätzlich die Entropie des Systems, weswegen Biomasse im Umkehrschluss auch eine hohe Gibbs-Energie besitzt (Stockar *et al.*, 2006). Das bedeutet, dass die biosynthetischen Stoffwechselwege des Anabolismus mit Energie versorgt werden müssen, um Biomasse entgegen des Entropiegefälles aufbauen zu können. Die hierfür notwendige Energie stammt aus den exergonen Prozessen des Katabolismus, weswegen *P. copri* auch einen Teil der aufgenommenen Substrate katabol metabolisieren muss. Das Zusammenspiel von Anabolismus und Katabolismus ist somit auch ein Maß für die Effizienz des Wachstums. Je negativer die energetische Differenz von Anabolismus und Katabolismus, desto schneller aber ineffizienter verläuft der gesamte Prozess und desto kleiner ist der resultierende Wachstumsertrag. Im Umkehrschluss existiert das theoretisch effizienteste Wachstum am thermodynamischen Äquilibrium, was jedoch gleichzeitig mit einer unendlichen Langsamkeit verbunden wäre und somit in der Natur nicht existiert (Stockar *et al.*, 2006). Organismen müssen sich folglich irgendwo zwischen diesen Extrema bewegen und zwischen Effizienz und Geschwindigkeit wählen. Die Bilanzierung des zentralen Kohlenstoff-, Redox- und Energiehaushaltes hilft entsprechend dabei, den Metabolismus eines Organismus besser einordnen zu können.

*P. copri* produzierte unabhängig vom verwendeten Medium eine Zelltrockenmasse von ungefähr 0,4 g pro l pro  $OD_{600}=1$ . Der Wachstumsertrag unterschied sich jedoch bei PYG mit 59,6 g pro Mol Glucose deutlich von den Ergebnissen im DMMG-Medium mit nur 34,4 g mol<sup>-1</sup>. Vergleicht man den intrazellulären Kohlenstofffluss beider Ansätze, wird klar, dass dieser Unterschied durch das jeweilige Zusammenspiel von Anabolismus und Katabolismus zu Stande kam. PYG-Kulturen von *P. copri* konsumierten deutlich weniger Glucose als Kulturen in DMMG und nutzten nur etwa 9,8 % der Glucose für anabole Prozesse aus, was den C-Bedarf der Biomasse gerade einmal zu 24,5 % abdeckte. Zum Vergleich nutzten die Zellen in DMMG 22,7 % der konsumierten Glucose, um den C-Bedarf des Anabolismus zu 96 % abzudecken. Da PYG ein reichhaltiges Komplexmedium darstellt, kann man davon ausgehen, dass der restliche und damit größere Anteil des C-Bedarfs in diesem Medium vor allem durch Aminosäuren und andere kohlenstoffhaltige Substanzen des Komplexmediums abgedeckt wurde. Obwohl damit etwa 90 % der konsumierten Glucose für den Katabolismus der PYG-Kulturen zur Verfügung stand, wurden aufgrund des insgesamt geringeren Glucose-Verbrauchs trotzdem weniger Endprodukte gebildet als in DMMG. Bemerkenswerterweise stellte dabei Formiat die Ausnahme dar, das im Gegensatz zu Succinat und Acetat in PYG-Medium sogar in verhältnismäßig größeren Mengen produziert wurde. Anhand der Gesamtmenge und den Verhältnissen der Endprodukte ließen sich nun drei Dinge ablesen: Erstens wurde in PYG-Medium weniger ATP durch die Verstoffwechslung von Glucose generiert, da die Menge an gebildetem Succinat ein direkter

Marker für die Aktivität der anaeroben Atmungskette von *P. copri* ist. Eine verminderte Succinat-Bildung ist somit mit einer geringeren ATP-Synthese gleichzusetzen. Zweitens wurden insgesamt weniger Reduktionsäquivalente aus dem katabolen Abbau von Glucose gewonnen, da Formiat dem Organismus als indirekter *redox sink* diene. Eine vermehrte Bildung von Formiat entspricht also weniger Reduktionsäquivalenten, die durch den Katabolismus zur Verfügung stehen. Drittens benötigten die PYG-Kulturen für die Verstoffwechslung von Glucose mehr CO<sub>2</sub>, da Formiat die Aktivität der Pyruvat-Formiat-Lyase widerspiegelte, die in direkter Konkurrenz zur Decarboxylierungsreaktion der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase steht. Die vermehrte Bildung von Formiat führt also auch zu einem geringeren Ausgleich des katabolen CO<sub>2</sub>-Bedarfs. Insgesamt benötigte *P. copri* in PYG zur Produktion von Biomasse deutlich weniger ATP und Reduktionsäquivalente aus dem glykolytischen Abbau von Glucose. Dies lag wahrscheinlich zum einen daran, dass *P. copri* bereits viele Biomasse-relevante Substanzen aus den komplexen Bestandteilen des PYG-Mediums aufnehmen konnte, wodurch weniger *de novo* Biosynthesen erforderlich waren. Zum anderen ähneln die Grundbausteine vieler kohlenstoffhaltiger Substanzen aus komplexen Medienbestandteilen, z.B. Aminosäuren, bereits dem vereinfachten Grundbaustein der Biomasse von *P. copri*, sodass weniger Reduktionsäquivalente benötigt werden, um die Substanzen entsprechend umzuwandeln.

Damit zeigt der beispielhafte Vergleich von PYG- und DMMG Kulturen, wie der zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus von *P. copri* im Wesentlichen über zwei katabole Stellschrauben reguliert wird, um die situativen Bedürfnisse des Anabolismus auszugleichen. Während die Umsetzung von PEP in OAA oder Pyruvat maßgeblich die ATP-Bildung reguliert, modifiziert die Umwandlung von Pyruvat in Acetyl-CoA durch zwei unterschiedliche Enzyme den Redox-Haushalt der Zelle. Der Katabolismus ist demnach sehr vereinfacht in zwei Bereiche zu unterteilen: Der EMP-Weg und der respiratorische Abschnitt bis einschließlich Succinat dienen zusammen exklusiv der Bildung von ATP, was man auch daran erkennen kann, dass die gebildeten Reduktionsäquivalente des EMP-Wegs vollständig für den respiratorischen Abschnitt des Stoffwechsels verwendet werden. Der fermentative Abschnitt ab Pyruvat bildet den zweiten Bereich des Katabolismus, der wiederum Reduktionsäquivalente exklusiv für die Umwandlung von Substraten in Biomasse bereitstellt. Diese Zusammenhänge ließen sich auch mit den Ergebnissen der Redox-Bilanz zeigen, da hier die gebildete Menge an Fd<sub>red</sub> in DMMG-Kulturen exakt der Reduktionskraft entsprach, die für die Umwandlung der anabol konsumierten Glucose (C<sub>1</sub>H<sub>2</sub>O<sub>1</sub>) in die tatsächlich erzeugte Biomasse (C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,44</sub>) benötigt wurde.

Um den rekapitulierten Fluss der Intermediate und das aufgestellte Stoffwechselmodell zusätzlich auch von einem energetischen Standpunkt aus zu bestätigen und zu bewerten, wird

im Folgenden berechnet wieviel ATP *P. copri* in DMMG durch den katabolen Abbau von Glucose gewinnen konnte. Dabei musste der Organismus für den Transport des Substrats in die Zelle hinein zunächst Energie aufwenden. In *P. copri* existiert wie in allen Prevotellaceae kein vollständiges PTS, sodass Glucose vermutlich über einen anderen Mechanismus in die Zelle geschleust wird (Fields and Russell, 2000). Eine möglicher Mechanismus verläuft über einen Protonen- oder Natriumionen-abhängigen Symport von Glucose, der den elektrochemischen Gradienten an der Cytoplasmamembran nutzt (Strobel, 1993). Zum Vergleich besitzt ein in *Prevotella bryantii* gefundener Pentosen:Na<sup>+</sup>-Symporter vermutlich eine Stöchiometrie von 1 (Strobel, 1993), weswegen hier für Glucose ein ähnlicher Symport angenommen wird, der 1 bis maximal 2 Ionen für den Transport eines Zuckermoleküls verwendet, was etwa 0,5 ATP-Äquivalenten entspricht. Intrazellulär erfolgt anschließend die Phosphorylierung des Zuckers durch die Hexokinase, wobei erneut 1 Mol ATP pro Mol Glucose verbraucht wird. Da die zweite Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat zu Fructose-1,6-Bisphosphat auch durch die PPI-abhängige PFK katalysiert werden kann, wurde anhand der cytoplasmatischen Enzymaktivitäten der beiden PFK-Varianten (siehe **Tab. 20** und **Abb. 8**) ein näherungsweise Anteil von 23 % berechnet, der durch die ATP-abhängige PFK katalysiert wird. Entsprechend werden an dieser Stelle ungefähr 0,23 Mol ATP pro Mol Glucose zur Phosphorylierung von Fructose-6-Phosphat verwendet. Nach der letzten Aktivierung des Zuckers folgen in *P. copri* die ATP-generierenden Schritte des EMP-Wegs und der anaeroben Atmung, die aufgrund des intrazellulären Flusses der Intermediate folgenden Beitrag leisten: Pro Mol Glucose erzeugt die Phosphoglyceratkinase 2 Mol ATP, die PEP-Carboxykinase 1 Mol ATP, die Pyruvatkinase 1 Mol ATP und die Acetatkinase ebenfalls 1 Mol ATP. Aus der Analyse der Atmungskette wurde ersichtlich, dass im Zuge der Elektronentransportphosphorylierung ~0,88 ATP-Äquivalente pro Mol Succinat entstehen, wodurch aufgrund der 1 zu 1 Stöchiometrie von Glucose und Succinat 0,88 Mol ATP pro Mol Glucose generiert werden. Zusammengefasst entstehen so durch den katabolen Abbau von Glucose 4,15 Mol ATP pro Mol Glucose.

Anhand der vereinfachten Elementarformel der Biomasse von *P. copri* (C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,43</sub>N<sub>0,23</sub>) lassen sich näherungsweise einige grundlegende thermodynamische Werte berechnen, die mit dem dargestellten Energiehaushalt abgeglichen werden können (Popovic, 2019). Hierfür benötigt man zunächst die Verbrennungsenthalpie  $\bar{h}_C^0$ , die bei der theoretischen Verbrennung der Biomasse von *P. copri* freigesetzt und aufgrund der prozentualen Verteilung der Elemente hauptsächlich CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O und N<sub>2</sub> hinterlassen würde. Die verbleibenden Elemente wie S oder P sind aufgrund ihres geringeren Anteils für eine näherungsweise Berechnung von  $\bar{h}_C^0$  nicht erforderlich. Nach Patel and Erickson, (1981) lässt sich diese Verbrennungsenthalpie anhand der Elektronenzahl  $E$  berechnen, die bei der Verbrennung der Biomasse auf Sauerstoff übertragen

werden. Hieraus ergibt sich folgende Formel für  $E$ , wobei  $n_C$ ,  $n_H$ ,  $n_O$  und  $n_N$  die Anzahl der C-, H-, O- und N-Atome in der Biomasseformel darstellen:

$$\text{Gl. 11} \quad E = 4n_C + n_H - 2n_O - 0n_N$$

Entsprechend ist die Anzahl der Elektronen, die bei der theoretischen Verbrennung der Biomasse  $C_1H_{1,79}O_{0,43}N_{0,23}$  von *P. copri* auf Sauerstoff übertragen werden  $E = 4,92$ . Anschließend wird diese Zahl in die Patel-Erickson-Gleichung (Gl. 12) eingefügt, die das proportionale Verhältnis von  $E$  und  $\bar{h}_C^0$  beschreibt (Patel and Erickson, 1981; Popovic, 2019).

$$\text{Gl. 12} \quad \bar{h}_C^0 = -111,14 \left[ \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \right] * E$$

Damit besitzt die Biomasse von *P. copri* eine Verbrennungsenthalpie  $\bar{h}_C^0$  von  $-546,55 \text{ kJ mol}^{-1}$ , woraus sich nun die molare Standardbildungsenthalpie der Biomasse aus Elementen  $(\bar{h}_f^0)_{\text{bio}}$  berechnen lässt. Hierfür wird  $\bar{h}_C^0$  auf die bekannten Standardbildungsenthalpien der Verbrennungsprodukte und -produkte  $(\bar{h}_f^0)_X$  bezogen (Hess'sches Gesetz) und die vereinfachte Gleichung (Gl. 13) nach der noch unbekannt Standardbildungsenthalpie der Biomasse aufgelöst, wobei zu bedenken ist, dass  $(\bar{h}_f^0)_{N_2}$  und  $(\bar{h}_f^0)_{O_2} = 0 \text{ kJ mol}^{-1}$  entsprechen und deswegen nicht in der Gleichung auftauchen (Popovic, 2019).

$$\text{Gl. 13} \quad \bar{h}_C^0 = n_C(\bar{h}_f^0)_{CO_2} + \frac{1}{2}n_H(\bar{h}_f^0)_{H_2O} - (\bar{h}_f^0)_{\text{bio}}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{\text{bio}} = n_C(\bar{h}_f^0)_{CO_2} + \frac{1}{2}n_H(\bar{h}_f^0)_{H_2O} - \bar{h}_C^0$$

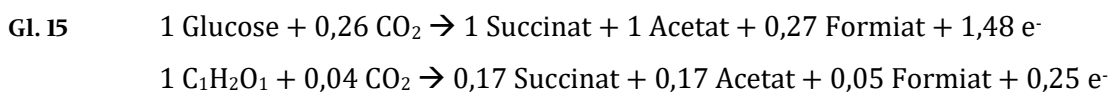
Hieraus ergibt sich eine molare Standardbildungsenthalpie  $(\bar{h}_f^0)_{\text{bio}}$  von  $-102,37 \text{ kJ mol}^{-1}$  für die auf den Kohlenstoffanteil normalisierte Biomasse von *P. copri*. Der nächste notwendige Parameter ist die molare Standardentropie der Biomasse  $\bar{s}_{\text{bio}}^0$  des Bakteriums, die nach Battley, (1999) in einem proportionalen Verhältnis zur molaren Standardentropie der einzelnen Elemente innerhalb der Biomasse steht und sich für *P. copri* durch die nachfolgende Gleichung (Gl. 14) berechnen lässt, wobei  $\bar{s}_C^0 = 5,51 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\bar{s}_{H_2}^0 = 130,68 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ,  $\bar{s}_{O_2}^0 = 205,15 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  und  $\bar{s}_{N_2}^0 = 191,61 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  entsprechen (Popovic, 2019).

$$\text{Gl. 14} \quad \bar{s}_{\text{bio}}^0 = 0,187 \left( n_C \bar{s}_C^0 + n_H \frac{\bar{s}_{H_2}^0}{2} + n_O \frac{\bar{s}_{O_2}^0}{2} + n_N \frac{\bar{s}_{N_2}^0}{2} \right)$$

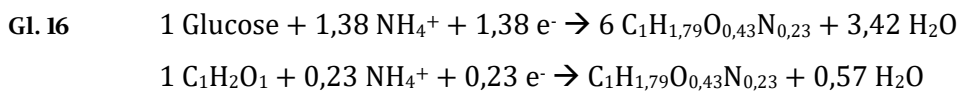
Hieraus ergibt sich eine molare Standardentropie der Biomasse  $\bar{s}_{\text{bio}}^0 = 35,40 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ , die man nun zusammen mit  $(\bar{h}_f^0)_{\text{bio}}$  für die weiteren Berechnungen benötigt.



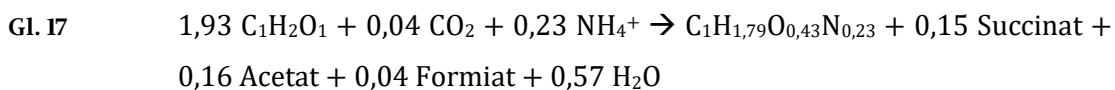
Das Hess'sche Gesetz beschreibt die Enthalpieänderung des Gesamtprozesses  $\Delta(\bar{h}_R^0)$  als Summe der Enthalpieänderungen der Einzelprozesse und kann in analoger Form auch zur Berechnung der Entropieänderung des Gesamtprozesses  $\Delta(\bar{s}_R^0)$  genutzt werden (Gl. 18) (Popovic, 2019). Im Falle der auf Glucose angezogenen Kulturen von *P. copri* ist der Gesamtprozess mit dem vollständigen Metabolismus der Zelle gleichzusetzen, der letztlich als Kombination von Anabolismus und Katabolismus betrachtet werden kann. Hierfür lässt sich zunächst die vereinfachte chemische Formel des Katabolismus aus dem Fluss der Intermediate rekapitulieren, wobei sich die in der Formel vorkommende Anzahl an Elektronen auf die gebildete Menge an  $F_{\text{red}}$  bezieht:



Des Weiteren muss für die chemische Gleichung des Anabolismus berücksichtigt werden, dass der Hauptteil der Biomasse aus Glucose (Kohlenstoffquelle) und  $\text{NH}_4^+$  (Stickstoffquelle) gebildet wurde und dass sich die Reduktion von Glucose zu Biomasse ultimativ in der Zufuhr von Elektronen und der Abspaltung von Wasser äußert. Es ergibt sich folgende Gleichung:



Fasst man nun Gl. 15 und Gl. 16 bei angeglicherer Anzahl an  $\text{e}^-$  zusammen, ergibt sich die chemische Gleichung des Metabolismus von *P. copri* bei Wachstum auf Glucose:



Anhand dieser Formel und den molaren Standardbildungsenthalpien und molaren Standardentropien der Reaktanden und Produkte lassen sich nun  $\Delta(\bar{h}_R^0)$  und  $\Delta(\bar{s}_R^0)$  des Metabolismus mit Hilfe des Hess'schen Gesetzes berechnen, wofür auch die zuvor ermittelten Werte von  $(\bar{h}_f^0)_{\text{bio}}$  und  $\bar{s}_{\text{bio}}^0$  benötigt werden:

$$\begin{aligned} \text{Gl. 18} \quad \Delta(\bar{h}_R^0)_X &= \left( \sum (\bar{h}_f^0)_{\text{Produkte}} \right) - \left( \sum (\bar{h}_f^0)_{\text{Reaktanden}} \right) \\ \Delta(\bar{h}_R^0) &= \left( (\bar{h}_f^0)_{\text{bio}} + n_{\text{Succ}}(\bar{h}_f^0)_{\text{Succ}} + n_{\text{Ac}}(\bar{h}_f^0)_{\text{Ac}} + n_{\text{For}}(\bar{h}_f^0)_{\text{For}} + n_{\text{H}_2\text{O}}(\bar{h}_f^0)_{\text{H}_2\text{O}} \right) \\ &\quad - \left( n_{\text{Gluc}}(\bar{h}_f^0)_{\text{Gluc}} + n_{\text{CO}_2}(\bar{h}_f^0)_{\text{CO}_2} + n_{\text{NH}_4^+}(\bar{h}_f^0)_{\text{NH}_4^+} \right) \end{aligned}$$

Bzw.

$$\Delta(\bar{s}_R^0) = \left( \sum \bar{s}_{\text{Produkte}}^0 \right) - \left( \sum \bar{s}_{\text{Reaktanden}}^0 \right)$$

$$\Delta(\bar{s}_R^0) = (\bar{s}_{bio}^0 + n_{Succ}\bar{s}_{Succ}^0 + n_{Ac}\bar{s}_{Ac}^0 + n_{For}\bar{s}_{For}^0 + n_{H2O}\bar{s}_{H2O}^0) \\ - (n_{Gluc}\bar{s}_{Gluc}^0 + n_{CO2}\bar{s}_{CO2}^0 + n_{NH4+}\bar{s}_{NH4+}^0)$$

$$(\bar{h}_f^0)_{Succ} := -940,26 \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{Succ}^0 := 167,30 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{Ac} := -484,93 \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{Ac}^0 := 158,00 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{For} := -424,82 \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{For}^0 := 129,00 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{H2O} := -285,83 \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{H2O}^0 := 69,95 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{Gluc} := (-1271/6) \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{Gluc}^0 := (209,20/6) \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{CO2} := -393,51 \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{CO2}^0 := 213,79 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

$$(\bar{h}_f^0)_{NH4+} := -133,08 \text{ kJ mol}^{-1}; \bar{s}_{NH4+}^0 := 113,00 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$$

Hieraus ergeben sich  $\Delta(\bar{h}_R^0) = -48,29 \text{ kJ mol}^{-1}$  und  $\Delta(\bar{s}_R^0) = 29,13 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  für die Verstoffwechslung von Glucose und der Bildung des C-normalisierten Biomassebausteins  $C_1H_{1,79}O_{0,43}N_{0,23}$ . Diese können nun in die Gibbs-Gleichung eingesetzt werden, um die Standard Gibbs-Energie des Metabolismus  $\bar{G}_{Meta}^0$  von *P. copri* zu berechnen, wobei  $T := 298,15 \text{ K}$  unter Standardbedingungen entspricht:

$$\text{Gl. 19} \quad \bar{G}_{Meta}^0 = \Delta(\bar{h}_R^0) - T\Delta(\bar{s}_R^0)$$

Es berechnet sich  $\bar{G}_{Meta}^0 = -56,97 \text{ kJ mol}^{-1}$  oder  $-2,37 \text{ kJ g}^{-1}$  (bezogen auf das Molekulargewicht von  $C_1H_{1,79}O_{0,43}N_{0,23}$ ), welche theoretisch als freie Energie das System „Zelle“ in Form von z.B. Wärme verlässt oder im Erhaltungsstoffwechsel oder bei Transportprozessen investiert wird. Bezieht man die spezifische freie Gibbs-Energie des Metabolismus auf die Zelltrockenmasse von  $34,36 \text{ g pro Mol konsumierter Glucose}$ , lag die freie Energie hier bei  $-81,44 \text{ kJ}$ . Unter der Annahme, dass die gesamte verfügbare, chemische Energie des Katabolismus durch ATP repräsentiert wird, standen  $\bar{G}_{Meta}^0$  etwa  $-155,77 \text{ kJ}$  gegenüber, die aus der Hydrolyse von  $4,15 \text{ Mol ATP pro Mol konsumierter Glucose}$  (bei  $-36,57 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) stammten. Da sich  $\bar{G}_{Meta}^0$  letztlich aus  $\bar{G}_{ATP}^0$  des Katabolismus und dem Energiebedarf des Anabolismus zusammensetzt, stellt die Differenz von  $\bar{G}_{ATP}^0$  und  $\bar{G}_{Meta}^0$  den Wert des anabolen Energiebedarfs dar, welcher  $70,32 \text{ kJ}$  entsprach. Um den Energiebedarf des Anabolismus zur Produktion von Biomasse zu decken, wurden also etwa  $46,33 \%$  des gebildeten ATP verwendet, was grundsätzlich einem erfahrungsgemäßen Wert von  $\leq 50 \%$  für anaerobe, chemoorganoheterotrophe Bakterien entspricht (Thauer *et al.*, 1977). Die geringe Effizienz chemoorganoheterotropher Anaerobier lässt sich zum Teil durch vermehrte Energiekosten erklären, die durch Transportprozesse

entstehen, da die Organismen in der Regel Gärungsendprodukte aus der Zelle schleusen müssen (Russell, 2007). Außerdem wertet die vergleichsweise große Entropieänderung durch das Ausschleusen von Endprodukten die freie Gibbs-Energie der Metabolismus-Reaktion „künstlich“ auf, wodurch der prozentuale Anteil der für den Anabolismus zur Verfügung stehenden Energie sinkt (siehe auch weiter oben) (Stockar and Liu, 1999). Die Kombination aus höheren Kosten des Erhaltungsstoffwechsels und der vergleichsweise großen Entropieänderung durch den Gesamtmetabolismus führte somit vermutlich auch bei *P. copri* dazu, dass der Organismus nur weniger als die Hälfte des gebildeten ATP effektiv zur Produktion von Biomasse nutzen konnte. Hierdurch lag der molare Wachstumsertrag  $Y_{ATP}$  mit 8,3 g pro Mol ATP auch in einem eher niedrigen Bereich typischer Wachstumserträge von Bakterien (Russell, 2007).

Auch die thermodynamischen Werte von *P. copri* folgen logischerweise den grundlegenden Prinzipien mikrobiellen Wachstums: So weist die Standardbildungsenthalpie von Biomasse aus Elementen grundsätzlich einen negativen Wert auf, der sich dadurch erklären lässt, dass bei der hypothetischen Bildung der Biomasseeinheit aus Elementen weniger elektronegative Elemente durch Sauerstoff und Stickstoff (teil-)oxidiert werden (Popovic, 2019). Da oxidative Reaktionen grundsätzlich exotherm verlaufen, ist auch die Bildung von Biomasse exotherm (Popovic, 2019). Des Weiteren besitzt Biomasse selbst zwar eine positive Entropie, die hypothetische Reaktion zur Bildung der Biomasse aus Elementen jedoch eine negative Entropieänderung, da Biomasse bzw. Zellen hoch organisierte Strukturen darstellen und daher die Entropie allgemein vermindern (Popovic, 2019; Stockar and Liu, 1999). Dem gegenüber steht, dass der fermentative Metabolismus von *P. copri* insgesamt die Entropie in Bezug zur Umgebung erhöht, weil Glucose formal in mehrere Moleküle zerlegt wird. Die Erhöhung der Entropie durch die Abgabe von Stoffwechselendprodukten stellt hierbei eine wichtige Triebfeder dar, die von vielen Anaerobiern genutzt wird, um die im Vergleich zu aerober Atmung geringere Enthalpie des Metabolismus auszugleichen (Stockar and Liu, 1999). Und obwohl *P. copri* durch die anaerobe Fumaratatmung und die Substratkettenphosphorylierung nur verhältnismäßig wenig verfügbare Energie generiert, nutzt der Organismus das vollständige Potenzial seines Stoffwechsels nicht aus, um möglichst effizient Biomasse aufzubauen. Diese Beobachtung lässt sich auch bei vielen anderen Mikroben feststellen und wird allgemein unter dem Begriff *energy spilling* zusammengefasst (Russell, 2007). Hierbei „verschwendet“ die Zelle Energie in scheinbar zwecklosen Reaktionen wie bspw. in Substratzyklen (gegenläufige Stoffwechselwege; engl.: *futile cycles*) oder beim Ausschleusen von Metaboliten im Überfluss-Metabolismus (engl.: *overflow metabolism*). Auch die Entkopplung des elektrochemischen Protonengradienten von der ATP-Synthese spielt hierbei eine Rolle, was entweder chemisch durch bspw. schwache Säuren und einer pH-Differenz von Cytoplasma und Umgebung passieren kann, oder kontrolliert durch den

Einsatz von sogenannten *uncoupling proteins* (UCPs), die als selektive Anionen-Kanäle Protonen über die Cytoplasmamembran transportieren ohne chemische Energie zu generieren (Russell, 2007; Demirel, 2014; Lipson, 2015). Diese „energieverschwendenden“ Reaktionen sind jedoch vermutlich weniger nachteilig für die Zelle als es nach intuitiver Wahrnehmung den Anschein hat. Denn hierdurch wird die energetische Differenz von Anabolismus und Katabolismus künstlich vergrößert, wodurch sich die Gesamtreaktion des Metabolismus vom effizientesten Zustand einer Reaktion, dem Äquilibrium, entfernt. Im Umkehrschluss wird hierdurch jedoch die beobachtete Reaktionsrate des Metabolismus proportional beschleunigt, was unter bestimmten Bedingungen ein sinnvolles Tauschgeschäft für die Mikroben sein kann, wenn die Geschwindigkeit den nützlicheren Faktor für die eigene Überlebensstrategie darstellt als der Ertrag (Lipson, 2015; Russell, 2007; Stockar *et al.*, 2006). So kann man generell davon sprechen, dass schnell wachsende Organismen in ressourcenreichen Habitaten eher niedrige molare Wachstumserträge besitzen, wohingegen Organismen in ressourcenlimitierten Lebensräumen häufig zu langsamem aber effizientem Wachstum tendieren (Lipson, 2015; Molenaar *et al.*, 2009). Bezogen auf das Habitat „Colon“, in dem zyklisch größere Mengen an Ressourcen für die Mikroben der Darmflora zur Verfügung stehen, stellt vermutlich „Zeit“ eine relevantere Limitierung dar als die Substratverfügbarkeit. Schnelle Wachstumsraten versprechen hier eine erfolgreiche Eigenschaft zu sein, mit denen dominante Spezies sich vermutlich ihren Platz innerhalb der Mikrobiota gegen die vielzähligen Konkurrenten sichern. Daher ist es nicht verwunderlich, dass auch bei *P. copri* ein effizienteres Wachstum gegen kurze Verdopplungszeiten eingetauscht wurde. Hinzu kommt, dass die meisten Organismen des Darmlumens ihre Proteine vollständig *de novo* aus Monosacchariden synthetisieren müssen, da Ballaststoffe die primäre Kohlenstoffquelle des Habitats darstellen und nur verhältnismäßig wenige Aminosäuren bzw. Proteinvorstufen durch die Nahrung in das Lumen des Dickdarms gelangen (Rowland *et al.*, 2018). Proteinbiosynthesen sind energetisch sehr kostenintensiv, sodass die von Zuckern ausgehende Produktion von Biomasse verhältnismäßig viel ATP konsumiert. Entsprechend senken diese *de novo* Biosynthesen zusätzlich den molaren Wachstumsertrag.

Insgesamt zeigte die Rekonstruktion des zentralen Stoffwechsels von *P. copri*, dass das aufgestellte Modell inklusive des Flusses der Intermediate ein stimmiges Abbild der biochemischen und -energetischen Prozesse des Organismus bei Wachstum auf Glucose liefert. Der Metabolismus von *P. copri* ist dabei auf das Wachstum im Darmlumen optimiert, in dem Polysaccharide das Hauptsubstrat der Mikroorganismen darstellt. Obwohl der anaerobe Gärungsstoffwechsel des Bakteriums in Kombination mit der Fumaratatmung nur verhältnismäßig wenig Energie liefert, ermöglicht das fein abgestimmte Stoffwechselsystem ein

bemerkenswert schnelles Wachstum, das dem Organismus unter bestimmten Bedingungen die Prädominanz über das Habitat „Colon“ sichert.

## 5.6 Der Zentralstoffwechsel der wichtigen Darmorganismen *B. vulgatus* und *P. johnsonii*

Im Konkurrenzkampf um die Vorherrschaft über die menschliche Darmmikrobiota ist vor allem die phylogenetische Ordnung der Bacteroidales zu nennen, die im Colon durch einige überaus erfolgreiche Gattungen vertreten wird (Human Microbiome Project Consortium, 2012). Hierzu zählt nicht nur die Gattung *Prevotella*, sondern vor allem auch die Gattung *Bacteroides*, die in Metagenomanalysen regelmäßig einen zweistelligen Prozentbereich der Darmflora ausmacht und zusammen mit der Gattung *Parabacteroides* zu der am ausführlichsten untersuchten Gruppe der Bacteroidales gezählt werden kann (Coyne *et al.*, 2019; Human Microbiome Project Consortium, 2012; Wexler *et al.*, 2018).

Interessanterweise erfüllen viele Spezies dieser erfolgreichen Gattungen sehr ähnliche Funktionen innerhalb der menschlichen Darmmikrobiota, wo sie als primäre Polysaccharid-verwerter die komplexen Zuckerstrukturen der aus der Nahrung gewonnenen Ballaststoffe zerkleinern und die Oligo- bis Monosaccharide auch für andere Spezies des Darms bereitstellen (Wexler *et al.*, 2018; Wexler, 2007; Flint *et al.*, 2007; Flint *et al.*, 2008). Zusätzlich verfügen diese Organismen allesamt über einen sehr ähnlichen Zentralstoffwechsel, der sich in den wesentlichen Punkten kaum voneinander unterscheidet. Der in dieser Arbeit analysierte zentrale Kohlenstoff- und Energiemetabolismus von *P. copri* kann hierbei als eine Art „Minimalausstattung“ betrachtet werden, der bei den meisten, anaeroben Vertretern der genannten Gattungen durch weitere Merkmale ergänzt wird. So zeigte auch die Analyse der Zentralstoffwechsel von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* als repräsentative Spezies ihrer jeweiligen Gattung, dass beide Organismen Monosaccharide hauptsächlich über den EMP-Weg verstoffwechseln, prinzipiell aber auch die Gene des oxidativen Teils des PPP besitzen und daher wahrscheinlich vor allem Pentosen über den zuletzt genannten Stoffwechselweg abbauen. Zwar konnte auch in diesen Organismen kein Gen für eine Transaldolase gefunden werden, allerdings besitzen beide Bakterien wie *P. copri* oder *E. histolytica* eine P<sub>Pi</sub>-abhängige PFK, die vermutlich zusammen mit der Fructose-1,6-bisphosphat-Aldolase den enzymatischen Schritt der Transaldolase im PPP umgeht (siehe auch **Kapitel 4.2** und **4.3**). Man kann daher annehmen, dass der PPP sowohl in *B. vulgatus* als auch in *P. johnsonii* als vollständiger Stoffwechselweg vorliegt.

Die weitere Verstoffwechslung der C-Körper verläuft ansonsten wie in *P. copri*, wobei *B. vulgatus* noch die Möglichkeit besitzt, Pyruvat mit Hilfe einer Lactatdehydrogenase zu Lactat

zu reduzieren, was dem Organismus neben der Bildung von Formiat eine weitere Möglichkeit bietet, überschüssige Reduktionsäquivalente abzubauen. Gleiches ist bereits für die artverwandte Spezies *B. fragilis* bekannt (Narikawa *et al.*, 1991). Des Weiteren sind sowohl *B. vulgatus* als auch *P. johnsonii* in der Lage, Succinat noch bis hin zu Propionat zu verstoffwechseln, was im Vergleich zu *P. copri* den wohl größten Unterschied innerhalb des Zentralstoffwechsels darstellt (**Abb. 8**, **Abb. 26** und **Abb. 27**). Gerade die dabei durchgeführte Freisetzung von CO<sub>2</sub> durch die Methylmalonyl-CoA-Decarboxylase ist vermutlich von größerer Bedeutung für die Organismen, da hierdurch der CO<sub>2</sub>-Bedarf der Succinatproduktion stöchiometrisch ausgeglichen wird. Ein mögliches Resultat dieser Tatsache konnte bereits in den Wachstumsexperimenten bezüglich der CO<sub>2</sub>-Abhängigkeit von *P. copri* beobachtet werden (siehe **Kapitel 4.1.1**), in dem der Vergleichsorganismus *B. vulgatus* mit deutlich geringeren HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentrationen wachsen konnte als *P. copri*. Da bei der Decarboxylasereaktion zusätzlich auch Natriumionen über die Cytoplasmamembran transloziert werden, bietet dieser Stoffwechselweg außerdem noch einen energetischen Vorteil. Interessanterweise produzierten *B. vulgatus* und *P. johnsonii* jedoch unter den genutzten Bedingungen in dieser Arbeit nur relativ wenig Propionat und hinterließen in den Kulturüberständen vor allem Succinat als Endprodukt des respiratorischen Teils des Zentralstoffwechsels. Es ist bekannt, dass die Propionatbildung in *Bacteroides* spp. vor allem durch niedrige CO<sub>2</sub>-Konzentrationen und einer ausreichenden Verfügbarkeit an Vitamin B12 stimuliert wird (Caspari and Macy, 1983; Chen and Wolin, 1981). Vitamin B12 fungiert als Cofaktor der Methylmalonyl-CoA-Mutase, sodass der Succinyl-CoA-Weg zur Produktion von Propionat entsprechend nur in Anwesenheit dieses Vitamins stattfinden kann. Da Vitamin B12 in dem verwendeten Medium mit 0,6 µM zwar in einer vermutlich ausreichenden Konzentration vorlag (Varel and Bryant, 1974), die Verfügbarkeit von CO<sub>2</sub> jedoch aufgrund der verwendeten Gasatmosphäre sehr hoch war, fehlte zur Produktion von Propionat wahrscheinlich der CO<sub>2</sub>-abhängige Stimulus. Es ist denkbar, dass der Succinyl-CoA-Weg aufgrund der vier notwendigen Enzyme, von denen zwei auch noch aus mehreren Untereinheiten bestehen, einen eher aufwändigen und energieintensiven Vorgang darstellt, der sich für die Organismen bspw. nur unter den beschriebenen Bedingungen lohnt. In beiden Bakterien reichte die gebildete Menge an Propionat jedoch trotzdem aus, um eine im Vergleich zu *P. copri* geringere CO<sub>2</sub>-Abhängigkeit des Zentralstoffwechsels zu erzeugen. Dies zeigt sich direkt an den jeweiligen Fermentationsgleichungen, in denen pro 1 Mol Glucose nur 0,09 Mol CO<sub>2</sub> (*B. vulgatus*) bzw. 0,11 Mol CO<sub>2</sub> (*P. johnsonii*) konsumiert wurden, was weniger als die Hälfte bis ein Drittel des CO<sub>2</sub>-Bedarfs des Zentralstoffwechsels von *P. copri* entsprach (siehe auch **Kapitel 4.3.2**).

Die Rekapitulation der Intermediatflüsse zeigte, dass *B. vulgatus* etwas mehr Glucose über den Katabolismus bzw. respektiv weniger über den Anabolismus verstoffwechselte als *P. copri*, was sich unter anderem auch in einer niedrigeren Zelltrockenmasse pro Liter Kultur pro OD<sub>600</sub> von 1 äußerte. Im Gegensatz hierzu lag die Zelltrockenmasse von *P. johnsonii* bei einem zu *P. copri* vergleichbaren Wert. Bemerkenswerterweise ließ sich der Zentralstoffwechsel von *P. johnsonii* jedoch anhand des erstellten Modells nicht ausgleichend bilanzieren, da der Bedarf des Anabolismus an Reduktionsäquivalenten nur zu etwa 41 % abgedeckt werden konnte (siehe **Kapitel 4.3.2**). Es ist denkbar, dass *P. johnsonii* die vorhandene Glucose nur anteilig über den EMP-Weg verstoffwechselte und stattdessen zum Teil den oxidativen PPP verwendete. Hierdurch hätte der Organismus die Möglichkeit, einen Teil der Glucose vollständig zu CO<sub>2</sub> zu oxidieren, wodurch gleichzeitig deutlich mehr Reduktionsäquivalente gebildet worden wären. Da hierdurch außerdem ein größerer Teil der konsumierten Glucose dem Katabolismus zugeordnet werden müsste, würde sich neben der zu niedrigen Redox-Bilanz auch die zu hohe C-Bilanz relativieren. Zwar lässt sich der theoretisch notwendige Anteil an vollständig oxidiertem Glucose anhand der unausgeglichene[n] [H]-Bilanz näherungsweise auf nur etwa 1,3 mmol/g TG bestimmen, allerdings kann anhand des Substratverbrauchs/der Produktbildung der genaue Anteil an totaloxidiertem Glucose nicht genau berechnet werden. Das Schicksal der Glucose im Zentralstoffwechsel von *P. johnsonii* müsste also in zukünftigen Experimenten auf andere Weise, wie z.B. mit Hilfe einer Isotopenmarkierung, analysiert werden, um eine genauere Aussage über den intrazellulären Zuckerabbau von *P. johnsonii* treffen zu können.

Neben dem cytoplasmatischen Teil des Zentralstoffwechsels lassen sich auch die anaeroben Atmungsketten von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* mit den Ergebnissen von *P. copri* vergleichen: So ist die Atmungskette von *B. vulgatus* wie bei *P. copri* aufgebaut und wird vor allem durch die funktionelle Einheit aus „kopflosem“ NDHI, Nqr und Fumaratreduktase repräsentiert. Auch in diesem Organismus ließ sich ansonsten der Rnf-Komplex und eine Cytochrom-bd-Chinioxidase auffinden. Interessanterweise besitzt *P. johnsonii* im Gegensatz hierzu keinen „kopflosten“ NDHI, sodass sämtliche Elektronen über die Nqr in die Atmungskette geschleust werden müssen. Damit bleibt außerdem nur noch der Rnf-Komplex, um das im Katabolismus gebildete Fd<sub>red</sub> zur Energiekonservierung zu nutzen, was prinzipiell auch bedeutet, dass die Atmungskette von *P. johnsonii* sämtliche Energie in Form eines reinen, elektrochemischen Natriumionengradienten konserviert. Trotz dieser Form der Energiekonservierung ist es sehr wahrscheinlich, dass *P. johnsonii* keine Na<sup>+</sup>-abhängige F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP-Synthase besitzt, da die Sequenzanalyse der Untereinheit C (AtpE) wie auch bei *B. vulgatus* oder *P. copri* auf eine eindeutige H<sup>+</sup>-Abhängigkeit hindeutet (siehe **Kapitel 4.3.1**). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass *P. johnsonii* (und natürlich auch *B. vulgatus* und *P. copri*) über einen oder mehrere

Antiporter in der Membran verfügt, um  $\text{Na}^+$  gegen  $\text{H}^+$  auszutauschen (siehe auch **Kapitel 4.2.4**). Von einem energetischen Standpunkt aus betrachtet, hat die Abwesenheit des „kopfloren“ NDHI außerdem noch eine weitere Konsequenz: Da sich das Verhältnis der translozierten Ionen pro transportiertem Elektron ändert, erzeugt die Atmungskette (bestehend aus Nqr und Fumaratreduktase) in *P. johnsonii* unter ansonsten gleichen Bedingungen theoretisch etwas weniger ATP pro Fumaratreduktion als bspw. in *P. copri* oder *B. vulgatus*, die über einen „kopfloren“ NDHI-Komplex verfügen. Um diese energetische Differenz auszugleichen, wäre es möglich, dass *P. johnsonii* tatsächlich den Rnf-Komplex zur zusätzlichen Energiekonservierung nutzt, da hierdurch die nötigen Ionen transloziert werden können, um die Energiekonservierung der Elektronenkettenphosphorylierung auf etwa 1 ATP pro Fumaratreduktion anzuheben.

Die bioinformatischen Daten zeigten außerdem einen weiteren großen Unterschied zwischen den Organismen: So besitzen *B. vulgatus* sowie *P. johnsonii* im Gegensatz zu *P. copri* Hydrogenasen, mit denen die Organismen grundsätzlich Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{H}_2$  abgeben können. Zwar ist die physiologische Funktion dieser Hydrogenasen in beiden Gattungen noch nicht geklärt, allerdings wird deutlich, dass *B. vulgatus* und *P. johnsonii* insgesamt deutlich mehr und flexiblere Möglichkeiten besitzen, um Reduktionsäquivalente zu recyceln. Dies ist unter Umständen für die Organismen notwendig, wenn das Habitat vor allem Substrate mit reduzierterem Zustand bereitstellt, wie z.B. Aminosäuren oder Zuckeralkohole. Da in diesem Fall weniger Reduktionsäquivalente benötigt werden, um die jeweiligen Substanzen in Biomasse umzuwandeln, kann es theoretisch dazu führen, dass der Katabolismus mehr [H] bereitstellt, als benötigt wird, und die Organismen dann Stoffwechselwege benötigen, um die überschüssigen [H] zu entfernen.

Zusammenfassend zeigte die Analyse der drei wichtigen Vertreter der human-assoziierten Bacteroidales *B. vulgatus*, *P. johnsonii* und *P. copri*, dass vor allem letzterer Organismus einen relativ minimalistischen Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel besitzt, der sich als Grundschema für viele erfolgreiche Spezies (Bacteroidales) der menschlichen Intestinalflora anwenden lässt. Dieses Grundgerüst ist in *B. vulgatus* und *P. johnsonii* deutlich flexibler gestaltet und die Bakterien besitzen mehrere metabolische Stellschrauben, die es ihnen erlauben, den Zentralstoffwechsel an unterschiedliche Bedingungen anzupassen. Hierbei kristallisierten sich vor allem zwei Parameter heraus, die den Stoffwechsel der Organismen vermutlich stärker beeinflussen: Die  $\text{CO}_2$ -Konzentration der Umgebung und die Möglichkeit zur Ausbalancierung des internen Redoxhaushalts. Ersterer Parameter hat vermutlich durchaus signifikante Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Darmmikrobiota, da die häufig prädominante Spezies *P. copri* aufgrund des begrenzten Stoffwechsels nur unter  $\text{CO}_2$ -reichen Bedingungen optimal wachsen kann. *B. vulgatus* und *P. johnsonii* als Vertreter wichtiger Gattungen der



menschlichen Darmflora besitzen hingegen einen weit weniger CO<sub>2</sub>-abhängigen Zentralstoffwechsel und sind wahrscheinlich auch bei sehr CO<sub>2</sub>-limitierten Bedingungen in der Lage, den Colon mit hohen Zellzahlen zu besiedeln. Die Möglichkeit überschüssige Reduktionsäquivalente zu entfernen, liefert außerdem vermutlich die Grundlage, um Substrate abseits der im Colon häufig vorkommenden (Poly-)Saccharide zu verstoffwechseln, die ansonsten aufgrund eines reduzierteren Zustands den Redoxhaushalt aus dem Gleichgewicht bringen könnten. Relevant ist dies bspw. bei der Besiedelung der Mucinschicht oder bei einer ballaststoffarmen bzw. proteinreichen Ernährung, wodurch reduziertere Substrate wie z.B. Aminosäuren gehäuft zur Verfügung stehen.

### **5.7 Biotechnologische Succinatproduktion mit Hilfe des Darmbakteriums *P. copri***

Allein aufgrund der großen Biodiversität stellt die Darmmikrobiota einen potenziellen Fundus an biotechnologisch interessanten Mikroorganismen dar, welche bereits von Natur aus in der Lage sind, eine Vielzahl von (vor allem pflanzlichen) Polysacchariden als günstige und nachwachsende Rohstoffe zu verwerten. Zu diesen potenziell interessanten Organismen zählt auch *P. copri*, da das Bakterium mit einem extensiven Repertoire an Polysaccharid-abbauenden Enzymen, für z.B. die Degradation von Xylan und Pectin, ausgestattet ist (Accetto and Avguštin, 2015; Accetto and Avguštin, 2018; Fehlner-Peach *et al.*, 2019). Zusätzlich zeigten die Wachstumsexperimente, dass *P. copri* als eine der dominanten Spezies der menschlichen Intestinalflora auch in einem Minimalmedium zu hohen Zelldichten heranwächst die mit kurzen Verdopplungszeiten erreicht werden. Hierdurch bietet das Bakterium bereits wünschenswerte Eigenschaften, die in der Industrie häufig für die Wirtschaftlichkeit eines biotechnologischen Prozesses verantwortlich sind (Okafor, 2016). Gleichzeitig erzeugt *P. copri* Succinat als eine biotechnologisch relevante Substanz, die im zentralen Kohlenstoff- und Energiemetabolismus des Organismus als notwendiges Endprodukt anfällt und in das umliegende Medium abgegeben wird. Succinat als C4-Dicarboxylat wird schon jetzt in verschiedenen Industriezweigen eingesetzt und fungiert bspw. als Säuerungsmittel und Geschmacksverstärker in Lebensmitteln oder als Zusatzstoff in der Formulierung von Zementen (Nghiem *et al.*, 2017). Außerdem dient Succinat als eine der weltweit wichtigsten Plattformchemikalien für die Herstellung von Pigmenten, Detergenzien, Kosmetika sowie zukunftssträchtigen Polymeren wie z.B. Polybutylensuccinat (Nghiem *et al.*, 2017; Dessie *et al.*, 2018; Mancini *et al.*, 2019).

Klassischerweise wird Bernsteinsäure bzw. Succinat als Salz dieser Säure über die Verarbeitung von raffiniertem Erdöl produziert (Pinazo *et al.*, 2015). Hierbei erfolgt die Synthese in der Regel

über Maleinsäureanhydrid, welches zunächst mit Hilfe von Nickel- oder Palladiumkatalysatoren und molekularem Wasserstoff bei 120 °C - 180 °C und moderaten Drücken zu Bernsteinsäureanhydrid hydrogeniert wird. Anschließend wird das Anhydrid zu Bernsteinsäure durch das Lösen in heißem Wasser hydrolysiert (Pinazo *et al.*, 2015). Aufgrund der stetig ansteigenden Ölpreise, besseren Fermentationstechnologien und dem allgemeinen Wunsch nach nachhaltigeren Prozessen, wird mittlerweile jedoch statt der konventionellen Methode verstärkt auf biotechnologische Verfahren gesetzt, um Succinat aus nachwachsenden Rohstoffen zu gewinnen (Pinazo *et al.*, 2015; Dessie *et al.*, 2018). Aktuell werden unterschiedliche Strategien gefahren, um biobasiertes Succinat zu produzieren, wobei als Ausgangsstoff in der Regel eine glucosehaltige Ressource genutzt wird (Nghiem *et al.*, 2017). Zur Umwandlung werden fast ausschließlich Mikroorganismen eingesetzt, die den Zucker entweder (meist aerob) durch einen gentechnisch modifizierten Citratzyklus oder durch anaerobe Fumaratatmung verstoffwechseln (Nghiem *et al.*, 2017). Zu den erfolgreichsten Systemen zählen der Einsatz von rekombinanten *E. coli*- und *Saccharomyces*-Stämmen sowie natürlich selektierten Succinatproduzenten wie z.B. *Basfia succiniciproducens* und *Actinobacillus succinogenes* (Mancini *et al.*, 2019). Als Ausgangsmaterialien werden vor allem agrar- und forstwirtschaftliche Erzeugnisse genutzt, wobei hauptsächlich stärke- oder lignocellulosehaltige Substrate in die Succinatproduktion eingehen (Mancini *et al.*, 2019). Als primärer Polysaccharidverwerter der Darmmikrobiota wäre *P. copri* entsprechend ein geeigneter Kandidat, um aus pflanzlichen Rohstoffen biobasiertes Succinat herzustellen.

*P. copri* produzierte in den ersten Wachstumsexperimenten unter nur schwachgepufferten Bedingungen bereits 16 mM Succinat aus 22 mM Glucose, was einem Ertrag von 0,45 g Succinat pro g Glucose entsprach (siehe **Kapitel 4.2.6**). Durch Pufferung des pH-Werts mit Hilfe von  $\text{CaHCO}_3$  oder  $\text{Ca(OH)}_2$  und höheren Substratkonzentrationen konnte dieser Wert außerdem ohne weitere Optimierung auf etwa 0,5 – 0,7 g Succinat pro g Glucose gesteigert werden, wobei ein maximaler Succinat-Titer von  $\sim 25 \text{ g l}^{-1}$  erreicht wurde. Damit konnten ähnlich vielversprechende Produktionsparameter für *P. copri* ermittelt werden, wie einst bei den mittlerweile etablierten Succinatproduzenten *A. succinogenes* oder *B. succiniciproducens* (McKinlay *et al.*, 2007; Mancini *et al.*, 2019; Scholten and Dägele, 2008). Tatsächlich verlaufen sogar einige aktuelle Produktionsverfahren immer noch bei ähnlichen Erträgen und vergleichbaren bis nur leicht höheren Produkt-Titern (Mancini *et al.*, 2019).

**Tab. 27: Übersicht über ausgewählte biotechnologische Produktionsverfahren zur Herstellung von Succinat mit Hilfe von verschiedenen Mikroorganismen und Substraten.** Sortiert nach den maximal erreichten Succinat-Titern. GVO = gentechnisch veränderter Organismus, WT = Wildtyp.

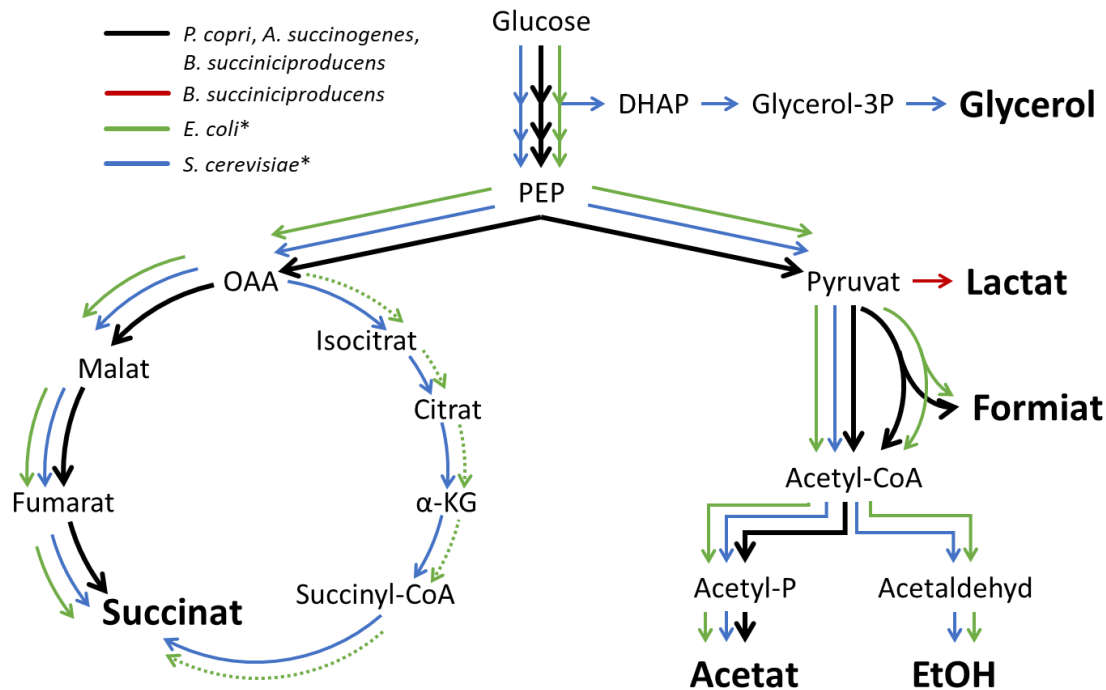
Organismus	Substrat	Ertrag* [g g <sup>-1</sup> ]	Succinat-Titer [g l <sup>-1</sup> ]	Nebenprodukte	Bedingungen	Anmerkung	Quelle
<i>E. coli</i> AFP111 (Tang1528)	Glucose	0,83	89,4	Acetat, Ethanol	Fed-Batch	GVO	Yu et al., 2016
<i>E. coli</i> KJ134	Glucose	1	71,5	Acetat, Formiat, Pyruvat, Malat	Batch	GVO	Jantama et al., 2008
<i>E. coli</i> KJ134	Glucose	0,94	61	Acetat, Formiat, Malat	Batch	GVO	van Heerden and Nicol, 2013
<i>A. succinogenes</i>	Glycerol	0,64	49,6	Acetat, Formiat	Fed-Batch	WT	Carvalho et al., 2016
<i>A. succinogenes</i>	Glucose	0,79	39,4	Acetat, Formiat	Batch	WT	Liu et al., 2008
<i>A. succinogenes</i>	Xylose	0,77	32,6	Acetat, Formiat	Batch	WT	Liu et al., 2008
<i>P. copri</i> DSM 18205	Glucose	0,7	25	Acetat, Formiat	Batch/ Fed-Batch	WT	Diese Arbeit
<i>A. succinogenes</i>	Glycerol	0,95	24,4	Acetat, Formiat	Batch	WT	Carvalho et al., 2016
<i>A. succiniciproducens</i>	Molke <sup>†</sup>	0,72	24	Acetat	Fed-Batch	WT	Samuelov et al., 1991
<i>A. succinogenes</i>	GAX <sup>‡</sup>	0,56	20,5	Acetat, Formiat	kontinuierlich Fermentation	immobilisierte Zellen	Ferone et al., 2018
<i>B. succiniciproducens</i> BPP7	<i>Arundo donax</i> Hydrolysat <sup>‡</sup>	0,54	17	Acetat, Formiat, Lactat	Batch	WT	Cimini et al., 2016
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> MBEL55E	Glucose	0,68	13,5	Acetat, Formiat, Lactat	Batch	WT	Lee et al., 2002
<i>B. succiniciproducens</i> DD1	Glucose/ Saccharose	0,6	5,8	Acetat, Formiat	Batch	WT	Scholten and Dägele, 2008
<i>S. cerevisiae</i> H22ura3Δsdh2Δsdh1Δidh1Δidp1	Glucose	0,07	3,62	Acetat, Glycerol, Ethanol	Batch	GVO	Raab et al., 2010

\*Succinat pro Substrat, <sup>†</sup>hauptsächlich Lactose, <sup>‡</sup>Gemisch aus Glucose, Arabinose und Xylose, <sup>‡</sup>hauptsächlich Glucose und Xylose

Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Produktionsparameter von *P. copri* mit denen von bereits beschriebenen Verfahren, fällt auf, dass vor allem gentechnisch veränderte *E. coli*-Stämme zu den effektivsten Succinatproduzenten gezählt werden (**Tab. 27**). In solchen Fällen wurde der Metabolismus der Stämme ausführlich gentechnisch modifiziert, um Erträge um 1 g Succinat pro g Substrat und Produkttiter jenseits der 50 g l<sup>-1</sup> zu erhalten (Mancini *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2016; Jantama *et al.*, 2008; van Heerden and Nicol, 2013). Hierbei gibt es jedoch zwei große Nachteile, die die Effektivität dieser Verfahren zum Teil relativieren: Erstens sind aus industrieller Sicht fast nur genomische Modifikationen interessant, da so die Stammerhaltung auch während einer Hochzellichtenfermentation gewährleistet werden kann. Plasmid-basierte Verfahren, die auf Selektionsmarker angewiesen sind, lassen sich daher industriell nur bedingt einsetzen, sodass einige veröffentlichte Methoden eher nicht zur Anwendung kommen werden (Yu *et al.*, 2016). Zusätzlich sind Produkte aus Verfahren mit gentechnisch veränderten Organismen (GVOs) je nach Absatzmarkt schwieriger zu verkaufen, und daher nur für bestimmte Bereiche wirtschaftlich. Zweitens kommt es bei biotechnologischen Produktionsverfahren mit *E. coli* häufig zu einem sogenannten *overflow metabolism*, wodurch es zur Ansammlung von Stoffwechselintermediaten wie Pyruvat oder Malat in der Fermentationsbrühe kommt (Basan *et al.*, 2015). Es akkumulieren also neben den sonstigen Endprodukten weitere Substanzen, die den Ertrag senken und die Aufreinigung des Succinats erschweren (Jantama *et al.*, 2008; van Heerden and Nicol, 2013; Mancini *et al.*, 2019). Nichtsdestotrotz werden aktuell *E. coli*-Stämme in wirtschaftlichen Anlagen, z.B. von BioAmber (Pomacle, Frankreich) oder Myriant (Luisiana, USA), eingesetzt (Mancini *et al.*, 2019). Ansonsten werden hauptsächlich *A. succinogenes*- und *B. succiniciproducens*-Wildtypen zur Produktion von Succinat verwendet (Carvalho *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2008; Ferone *et al.*, 2018; Cimini *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2002; Scholten and Dägele, 2008). Da hier häufig auf Gentechnik verzichtet wird, sucht man zur Prozessoptimierung stattdessen gezielt nach Stämmen, deren Stoffwechsel die Bildung von Succinat natürlicherweise begünstigen (Scholten and Dägele, 2008; Lee *et al.*, 2002; Mancini *et al.*, 2019). Außerdem steigern die kontrollierten Fermentationsbedingungen die Erträge (zwischen 0,5 und 0,8 g g<sup>-1</sup>) und die Produkttiter (bis zu 50 g l<sup>-1</sup>) der Verfahren (Carvalho *et al.*, 2016; Mancini *et al.*, 2019). Wie auch *P. copri* produzieren *A. succinogenes* und *B. succiniciproducens* neben Succinat vor allem Acetat und Formiat als Endprodukte des Zentralstoffwechsels, welche in Aufreinigungsschritten vom Succinat abgetrennt werden müssen (**Tab. 27**). Da beide Bakterien außerdem aus dem Pansen von Wiederkäuern stammen, lässt sich *P. copri* insgesamt am besten mit diesen Succinatproduzenten vergleichen. Die Ähnlichkeit zu den bereits verwendeten Organismen und die vergleichbaren Produktionsparameter sprechen dafür, dass sich *P. copri* sehr wahrscheinlich

auch zu einem erfolgreichen Succinatproduzenten etablieren ließe. Vor allem auch, da aktuell vermehrt auf nachwachsende Rohstoffe als Ausgangssubstrate zur Herstellung der Plattformchemikalie gesetzt wird (**Tab. 27**)(Mancini *et al.*, 2019). Da *P. copri* bereits über eine Vielzahl von Enzymen zur Hydrolyse von pflanzlichen Polysacchariden (z.B. Xylan) verfügt, ist der Organismus ein nahezu idealer Kandidat für die nachhaltige Produktion von Succinat.

Um die bis jetzt mit *P. copri* erreichten Ergebnisse zur Produktion von Succinat noch weiter zu optimieren, müssten ein paar Herausforderungen überwunden werden, die sich bereits in den experimentellen Vorarbeiten herauskristallisierten: So müsste z.B. für eine Ertragsmaximierung das Produktspektrum von *P. copri* durch Manipulation des Zentralstoffwechsels angepasst werden, da die zusätzliche Produktion der Endprodukte Acetat und Formiat aus der gleichen Kohlenstoffquelle die Menge des gewünschten Endprodukts verringert und die Aufreinigung desselben zusätzlich erschwert (Mancini *et al.*, 2019). Diese Anpassung muss jedoch bei fast allen Succinat-produzierenden Organismen durchgeführt werden, da die entsprechenden Stoffwechselwege wie bei *P. copri* hauptsächlich auf der reduktiven Produktion von Succinat (Fumaratatmung) basieren. Außerdem benötigen die Organismen grundsätzlich hierfür und für den Aufbau von Biomasse Reduktionsäquivalente, die aus einem anderen Teil des Stoffwechsels stammen und in der Regel Stoffwechselendprodukte erzeugen: Da Fumaratatmer häufig keinen geschlossenen Citratzyklus besitzen, erfolgt die Bereitstellung von [H] meist nur über die glykolytischen Prozesse wie EMP-Weg oder oxidativer PPP, und über die unvollständige Oxidation von Pyruvat zu Acetyl-CoA bzw. ultimativ zu Acetat. Gleichzeitig führt die notwendige Regulation des Redoxhaushalts in vielen dieser Organismen zu einem Gärungsstoffwechsel, welcher zusätzliche Endprodukte wie z.B. Lactat oder Ethanol erzeugt. Eine vollständige Unterbindung der Synthese dieser Endprodukte lässt sich allerdings aufgrund der Notwendigkeit für den Gesamtstoffwechsel nur in seltenen Fällen bewerkstelligen, sodass viele Produktionssysteme die Nebenprodukte, wenn auch in möglichst geringen Mengen, in Kauf nehmen; oder diesen Umstand möglicherweise sogar gewinnbringend nutzen (Mancini *et al.*, 2019). Ein Beispiel hierfür ist die Produktion von Succinat mit gentechnisch veränderten *S. cerevisiae*-Stämmen, die das eingesetzte Substrat gleichzeitig sowohl über Fumaratatmung als auch einen unterbrochenen Citratzyklus zu Succinat verstoffwechseln, also den Citratzyklus im Prinzip sowohl reduktiv als auch oxidativ durchlaufen (**Abb. 46**)(Mancini *et al.*, 2019; Raab *et al.*, 2010). Da der Produktionsstamm durch den modifizierten Stoffwechsel zusätzlich größere Mengen Ethanol akkumuliert, kann aus einem Fermentationsansatz sowohl Succinat als auch Bioethanol vermarktet werden (Mancini *et al.*, 2019; Raab *et al.*, 2010).



**Abb. 46: Schematischer Vergleich der Succinat-Produktion in *P. copri* und den wichtigsten etablierten Produktionsstämmen.** DHAP = Dihydroxyacetonphosphat, Glycerol-3P = Glycerol-3-phosphat, PEP = Phosphoenolpyruvat, OAA = Oxalacetat, α-KG = α-Ketoglutarat, Acetyl-P = Acetylphosphat. Die mit „\*“-versehenen Organismen repräsentieren gentechnisch veränderte Stämme der jeweiligen Spezies. Gestrichelte Pfeile stellen Stoffwechselwege dar, die nicht in allen Succinat-Produktionsstämmen einer Spezies eine Rolle spielen.

*P. copri* erzeugt durch seinen zentralen Energie- und Kohlenstoffmetabolismus neben Succinat nur zwei weitere Endprodukte, sodass genetische Modifikationen zur Steigerung des prozentualen Succinat-Anteils vermutlich nur in geringen Maßen erforderlich sind. Ein sinnvoller Eingriff wäre in diesem Zusammenhang sicherlich die Deletion des Gens der Pyruvat-Formiat-Lyase, die in *P. copri* „nur“ dazu dient, überschüssige Reduktionsäquivalente abzugeben (siehe auch **Kapitel 4.2.6** und **5.5**). Durch die Deletion wäre der Organismus gezwungen die überschüssigen Reduktionsäquivalente anderweitig zu entfernen, was in *P. copri* dann wahrscheinlich nur noch über vermehrte Atmungsaktivität passieren kann. So würde gleichzeitig nicht nur der Anteil an Formiat verschwinden und vermutlich zusätzlich die Menge an gebildetem Acetat vermindert, sondern auch die Succinatproduktion grundsätzlich gesteigert. Im Gegensatz hierzu ließe sich eine vollständige Unterbindung der Acetatproduktion aus Pyruvat in *P. copri* wahrscheinlich nicht realisieren, da der Organismus das über die Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase produzierte  $Fd_{red}$  für den eigenen Anabolismus benötigt. Zusätzlich würde sich das fehlende ATP aus der Reaktion der Acetatkinase auch im Energiehaushalt bemerkbar machen, sodass dieser Stoffwechselweg vermutlich essentiell für wachsende *P. copri*-Kulturen ist.

Vorteilhaft war in diesem Zusammenhang, dass die puffernden Bedingungen, und die höheren  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen bereits zu einer Verschiebung der Endproduktverhältnisse führte, die sich zu Gunsten des Succinats auswirkten. Der beobachtete Effekt beruhte dabei vermutlich auf drei sich ergänzenden Faktoren: Erstens könnte der respiratorische Bereich des Stoffwechsels von *P. copri* durch die erhöhten  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen stimuliert worden sein, was bereits für andere Fumaratatmer gezeigt werden konnte (Samuelov *et al.*, 1991; Caspari and Macy, 1983). Hierbei ist vor allem die PEP-Carboxykinase relevant, welche  $\text{HCO}_3^-$  als Co-Substrat für die Carboxylierung von PEP zu OAA verwendet, und daher direkt von höheren  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -Konzentrationen profitiert bzw. stimuliert wird (Podkovyrov and Zeikus, 1993). Interessanterweise spielte möglicherweise auch das zusätzliche  $\text{Ca}^{2+}$  eine Rolle, da für den Reaktionsmechanismus des Enzyms zweiwertige Ionen benötigt werden, und  $\text{Ca}^{2+}$  z.B. in *E. coli* als Aktivator der PEP-Carboxykinase fungiert (Sudom *et al.*, 2003). Wahrscheinlich lagen so insgesamt Bedingungen vor, die die katalysierte Reaktion der PEP-Carboxykinase begünstigten, sodass auch die weiterführende Produktion von Succinat ausgehend von OAA verstärkt wurde. Zweitens sorgte die pH-Pufferung dafür, dass die schwachsauren Endprodukte Succinat, Acetat und Formiat in hohen Konzentrationen im Medium akkumulierten und aufgrund ihrer pKs-Werte trotz der gepufferten Bedingungen anteilig in ihren protonierten Formen vorlagen. Als protonierte Säuren können die Endprodukte die Cytoplasmamembran des Bakteriums passieren, wobei die freien Säuren Protonen aus dem umliegenden Millieu mit in die Zelle hinein transportieren. Durch anschließende Deprotonierung im Cytoplasma werden so Protonen entgegen dem elektrochemischen Protonengradienten über die Cytoplasmamembran geführt, wodurch es zur Entkopplung der Atmungskette kommt. So muss das Bakterium Energie investieren, um den elektrochemischen Ionengradienten aufrecht zu erhalten (Skulachev, 1998). Drittens führte die Akkumulation der Endprodukte zusätzlich zu einem Anstieg der Anionen-Konzentration in der Umgebung, wodurch auch der intrazelluläre Ionenhaushalt der Zellen verändert würde (Russell and Diez-Gonzalez, 1997; Pinhal *et al.*, 2019; Carpenter and Broadbent, 2009). Die osmochemische Veränderung des Ionenhaushalts führte wahrscheinlich dazu, dass die Zellen die Anionen durch bspw. den Einstrom von  $\text{K}^+$ , oder den aktiven Ausstrom von Anionen (z.B. Glutamat) konterten (Carpenter and Broadbent, 2009; Pinhal *et al.*, 2019). In jedem Fall musste (teilweise) Energie, die ansonsten für den Anabolismus zur Verfügung gestanden hätte, für den notwendigen Ionen-Transport investiert werden. So hätte schon allein die Anionen-Akkumulation abseits der entkoppelnden Wirkung den Energiehaushalt der Zelle verändert, und damit das Spektrum der Endprodukte beeinflusst. Da es sich bei den intrazellulär akkumulierten Anionen zum Teil auch um die Endprodukte des Stoffwechsels selbst gehandelt haben könnte, sind außerdem Rückkopplungen und regulatorische Effekte in Betracht zu

ziehen, die den Zentralstoffwechsel direkt beeinflussen haben könnten (Pinhal *et al.*, 2019). So ist z.B. bekannt, dass erhöhte intrazelluläre Acetat-Konzentrationen in *E. coli* zu einer Zunahme des Acetyl-Phosphat-Spiegels führen. Acetyl-Phosphat dient hierbei nicht nur als Vorläufer der Acetat-Synthese sondern fungiert vor allem auch als globales Signalmolekül, das als Phosphoryl-Donor in der Lage ist, Regulatoren von Zweikomponentensystemen zu phosphorylieren (Wolfe, 2010). Hierdurch können eine Vielzahl von Antwort-Kaskaden ausgelöst werden, wodurch z.B. in *E. coli* die Begeißelung der Zelle inhibiert und die Kapselbildung stimuliert wird (Wolfe, 2010). Außerdem inhibieren erhöhte Acetat-Konzentrationen im Cytoplasma von *E. coli* dessen Methionin-Synthase, da die Methionin-Synthase MetE und vermutlich weitere Enzyme dieses Biosynthesewegs durch Acetat inaktiviert werden (Mordukhova and Pan, 2013; Roe *et al.*, 2002; Pinhal *et al.*, 2019). Ähnliche Effekte auf zentrale Stoffwechsel- und Biosynthesewege wären deshalb auch in *P. copri* denkbar. Die Akkumulation von anionischen Endprodukten (vor allem Acetat) könnte also auf verschiedenen Ebenen Auswirkungen auf den Metabolismus von *P. copri* gehabt haben, wodurch sich das beobachtete Wachstumsverhalten und das veränderte Endprodukt-Spektrum erklären ließe.

Da die Auswirkungen von schwachsauren Stoffwechselendprodukten normalerweise vor allem bei einem pH-Gefälle von intra- zu extrazellulärem Raum zu beobachten sind, nutzen Organismen, die in sauren Umgebung leben z.B. die Strategie, den pH-Wert des Cytoplasmas dem der Umgebung anzupassen (Pinhal *et al.*, 2019; Russell and Diez-Gonzalez, 1997; Ricke, 2003). Da *P. copri* diese Möglichkeit nicht besitzt, fand mit zunehmender Konzentration an Endprodukten wahrscheinlich auch eine zunehmende Veränderung des Metabolismus (durch Stimulierung der PEP-Carboxykinase, Entkopplung der Atmungskette und allgemeine Beeinflussung des Stoffwechsels durch Endprodukte) statt. Die Entkopplung der Atmungskette hätte in *P. copri* dazu geführt, dass der Organismus verstärkt Reduktionsäquivalente in die Produktion von Succinat investieren musste, um dem Abbau des  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  entgegenzuwirken, wodurch insgesamt weniger Reduktionsäquivalente für den Aufbau von Biomasse zur Verfügung gestanden hätten. Vor allem aber nahm die Menge an gebildetem Formiat (und anteilig Acetat) ab, da *P. copri* keine überschüssigen [H] über die Pyruvat-Formiat-Lyase entfernen musste. So erhöhte sich insgesamt der prozentuale Anteil an Succinat im Vergleich zu Acetat und vor allem Formiat. Ähnlich zur Entkopplung hätte auch der inhibitorische Effekt der steigenden Anionen-Konzentration gewirkt. Da die Zellen den zunehmenden osmotischen Stress ausgleichen mussten, wurde sehr wahrscheinlich Energie für den aktiven Export von Anionen investiert, wodurch insgesamt weniger Energie für den Anabolismus der Zelle zur Verfügung stand bzw. prozentual mehr Katabolismus betrieben wurde. Formiat (und anteilig Acetat) als Marker für die Aktivität des Anabolismus von *P. copri* (siehe auch **Kapitel 4.2**) wäre damit entsprechend in



geringeren Mengen produziert worden, was ebenfalls zur Verschiebung des Produktspektrums geführt hätte. Zudem hätten erhöhte intrazelluläre Acetat-Konzentrationen den Zentralstoffwechsel des Organismus zusätzlich auf mehreren Ebenen beeinflusst. So veränderte sich das Produktspektrum von *P. copri* aufgrund verschiedener Effekte zu Gunsten von Succinat. Aus industrieller Sicht wäre ein gezielter Einsatz solcher Succinat-fördernder Bedingungen durchaus interessant, da die natürliche Succinatproduktion von *P. copri* wahrscheinlich ohne großen technischen oder finanziellen Aufwand gesteigert werden könnte. Hierfür könnte man z.B. mit hohen Produktionstitern bei gleichzeitiger pH-Kontrolle arbeiten. Auch die Verwendung von Atmungskettenentkopplern könnte erfolgsversprechend sein, um gezielt und kontrolliert einen optimalen Grad an Entkopplung zu erzeugen, bei dem der Organismus möglichst ertragreich das eingesetzte Substrat zu Succinat umsetzt.

Die Fermentationsversuche zeigten zusammen mit den Untersuchungen zur Ausfällung von Bernsteinsäure unter Anwesenheit von Medienbestandteilen, dass der Einsatz von  $\text{Ca}^{2+}$  im Kultivierungsmedium nicht zu der gewünschten Ausfällung der Endprodukte führte. Zwar wird  $\text{Ca}^{2+}$  in der Industrie tatsächlich genutzt, um Succinat aus der Fermentationsbrühe abzutrennen, allerdings wird hierfür in der Regel Kalkmilch in größeren Mengen eingeleitet, ohne den pH-Wert neutral halten zu müssen, da die Bakterienzellen zu diesem Zeitpunkt bereits aus der Brühe entfernt wurden (Thakker *et al.*, 2012; Kurzrock and Weuster-Botz, 2010; Mancini *et al.*, 2019). Mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Überschusses ist es dann auch möglich trotz komplexer Medienbestandteile Succinat vollständig abzutrennen. In modernen Succinat-Produktionsanlagen wird außerdem vermehrt mit immobilisierten Zellen gearbeitet, sodass Succinat in einem kontinuierlichen Prozess in separaten Reaktoren ausgefällt werden kann (Mancini *et al.*, 2019). Hierdurch ist es möglich, mit zellschonenderen Produkttitern zu arbeiten und das eingesetzte Medium unter Umständen mehrfach zu recyceln. Für die labormaßstäbliche Nachempfindung einer solchen kontinuierlichen Entfernung der Endprodukte bedarf es also mehr als den bloßen Einsatz von Calciumsalzen. Zwar war es mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode nicht möglich, mehr als knapp 300 mM Glucose zu etwa 215 mM Succinat (plus ~150 mM Acetat und ~80 mM Formiat) umzusetzen, allerdings zeigt dies im Umkehrschluss, dass *P. copri* prinzipiell hohe Produktkonzentrationen gut erträgt.

So konnte mit Hilfe des menschlichen Darmbakteriums *P. copri* erstmalig gezielt das C4-Dicarboxylat Succinat produziert werden. Der Organismus brachte dabei natürlicherweise wichtige Eigenschaften zur Herstellung dieser Plattformchemikalie mit, wodurch unter einfachen Bedingungen und ohne großartige Optimierungsschritte bereits konkurrenzfähige Produktionsparameter erreicht werden konnten.

## 6 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der zentrale Energie- und Kohlenstoffmetabolismus des wichtigen Darmbakteriums *P. copri* rekonstruiert, seine grundlegenden Wachstumseigenschaften erfasst und die gewonnenen Daten mit zwei weiteren zentralen Bakterien der menschlichen Intestinalflora (*B. vulgatus* und *P. johnsonii*) verglichen. Zusätzlich wurde überprüft, ob sich *P. copri* aufgrund seiner metabolischen Eigenschaften zur biotechnologischen Produktion der zukunftssträchtigen Plattformchemikalie Succinat einsetzen lässt. Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- 1.) Es konnte ein Komplex- (PYG) und ein Minimalmedium (DMMG) identifiziert werden, um *P. copri* erfolgreich zu kultivieren. Das Bakterium benötigt Vitamin K, Hämin und Vitamin B12 und erreichte in den genannten Medien mit Verdopplungszeiten von 40 min (in PYG) bzw. 2,5 h (DMMG) finale OD<sub>600</sub> von 2,6 bzw. 1,5. Dabei wurde eine Zelltrockenmasse von 0,43±0,08 bzw. 0,40±0,06 g l<sup>-1</sup> pro OD<sub>600</sub> von 1 produziert. Im Zuge der Experimente konnte außerdem festgestellt werden, dass *P. copri* etwa 20 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> benötigt, um optimal zu wachsen. Zum Vergleich benötigte *B. vulgatus*, als Vertreter der mit *P. copri* konkurrierenden Gattung *Bacteroides*, hierfür nur etwa 10 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Analysen zum HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Gehalt von menschlichen Feces zeigten, dass diese CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Abhängigkeit bemerkenswerte Implikationen für die Darmflorazusammensetzung haben kann, da im Colon von einigen Menschen Bedingungen vorherrschen, bei denen das Wachstum von *P. copri* eingeschränkt gewesen wäre.
- 2.) Es wurde die Elementarzusammensetzung von *P. copri* bestimmt, wodurch eine vereinfachte, C-normalisierte Biomasseeinheit von C<sub>1</sub>H<sub>1,79</sub>O<sub>0,43</sub>N<sub>0,23</sub> errechnet werden konnte. Außerdem wurde festgestellt, dass der Organismus Glycogen als Speicherstoff einlagert.
- 3.) Anhand von bioinformatischen, transkriptionellen und enzymatischen Untersuchungen konnte ein zentrales Stoffwechselmodell von *P. copri* für die Verstoffwechslung von Glucose erstellt werden. Das Bakterium baut Glucose im Katabolismus über den EMP-Weg ab, wobei PEP und Pyruvat die zentralen Stoffwechselintermediate darstellen. PEP wird zum einen zu Fumarat verstoffwechselt, das in der anaeroben Atmungskette von *P. copri* als terminaler Elektronenakzeptor fungiert und zu Succinat reduziert wird. Zum anderen wird PEP zu Pyruvat umgewandelt. Pyruvat wiederum wird entweder über eine Pyruvat-Formiat-Lyase oder eine Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zu Acetyl-CoA umgesetzt, wobei das erste Enzym zusätzlich Formiat und das letzte Enzym zusätzlich Fd<sub>red</sub> und CO<sub>2</sub> freisetzt. Acetyl-CoA wird anschließend zu Acetat verstoffwechselt. Die funktionelle Einheit der

Atmungskette von *P. copri* besteht aus den Enzymen Nqr, einer „kopfloren“ NDHI-Variante und der Fumaratreduktase. Elektronen für die Reduktion von Fumarat werden über NADH und  $\text{Fd}_{\text{red}}$  bereitgestellt und es wird ein elektrochemischer Ionengradient mit den Kopplungen  $\text{H}^+$  und  $\text{Na}^+$  erzeugt. Zusätzlich sind die Gene für einen Rnf-Komplex, sowie eine Cytochrom-bd-Chinoloxidase codiert, die allerdings unter den getesteten Bedingungen nicht transkribiert vorlagen.

- 4.) Versuche mit ruhenden Zellen zeigten, dass die ATP-Bildung der Atmungskette in *P. copri* protonenabhängig verläuft. Eine bioinformatische Analyse zur Untereinheit C der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase bestätigte außerdem, dass der Enzymkomplex keine  $\text{Na}^+$  zur Phosphorylierung von ATP nutzen kann, weswegen die durch die Nqr translozierten  $\text{Na}^+$  vermutlich über einen  $\text{H}^+/\text{Na}^+$ -Antiporter gegen  $\text{H}^+$  eingetauscht werden.
- 5.) Durch Bestimmung des Trockengewichts, des Substratverbrauchs und der Produktbildung von Kulturen in unterschiedlichen Wachstumsphasen konnte der Fluss der Intermediate im zentralen Energie- und Kohlenstoffmetabolismus von *P. copri* rekonstruiert werden. Während Glucose von Kulturen in Komplexmedium fast vollständig im Katabolismus verwertet wurde, investierten Kulturen in Minimalmedium 22,7 % der Glucose in den Aufbau von Biomasse. Der Fluss der Intermediate zeigte außerdem, dass die  $\text{CO}_2$ -Abhängigkeit von *P. copri* durch das Ungleichgewicht im  $\text{CO}_2$ -Bedarf der PEP-Carboxykinase und der  $\text{CO}_2$ -Freisetzung der Pyruvat:Ferredoxin-Oxidoreduktase zustande kam, was direkt mit der gebildeten Menge an Formiat korrelierte. Zusätzlich wurde der Redox-Haushalt des Metabolismus bilanziert. Es zeigte sich, dass die im Katabolismus netto gewonnenen Reduktionsäquivalente den Bedarf an  $[\text{H}]$  für die Bildung der Biomasse aus Glucose zu 97,2 % abdeckten, sodass hiermit die aufgestellte Rekonstruktion bestätigt werden konnte.
- 6.) Auch der Zentralstoffwechsel von *B. vulgatus* und *P. johnsonii* wurde wie oben beschrieben analysiert. Die beiden Organismen zeigten einen ähnlichen Grundaufbau wie *P. copri*, wobei sich im Detail bemerkenswerte Unterschiede feststellen ließen: So waren *B. vulgatus* und *P. johnsonii* z.B. in der Lage, Propionat aus Succinat zu produzieren, was den  $\text{CO}_2$ -Bedarf der Fumaratatmung stöchiometrisch ausgleicht. Außerdem produzierte *B. vulgatus* Lactat aus Pyruvat. *P. johnsonii* besaß hingegen keine Gene des „kopfloren“ NDHI, dafür aber die Gene der Schlüsselenzyme des oxidativen PPP. Für beide Organismen wurden die Zelltrochmassen, der Substratverbrauch und die Produktbildung bestimmt. Die Wachstumserträge lagen bei 26,7 bzw. 43 g pro Mol Glucose. Die C- und  $[\text{H}]$ -Bilanzen gingen bei *B. vulgatus* zu 94 % und 95,21 % auf, wohingegen die Bilanzierung des C- und  $[\text{H}]$ -Haushalts von *P. johnsonii* nicht annähernd 100 % erreichte. Es wurde die Hypothese

aufgestellt, dass *P. johnsonii* einen Teil der konsumierten Glucose vollständig über den oxidativen PPP zu  $\text{CO}_2$  oxidiert, was die Diskrepanz zwischen Messdaten und Stoffwechselmodell erklären würde.

- 7.) Es wurden Versuche unternommen, um die Plattformchemikalie Succinat mit Hilfe von *P. copri* zu produzieren. Unter  $\text{CaHCO}_3^-$ - und  $\text{Ca(OH)}_2$ -gepufferten Bedingungen konnten 0,5-0,7 g Succinat pro g Glucose umgesetzt werden mit einem maximalen Produkttiter von 25 g  $\text{l}^{-1}$  ( $\approx 215$  mM). Dabei zeigte sich, dass die komplexen Bestandteile von PYG die Ausfällung der Stoffwechselprodukte durch  $\text{Ca}^{2+}$  bei neutralem pH-Wert verhinderten. Dennoch sorgten die Bedingungen für eine Steigerung der natürlichen Succinatproduktion von *P. copri*, sodass ohne weitere Optimierung bereits vielversprechende Ergebnisse erzielt werden konnten.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit erstmalig die grundlegenden Eigenschaften von wichtigen Bakterien der menschlichen Intestinalflora detailliert untersucht. Es konnten Rückschlüsse gezogen werden, die zum allgemeinen Verständnis über die Formung und Funktion der Darmmikrobiota beitragen, und die *P. copri* als einen potenziell biotechnologisch nutzbaren Organismus identifizieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- Accetto, T., Avguštin, G. (2015):** Polysaccharide utilization locus and CAZYme genome repertoires reveal diverse ecological adaptation of *Prevotella* species. *Systematic and applied microbiology*, 38: 453–461, doi: 10.1016/j.syapm.2015.07.007.
- Accetto, T., Avguštin, G. (2018):** The diverse and extensive plant polysaccharide degradative apparatuses of the rumen and hindgut *Prevotella* species: A factor in their ubiquity? *Systematic and applied microbiology*, doi: 10.1016/j.syapm.2018.10.001.
- Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoenser, J., Friedrich, T., Bald, D., Vries, S. de (2016):** Cytochrome bd Displays Significant Quinol Peroxidase Activity. *Scientific reports*, 6: 27631, doi: 10.1038/srep27631.
- Albenberg, L., Esipova, T.V., Judge, C.P., Bittinger, K., Chen, J., Laughlin, A., Grunberg, S., Baldassano, R.N., et al. (2014):** Correlation between intraluminal oxygen gradient and radial partitioning of intestinal microbiota. *Gastroenterology*, 147: 1055-63.e8, doi: 10.1053/j.gastro.2014.07.020.
- Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Le Paslier, D., Yamada, T., Mende, D.R., Fernandes, G.R., Tap, J., et al. (2011):** Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473: 174–180, doi: 10.1038/nature09944.
- Atlas, R. (2010)** *Handbook of Microbiological Media, Fourth Edition*, CRC Press.
- Bacic, M.K., Smith, C.J. (2008):** Laboratory maintenance and cultivation of *Bacteroides* species. *Current protocols in microbiology*, Chapter 13: Unit 13C.1, doi: 10.1002/9780471729259.mc13c01s9.
- Bäckhed, F., Roswall, J., Peng, Y., Feng, Q., Jia, H., Kovatcheva-Datchary, P., Li, Y., Xia, Y., et al. (2015):** Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell host & microbe*, 17: 690–703, doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- Bao, X.-L., Lv, Y., Yang, B.-C., Ren, C.-G., Guo, S.-T. (2008):** A study of the soluble complexes formed during calcium binding by soybean protein hydrolysates. *Journal of food science*, 73: C117-21, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00673.x.
- Basan, M., Hui, S., Okano, H., Zhang, Z., Shen, Y., Williamson, J.R., Hwa, T. (2015):** Overflow metabolism in *Escherichia coli* results from efficient proteome allocation. *Nature*, 528: 99–104, doi: 10.1038/nature15765.

- Battley, E.H. (1999):** An empirical method for estimating the entropy of formation and the absolute entropy of dried microbial biomass for use in studies on the thermodynamics of microbial growth. *Thermochimica Acta*, 326: 7–15, doi: 10.1016/S0040-6031(98)00584-X.
- Baughn, A.D., Malamy, M.H. (2003):** The essential role of fumarate reductase in haem-dependent growth stimulation of *Bacteroides fragilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 149: 1551–1558, doi: 10.1099/mic.0.26247-0.
- Baughn, A.D., Malamy, M.H. (2004):** The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen. *Nature*, 427: 441–444, doi: 10.1038/nature02285.
- Baykov, A.A., Malinen, A.M., Luoto, H.H., Lahti, R. (2013):** Pyrophosphate-fueled Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> transport in prokaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 77: 267–276, doi: 10.1128/MMBR.00003-13.
- Bereswill, S., Fischer, A., Plickert, R., Haag, L.-M., Otto, B., Köhl, A.A., Dasti, J.I., Dashti, J.I., et al. (2011):** Novel murine infection models provide deep insights into the "ménage à trois" of *Campylobacter jejuni*, microbiota and host innate immunity. *PloS one*, 6: e20953, doi: 10.1371/journal.pone.0020953.
- Berrisford, J.M., Baradaran, R., Sazanov, L.A. (2016):** Structure of bacterial respiratory complex I. *Biochimica et biophysica acta*, 1857: 892–901, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.01.012.
- Biegel, E., Schmidt, S., González, J.M., Müller, V. (2011):** Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 68: 613–634, doi: 10.1007/s00018-010-0555-8.
- Blaut, M., Gottschalk, G. (1984):** Coupling of ATP synthesis and methane formation from methanol and molecular hydrogen in *Methanosarcina barkeri*. *European journal of biochemistry*, 141: 217–222, doi: 10.1111/j.1432-1033.1984.tb08178.x.
- Blazewicz, S.J., Barnard, R.L., Daly, R.A., Firestone, M.K. (2013):** Evaluating rRNA as an indicator of microbial activity in environmental communities: limitations and uses. *The ISME journal*, 7: 2061–2068, doi: 10.1038/ismej.2013.102.
- Boland, M. (2016):** Human digestion - a processing perspective. *Journal of the science of food and agriculture*, 96: 2275–2283, doi: 10.1002/jsfa.7601.

- Borisov, V.B., Gennis, R.B., Hemp, J., Verkhovsky, M.I. (2011):** The cytochrome bd respiratory oxygen reductases. *Biochimica et biophysica acta*, 1807: 1398–1413, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.06.016.
- Bradford, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
- Bryant, M.P., Robinson, I.M. (1962):** Some nutritional characteristics of predominant culturable ruminal bacteria. *Journal of Bacteriology*, 84: 605–614.
- Calderon-Gomez, L.I., Day, C.J., Hartley-Tassell, L.E., Wilson, J.C., Mendz, G.L., Korolik, V. (2017):** Identification of NuoX and NuoY Ligand Binding Specificity in the *Campylobacter Jejuni* Complex I. *Journal of Bacteriology & Parasitology*, 08, doi: 10.4172/2155-9597.1000307.
- Cannan, R.K., Kibrick, A. (1938):** Complex Formation between Carboxylic Acids and Divalent Metal Cations. *Journal of the American Chemical Society*, 60: 2314–2320, doi: 10.1021/ja01277a012.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., Severi, C. (2015):** The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Annals of Gastroenterology : Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology*, 28: 203–209.
- Carey, M.C. (1984):** Bile acids and bile salts: ionization and solubility properties. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 4: 66S-71S, doi: 10.1002/hep.1840040812.
- Carpenter, C.E., Broadbent, J.R. (2009):** External concentration of organic acid anions and pH: key independent variables for studying how organic acids inhibit growth of bacteria in mildly acidic foods. *Journal of food science*, 74: R12-5, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00994.x.
- Carvalho, M., Roca, C., Reis, M.A.M. (2016):** Improving succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* from raw industrial carob pods. *Bioresource technology*, 218: 491–497, doi: 10.1016/j.biortech.2016.06.140.
- Carver, T., Harris, S.R., Berriman, M., Parkhill, J., McQuillan, J.A. (2012):** Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28: 464–469, doi: 10.1093/bioinformatics/btr703.

- Caspari, D., Macy, J.M. (1983):** The role of carbon dioxide in glucose metabolism of *Bacteroides fragilis*. *Archives of microbiology*, 135: 16–24.
- Cecchini, G., Schröder, I., Gunsalus, R.P., Maklashina, E. (2002):** Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochimica et biophysica acta*, 1553: 140–157.
- Chadwick, G.L., Hemp, J., Fischer, W.W., Orphan, V.J. (2018):** Convergent evolution of unusual complex I homologs with increased proton pumping capacity: energetic and ecological implications. *The ISME journal*, 12: 2668–2680, doi: 10.1038/s41396-018-0210-1.
- Chang, E.B., Leung, P.S. (2014):** Intestinal Water and Electrolyte Transport. In *The gastrointestinal system. Gastrointestinal, nutritional and hepatobiliary physiology*. Leung, P.S. (Ed). Springer, Dordrecht: pp. 107–134.
- Chen, M., Wolin, M.J. (1981):** Influence of heme and vitamin B12 on growth and fermentations of *Bacteroides* species. *Journal of Bacteriology*, 145: 466–471.
- Cheng, M., Ning, K. (2019):** Stereotypes About Enterotype: the Old and New Ideas. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 17: 4–12, doi: 10.1016/j.gpb.2018.02.004.
- 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, doi: 10.1016/j.ymben.2017.02.004.
- Cimini, D., Argenzio, O., D'Ambrosio, S., Lama, L., Finore, I., Finamore, R., Pepe, O., Faraco, V., Schiraldi, C. (2016):** Production of succinic acid from *Basfia succiniciproducens* up to the pilot scale from *Arundo donax* hydrolysate. *Bioresource technology*, 222: 355–360, doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.004.
- Cockburn, D.W., Koropatkin, N.M. (2016):** Polysaccharide Degradation by the Intestinal Microbiota and Its Influence on Human Health and Disease. *Journal of Molecular Biology*, 428: 3230–3252, doi: 10.1016/j.jmb.2016.06.021.
- Corrêa-Oliveira, R., Fachi, J.L., Vieira, A., Sato, F.T., Vinolo, M.A.R. (2016):** Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clinical & translational immunology*, 5: e73, doi: 10.1038/cti.2016.17.
- Coyne, M.J., Béchon, N., Matano, L.M., McEneaney, V.L., Chatzidaki-Livanis, M., Comstock, L.E. (2019):** A family of anti-Bacteroidales peptide toxins wide-spread in the human gut microbiota. *Nature communications*, 10: 3460, doi: 10.1038/s41467-019-11494-1.



- Craig, M., Slauch, J.M. (2009):** Phagocytic superoxide specifically damages an extracytoplasmic target to inhibit or kill *Salmonella*. *PloS one*, 4: e4975, doi: 10.1371/journal.pone.0004975.
- Cryan, J.F., Dinan, T.G. (2012):** Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature reviews. Neuroscience*, 13: 701–712, doi: 10.1038/nrn3346.
- David, L.A., Materna, A.C., Friedman, J., Campos-Baptista, M.I., Blackburn, M.C., Perrotta, A., Erdman, S.E., Alm, E.J. (2014a):** Host lifestyle affects human microbiota on daily timescales. *Genome biology*, 15: R89, doi: 10.1186/gb-2014-15-7-r89.
- David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., *et al.* (2014b):** Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*, 505: 559–563, doi: 10.1038/nature12820.
- Deaver, J.A., Eum, S.Y., Toborek, M. (2018):** Circadian Disruption Changes Gut Microbiome Taxa and Functional Gene Composition. *Frontiers in microbiology*, 9: 737, doi: 10.3389/fmicb.2018.00737.
- Degnan, P.H., Taga, M.E., Goodman, A.L. (2014):** Vitamin B12 as a modulator of gut microbial ecology. *Cell metabolism*, 20: 769–778, doi: 10.1016/j.cmet.2014.10.002.
- Dehority, B.A., Scott, H.W., Kowaluk, P. (1967):** Volatile Fatty Acid Requirements of Cellulolytic Rumen Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 94: 537–543.
- Del Don, C., Hanselmann, K.W., Peduzzi, R., Bachofen, R. (1994):** Biomass composition and methods for the determination of metabolic reserve polymers in phototrophic sulfur bacteria. *Aquatic Sciences*, 56: 1–15, doi: 10.1007/BF00877431.
- Demirel, Y. (2014):** Thermodynamics and Biological Systems. In *Nonequilibrium Thermodynamics*. Elsevier: pp. 485–562.
- 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: 2325–2340, doi: 10.1194/jlr.R036012.
- 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: 9893–9910, doi: 10.1007/s00253-018-9379-5.

- Deusch, S., Bok, E., Schleicher, L., Seifert, J., Steuber, J. (2019):** Occurrence and Function of the Na<sup>+</sup>-Translocating NADH:Quinone Oxidoreductase in *Prevotella* spp. *Microorganisms*, 7, doi: 10.3390/microorganisms7050117.
- Dibrov, P., Dibrov, E., Pierce, G.N. (2017):** Na<sup>+</sup>-NQR (Na<sup>+</sup>-translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase) as a novel target for antibiotics. *FEMS microbiology reviews*, 41: 653–671, doi: 10.1093/femsre/fux032.
- Dill-McFarland, K.A., Tang, Z.-Z., Kemis, J.H., Kerby, R.L., Chen, G., Palloni, A., Sorenson, T., Rey, F.E., Herd, P. (2019):** Close social relationships correlate with human gut microbiota composition. *Scientific reports*, 9: 703, doi: 10.1038/s41598-018-37298-9.
- Dimroth, P., Ballmoos, C. von, Meier, T. (2006):** Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series. *EMBO reports*, 7: 276–282, doi: 10.1038/sj.embor.7400646.
- Divakaruni, A.S., Paradyse, A., Ferrick, D.A., Murphy, A.N., Jastroch, M. (2014):** Analysis and Interpretation of Microplate-Based Oxygen Consumption and pH Data. In *Mitochondrial Function*. Elsevier: pp. 309–354.
- Donaldson, G.P., Lee, S.M., Mazmanian, S.K. (2016):** Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nature reviews. Microbiology*, 14: 20–32, doi: 10.1038/nrmicro3552.
- Dorrestein, P.C., Mazmanian, S.K., Knight, R. (2014):** Finding the missing links among metabolites, microbes, and the host. *Immunity*, 40: 824–832, doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.015.
- Drmanac, R., Sparks, A.B., Callow, M.J., Halpern, A.L., Burns, N.L., Kermani, B.G., Carnevali, P., Nazarenko, I., et al. (2010):** Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembling DNA nanoarrays. *Science (New York, N.Y.)*, 327: 78–81, doi: 10.1126/science.1181498.
- Efimov, B.A., Chaplin, A.V., Shcherbakova, V.A., Suzina, N.E., Podoprigora, I.V., Shkoporov, A.N. (2018):** *Prevotella rara* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68: 3818–3825, doi: 10.1099/ijsem.0.003066.
- Efremov, R.G., Sazanov, L.A. (2012):** The coupling mechanism of respiratory complex I - a structural and evolutionary perspective. *Biochimica et biophysica acta*, 1817: 1785–1795, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.02.015.

- Eggerth, A.H., Gagnon, B.H. (1933):** The *Bacteroides* of Human Feces. *Journal of Bacteriology*, 25: 389–413.
- Eley, A., Greenwood, D., O'Grady, F. (1985):** Comparative growth of *Bacteroides* species in various anaerobic culture media. *Journal of medical microbiology*, 19: 195–201, doi: 10.1099/00222615-19-2-195.
- Fang, H., Kang, J., Zhang, D. (2017):** Microbial production of vitamin B12: a review and future perspectives. *Microbial cell factories*, 16: 15, doi: 10.1186/s12934-017-0631-y.
- Fehlner-Peach, H., Magnabosco, C., Raghavan, V., Scher, J.U., Tett, A., Cox, L.M., et al. (2019)** Distinct polysaccharide growth profiles of human intestinal *Prevotella copri* isolates.
- Fenn, K., Strandwitz, P., Stewart, E.J., Dimise, E., Rubin, S., Gurubacharya, S., Clardy, J., Lewis, K. (2017):** Quinones are growth factors for the human gut microbiota. *Microbiome*, 5: 161, doi: 10.1186/s40168-017-0380-5.
- Ferone, M., Raganati, F., Ercole, A., Olivieri, G., Salatino, P., Marzocchella, A. (2018):** Continuous succinic acid fermentation by *Actinobacillus succinogenes* in a packed-bed biofilm reactor. *Biotechnology for biofuels*, 11: 138, doi: 10.1186/s13068-018-1143-7.
- Fields, M.W., Russell, J.B. (2000):** Alternative pathways of glucose transport in *Prevotella bryantii* B14. *FEMS microbiology letters*, 183: 137–142, doi: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb08947.x.
- Fischbach, M.A., Sonnenburg, J.L. (2011):** Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell host & microbe*, 10: 336–347, doi: 10.1016/j.chom.2011.10.002.
- Flint, H.J., Bayer, E.A., Rincon, M.T., Lamed, R., White, B.A. (2008):** Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nature reviews. Microbiology*, 6: 121–131, doi: 10.1038/nrmicro1817.
- Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P. (2007):** Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environmental microbiology*, 9: 1101–1111, doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x.
- Flint, H.J., Duncan, S.H., Scott, K.P., Louis, P. (2015):** Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 74: 13–22, doi: 10.1017/S0029665114001463.

- Foster, J.A., McVey Neufeld, K.-A. (2013):** Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends in neurosciences*, 36: 305–312, doi: 10.1016/j.tins.2013.01.005.
- Frank, D.N., Pace, N.R. (2008):** Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Current opinion in gastroenterology*, 24: 4–10, doi: 10.1097/MOG.0b013e3282f2b0e8.
- Franke, T., Deppenmeier, U. (2018):** Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular microbiology*, 109: 528–540, doi: 10.1111/mmi.14058.
- Friedrich, T., Scheide, D. (2000):** The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS letters*, 479: 1–5, doi: 10.1016/S0014-5793(00)01867-6.
- Gibbons, R.J., Macdonald, J.B. (1960):** Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *Journal of Bacteriology*, 80: 164–170.
- Gille, D., Schmid, A. (2015):** Vitamin B12 in meat and dairy products. *Nutrition reviews*, 73: 106–115, doi: 10.1093/nutrit/nuu011.
- Giuffrè, A., Borisov, V.B., Arese, M., Sarti, P., Forte, E. (2014):** Cytochrome bd oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress. *Biochimica et biophysica acta*, 1837: 1178–1187, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.01.016.
- Goh, Y.J., Klaenhammer, T.R. (2014):** Insights into glycogen metabolism in *Lactobacillus acidophilus*: impact on carbohydrate metabolism, stress tolerance and gut retention. *Microbial cell factories*, 13: 94, doi: 10.1186/s12934-014-0094-3.
- Goodman, B.E. (2010):** Insights into digestion and absorption of major nutrients in humans. *Advances in physiology education*, 34: 44–53, doi: 10.1152/advan.00094.2009.
- Gorvitovskaia, A., Holmes, S.P., Huse, S.M. (2016):** Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. *Microbiome*, 4: 15, doi: 10.1186/s40168-016-0160-7.
- Green, R., Allen, L.H., Bjørke-Monsen, A.-L., Brito, A., Guéant, J.-L., Miller, J.W., Molloy, A.M., Nexø, E., et al. (2017):** Vitamin B12 deficiency. *Nature reviews. Disease primers*, 3: 17040, doi: 10.1038/nrdp.2017.40.
- Greening, C., Biswas, A., Carere, C.R., Jackson, C.J., Taylor, M.C., Stott, M.B., Cook, G.M., Morales, S.E. (2016):** Genomic and metagenomic surveys of hydrogenase distribution indicate H<sub>2</sub> is a widely utilised energy source for microbial growth and survival. *The ISME journal*, 10: 761–777, doi: 10.1038/ismej.2015.153.

- Guilhot, E., Lagier, J.C., Raoult, D., Khelaifia, S. (2017):** '*Prevotella ihumii*' sp. nov. and '*Varibaculum timonense*' sp. nov., two new bacterial species isolated from a fresh human stool specimen. *New microbes and new infections*, 18: 3–5, doi: 10.1016/j.nmni.2017.03.002.
- Hahnke, R.L., Meier-Kolthoff, J.P., García-López, M., Mukherjee, S., Huntemann, M., Ivanova, N.N., Woyke, T., Kyrpides, N.C., Klenk, H.-P., Göker, M. (2016):** Genome-Based Taxonomic Classification of Bacteroidetes. *Frontiers in microbiology*, 7: 2003, doi: 10.3389/fmicb.2016.02003.
- Hamilton, I.R., McKee, A.S., Bowden, G.H. (1989):** Growth and metabolic properties of *Bacteroides intermedius* in anaerobic continuous culture. *Oral microbiology and immunology*, 4: 89–97, doi: 10.1111/j.1399-302X.1989.tb00105.x.
- Hayashi, H., Shibata, K., Sakamoto, M., Tomita, S., Benno, Y. (2007):** *Prevotella copri* sp. nov. and *Prevotella stercorea* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 941–946, doi: 10.1099/ijs.0.64778-0.
- Heinonen, J. (1974):** Intracellular concentration of inorganic pyrophosphate in the cells of *Escherichia coli*: A method for its determination. *Analytical Biochemistry*, 59: 366–374, doi: 10.1016/0003-2697(74)90288-7.
- Heinonen, J.K. (2013a):** Biological Production of PPi. In *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate*. Heinonen, J.K. (Ed). Springer Verlag, Boston, MA: pp. 1–28.
- Heinonen, J.K. (2013b):** Regulatory Roles of PPi. In *Biological Role of Inorganic Pyrophosphate*. Heinonen, J.K. (Ed). Springer Verlag, Boston, MA: pp. 123–188.
- Heldal, M., Norland, S., Fagerbakke, K.M., Thingstad, F., Bratbak, G. (1996):** The elemental composition of bacteria: A signature of growth conditions? *Marine Pollution Bulletin*, 33: 3–9, doi: 10.1016/S0025-326X(97)00007-6.
- Hess, V., Schuchmann, K., Müller, V. (2013):** The ferredoxin:NAD<sup>+</sup> oxidoreductase (Rnf) from the acetogen *Acetobacterium woodii* requires Na<sup>+</sup> and is reversibly coupled to the membrane potential. *The Journal of biological chemistry*, 288: 31496–31502, doi: 10.1074/jbc.M113.510255.
- Hooda, J., Shah, A., Zhang, L. (2014):** Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. *Nutrients*, 6: 1080–1102, doi: 10.3390/nu6031080.

- Huang, J., Liang, X., Xuan, Y., Geng, C., Li, Y., Lu, H., Qu, S., Mei, X., et al. (2017):** A reference human genome dataset of the BGISEQ-500 sequencer. *GigaScience*, 6: 1–9, doi: 10.1093/gigascience/gix024.
- Human Microbiome Project Consortium (2012): Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486: 207–214, doi: 10.1038/nature11234.
- Iverson, T.M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G., Rees, D.C. (1999):** Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex. *Science (New York, N.Y.)*, 284: 1961–1966, doi: 10.1126/science.284.5422.1961.
- Jantama, K., Zhang, X., Moore, J.C., Shanmugam, K.T., Svoronos, S.A., Ingram, L.O. (2008):** Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C. *Biotechnology and bioengineering*, 101: 881–893, doi: 10.1002/bit.22005.
- Jeffery, I.B., Claesson, M.J., O'Toole, P.W., Shanahan, F. (2012):** Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nature Reviews Microbiology*, 10: 591–592, doi: 10.1038/nrmicro2859.
- Jensen, B.B., Jørgensen, H. (1994):** Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 1897–1904.
- Johnson, E.L., Heaver, S.L., Walters, W.A., Ley, R.E. (2017):** Microbiome and metabolic disease: revisiting the bacterial phylum Bacteroidetes. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, 95: 1–8, doi: 10.1007/s00109-016-1492-2.
- Julsing, M.K., Kuhn, D., Schmid, A., Bühler, B. (2012):** Resting cells of recombinant *E. coli* show high epoxidation yields on energy source and high sensitivity to product inhibition. *Biotechnology and bioengineering*, 109: 1109–1119, doi: 10.1002/bit.24404.
- Kaczmarek, J.L., Thompson, S.V., Holscher, H.D. (2017):** Complex interactions of circadian rhythms, eating behaviors, and the gastrointestinal microbiota and their potential impact on health. *Nutrition reviews*, 75: 673–682, doi: 10.1093/nutrit/nux036.
- Kalantar-Zadeh, K., Berean, K.J., Burgell, R.E., Muir, J.G., Gibson, P.R. (2019):** Intestinal gases: influence on gut disorders and the role of dietary manipulations. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, doi: 10.1038/s41575-019-0193-z.
- Kalantar-Zadeh, K., Berean, K.J., Ha, N., Chrimes, A.F., Xu, K., Grando, D., Ou, J.Z., Pillai, N., et al. (2018):** A human pilot trial of ingestible electronic capsules capable of

- sensing different gases in the gut. *Nature Electronics*, 1: 79–87, doi: 10.1038/s41928-017-0004-x.
- Kang, D.-W., Park, J.G., Ilhan, Z.E., Wallstrom, G., Labaer, J., Adams, J.B., Krajmalnik-Brown, R. (2013):** Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PloS one*, 8: e68322, doi: 10.1371/journal.pone.0068322.
- Keltjens, J.T., van Erp, R., Mooijaart, R.J., van der Drift, C., Vogels, G.D. (1988):** Inorganic pyrophosphate synthesis during methanogenesis from methylcoenzyme M by cell-free extracts of *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain delta H). *European journal of biochemistry*, 172: 471–476, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13912.x.
- Knights, D., Ward, T.L., McKinlay, C.E., Miller, H., Gonzalez, A., McDonald, D., Knight, R. (2014):** Rethinking "enterotypes". *Cell host & microbe*, 16: 433–437, doi: 10.1016/j.chom.2014.09.013.
- Koh, A., Vadder, F. de, Kovatcheva-Datchary, P., Bäckhed, F. (2016):** From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell*, 165: 1332–1345, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.041.
- Kong, F., Singh, R.P. (2008):** Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science*, 73: R67-80, doi: 10.1111/j.1750-3841.2008.00766.X.
- Kovatcheva-Datchary, P., Nilsson, A., Akrami, R., Lee, Y.S., Vadder, F. de, Arora, T., Hallen, A., Martens, E., Björck, I., Bäckhed, F. (2015):** Dietary Fiber-Induced Improvement in Glucose Metabolism Is Associated with Increased Abundance of *Prevotella*. *Cell metabolism*, 22: 971–982, doi: 10.1016/j.cmet.2015.10.001.
- Kozyraki, R., Cases, O. (2013):** Vitamin B12 absorption: mammalian physiology and acquired and inherited disorders. *Biochimie*, 95: 1002–1007, doi: 10.1016/j.biochi.2012.11.004.
- Kröger, A., Biel, S., Simon, J., Gross, R., Uden, G., Lancaster, C.R.D. (2002):** Fumarate respiration of *Wolinella succinogenes*: enzymology, energetics and coupling mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1553: 23–38, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00234-1.
- Kröger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., Lenger, R. (1992):** Bacterial fumarate respiration. *Archives of microbiology*, 158: 311–314, doi: 10.1007/BF00245358.

- Kröniger, L., Berger, S., Welte, C., Deppenmeier, U. (2016):** Evidence for the involvement of two heterodisulfide reductases in the energy-conserving system of *Methanomassiliicoccus luminyensis*. *The FEBS journal*, 283: 472–483, doi: 10.1111/febs.13594.
- Kröniger, L., Steiniger, F., Berger, S., Kraus, S., Welte, C.U., Deppenmeier, U. (2019):** Energy conservation in the gut microbe *Methanomassiliicoccus luminyensis* is based on membrane-bound ferredoxin oxidation coupled to heterodisulfide reduction. *The FEBS journal*, doi: 10.1111/febs.14948.
- Krulwich, T.A., Hicks, D.B., Ito, M. (2009):** Cation/proton antiporter complements of bacteria: why so large and diverse? *Molecular microbiology*, 74: 257–260, doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06842.x.
- Kukko, E., Heinonen, J. (1982):** The intracellular concentration of pyrophosphate in the batch culture of *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry*, 127: 347–349, doi: 10.1111/j.1432-1033.1982.tb06878.x.
- Kurth, J.M., Brito, J.A., Reuter, J., Flegler, A., Koch, T., Franke, T., Klein, E.-M., Rowe, S.F., et al. (2016):** Electron Accepting Units of the Diheme Cytochrome c TsdA, a Bifunctional Thiosulfate Dehydrogenase/Tetrathionate Reductase. *The Journal of biological chemistry*, 291: 24804–24818, doi: 10.1074/jbc.M116.753863.
- Kurz, M., Brünig, A.N.S., Galinski, E.A. (2006):** NhaD type sodium/proton-antiporter of *Halomonas elongata*: a salt stress response mechanism in marine habitats? *Saline systems*, 2: 10, doi: 10.1186/1746-1448-2-10.
- Kurzrock, T., Weuster-Botz, D. (2010):** Recovery of succinic acid from fermentation broth. *Biotechnology letters*, 32: 331–339, doi: 10.1007/s10529-009-0163-6.
- Lancaster, C.R., Kröger, A., Auer, M., Michel, H. (1999):** Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution. *Nature*, 402: 377–385, doi: 10.1038/46483.
- Lawford, H.G., Rousseau, J.D. (1996):** Studies on nutrient requirements and cost-effective supplements for ethanol production by recombinant *E. coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 57-58: 307–326, doi: 10.1007/BF02941710.
- Lee, P.C., Lee, S.Y., Hong, S.H., Chang, H.N. (2002):** Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Applied microbiology and biotechnology*, 58: 663–668, doi: 10.1007/s00253-002-0935-6.



- Ley, R.E. (2016):** Gut microbiota in 2015: *Prevotella* in the gut: choose carefully. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 13: 69–70, doi: 10.1038/nrgastro.2016.4.
- Li, Q.-Z., Jiang, X.-L., Feng, X.-J., Wang, J.-M., Sun, C., Zhang, H.-B., Xian, M., Liu, H.-Z. (2016):** Recovery Processes of Organic Acids from Fermentation Broths in the Biomass-Based Industry. *Journal of microbiology and biotechnology*, 26: 1–8, doi: 10.4014/jmb.1505.05049.
- Lindner, J.G., Marcelis, J.H., Vos, N.M. de, Hoogkamp-Korstanje, J.A. (1979):** Intracellular polysaccharide of *Bacteroides fragilis*. *Journal of general microbiology*, 111: 93–99, doi: 10.1099/00221287-111-1-93.
- Lipson, D.A. (2015):** The complex relationship between microbial growth rate and yield and its implications for ecosystem processes. *Frontiers in microbiology*, 6: 615, doi: 10.3389/fmicb.2015.00615.
- Liu, Y.-P., Zheng, P., Sun, Z.-H., Ni, Y., Dong, J.-J., Zhu, L.-L. (2008):** Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresource technology*, 99: 1736–1742, doi: 10.1016/j.biortech.2007.03.044.
- Lloyd-Price, J., Abu-Ali, G., Huttenhower, C. (2016):** The healthy human microbiome. *Genome medicine*, 8: 51, doi: 10.1186/s13073-016-0307-y.
- Lou, J., Dawson, K.A., Strobel, H.J. (1997):** Glycogen Formation by the Ruminant Bacterium *Prevotella ruminicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 1483–1488.
- Louis, P., Scott, K.P., Duncan, S.H., Flint, H.J. (2007):** Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine. *Journal of applied microbiology*, 102: 1197–1208, doi: 10.1111/j.1365-2672.2007.03322.x.
- 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: 220–230, doi: 10.1038/nature11550.
- Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. (2003):** Regulation of short-chain fatty acid production. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 62: 67–72, doi: 10.1079/PNS2002207.
- Macy, J., Probst, I., Gottschalk, G. (1975):** Evidence for cytochrome involvement in fumarate reduction and adenosine 5'-triphosphate synthesis by *Bacteroides fragilis* grown in the presence of hemin. *Journal of Bacteriology*, 123: 436–442.

- Macy, J.M., Ljungdahl, L.G., Gottschalk, G. (1978):** Pathway of Succinate and Propionate Formation in *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology*, 134: 84–91.
- Macy, J.M., Probst, I. (1979):** The biology of gastrointestinal *Bacteroides*. *Annual review of microbiology*, 33: 561–594, doi: 10.1146/annurev.mi.33.100179.003021.
- Mancini, E., Mansouri, S.S., Gernaey, K.V., Luo, J., Pinelo, M. (2019):** From second generation feed-stocks to innovative fermentation and downstream techniques for succinic acid production. *Critical reviews in environmental science and technology*, 134: 1–45, doi: 10.1080/10643389.2019.1670530.
- Martens, E.C., Kelly, A.G., Tauzin, A.S., Brumer, H. (2014):** The devil lies in the details: how variations in polysaccharide fine-structure impact the physiology and evolution of gut microbes. *Journal of Molecular Biology*, 426: 3851–3865, doi: 10.1016/j.jmb.2014.06.022.
- Marthinsen, D., Fleming, S.E. (1982):** Excretion of breath and flatus gases by humans consuming high-fiber diets. *The Journal of nutrition*, 112: 1133–1143, doi: 10.1093/jn/112.6.1133.
- Martin, S.A. (1994):** Nutrient transport by ruminal bacteria: a review. *Journal of animal science*, 72: 3019–3031, doi: 10.2527/1994.72113019x.
- McKinlay, J.B., Vieille, C., Zeikus, J.G. (2007):** Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 76: 727–740, doi: 10.1007/s00253-007-1057-y.
- McNeil, N.I. (1984):** The contribution of the large intestine to energy supplies in man. *The American journal of clinical nutrition*, 39: 338–342, doi: 10.1093/ajcn/39.2.338.
- Meehan, B.M., Malamy, M.H. (2012):** Fumarate reductase is a major contributor to the generation of reactive oxygen species in the anaerobe *Bacteroides fragilis*. *Microbiology (Reading, England)*, 158: 539–546, doi: 10.1099/mic.0.054403-0.
- Mertens, E. (1991):** Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS letters*, 285: 1–5, doi: 10.1016/0014-5793(91)80711-B.
- Mijakovic, I., Poncet, S., Galinier, A., Monedero, V., Fieulaine, S., Janin, J., Nessler, S., Marquez, J.A., et al. (2002):** Pyrophosphate-producing protein dephosphorylation by HPr kinase/phosphorylase: a relic of early life? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 13442–13447, doi: 10.1073/pnas.212410399.
- Miller, R.A., Britigan, B.E. (1997):** Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clinical Microbiology Reviews*, 10: 1–18.

- Molenaar, D., van Berlo, R., Ridder, D. de, Teusink, B. (2009):** Shifts in growth strategies reflect tradeoffs in cellular economics. *Molecular systems biology*, 5: 323, doi: 10.1038/msb.2009.82.
- Moparthi, V.K., Hägerhäll, C. (2011):** The evolution of respiratory chain complex I from a smaller last common ancestor consisting of 11 protein subunits. *Journal of molecular evolution*, 72: 484–497, doi: 10.1007/s00239-011-9447-2.
- Mordukhova, E.A., Pan, J.-G. (2013):** Evolved cobalamin-independent methionine synthase (MetE) improves the acetate and thermal tolerance of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79: 7905–7915, doi: 10.1128/AEM.01952-13.
- Morrison, D.J., Preston, T. (2016):** Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut microbes*, 7: 189–200, doi: 10.1080/19490976.2015.1134082.
- Mulkijanian, A.Y., Dibrov, P., Galperin, M.Y. (2008):** The past and present of sodium energetics: may the sodium-motive force be with you. *Biochimica et biophysica acta*, 1777: 985–992, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.04.028.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986):** Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 51 Pt 1: 263–273, doi: 10.1101/sqb.1986.051.01.032.
- Narikawa, S., Suzuki, T., Yamamoto, M., Nakamura, M. (1991):** Lactate dehydrogenase activity as a cause of metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis* NCTC 11295. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 28: 47–53, doi: 10.1093/jac/28.1.47.
- Nghiem, N., Kleff, S., Schwegmann, S. (2017):** Succinic Acid: Technology Development and Commercialization. *Fermentation*, 3: 26, doi: 10.3390/fermentation3020026.
- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. (2013):** Ion Transport Across Energy-Conserving Membranes. In *Bioenergetics*. Elsevier: pp. 13–25.
- Nielsen, M.J., Rasmussen, M.R., Andersen, C.B.F., Nexø, E., Moestrup, S.K. (2012):** Vitamin B12 transport from food to the body's cells - a sophisticated, multistep pathway. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9: 345–354, doi: 10.1038/nrgastro.2012.76.
- Obeid, R., Heil, S.G., Verhoeven, M.M.A., van den Heuvel, E.G.H.M., Groot, L.C.P.G.M. de, Eussen, S.J.P.M. (2019):** Vitamin B12 Intake From Animal Foods, Biomarkers, and Health Aspects. *Frontiers in nutrition*, 6: 93, doi: 10.3389/fnut.2019.00093.

- O'Hara, A.M., Shanahan, F. (2006): The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports*, 7: 688–693, doi: 10.1038/sj.embor.7400731.
- Okafor, N. (2016) *Modern Industrial Microbiology and Biotechnology*, CRC Press.
- Pan, N., Imlay, J.A. (2001): How does oxygen inhibit central metabolism in the obligate anaerobe *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Molecular microbiology*, 39: 1562–1571, doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02343.x.
- Papenfort, K., Vanderpool, C.K. (2015): Target activation by regulatory RNAs in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 39: 362–378, doi: 10.1093/femsre/fuv016.
- Parkar, S.G., Kalsbeek, A., Cheeseman, J.F. (2019): Potential Role for the Gut Microbiota in Modulating Host Circadian Rhythms and Metabolic Health. *Microorganisms*, 7, doi: 10.3390/microorganisms7020041.
- Patel, S.A., Erickson, L.E. (1981): Estimation of heats of combustion of biomass from elemental analysis using available electron concepts. *Biotechnology and Bioengineering*, 23: 2051–2067, doi: 10.1002/bit.260230910.
- Pertea, M., Shumate, A., Pertea, G., Varabyou, A., Breitwieser, F.P., Chang, Y.-C., Madugundu, A.K., Pandey, A., Salzberg, S.L. (2018): CHES: a new human gene catalog curated from thousands of large-scale RNA sequencing experiments reveals extensive transcriptional noise. *Genome biology*, 19: 208, doi: 10.1186/s13059-018-1590-2.
- Pianta, A., Arvikar, S., Strle, K., Drouin, E.E., Wang, Q., Costello, C.E., Steere, A.C. (2017): Evidence of the Immune Relevance of *Prevotella copri*, a Gut Microbe, in Patients With Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 69: 964–975, doi: 10.1002/art.40003.
- Pinazo, J.M., Domine, M.E., Parvulescu, V., Petru, F. (2015): Sustainability metrics for succinic acid production: A comparison between biomass-based and petrochemical routes. *Catalysis Today*, 239: 17–24, doi: 10.1016/j.cattod.2014.05.035.
- Pinhal, S., Ropers, D., Geiselmann, J., Jong, H. de (2019): Acetate Metabolism and the Inhibition of Bacterial Growth by Acetate. *Journal of Bacteriology*, 201, doi: 10.1128/JB.00147-19.
- Pocviciute, R., Ismagilov, R.F. (2019): Human-gut-microbiome on a chip. *Nature biomedical engineering*, 3: 500–501, doi: 10.1038/s41551-019-0425-0.

- Podkovyrov, S.M., Zeikus, J.G. (1993):** Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase, a catabolic CO<sub>2</sub>-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Journal of general microbiology*, 139: 223–228, doi: 10.1099/00221287-139-2-223.
- Poehlein, A., Schmidt, S., Kaster, A.-K., Goenrich, M., Vollmers, J., Thürmer, A., Bertsch, J., Schuchmann, K., et al. (2012):** An ancient pathway combining carbon dioxide fixation with the generation and utilization of a sodium ion gradient for ATP synthesis. *PLoS one*, 7: e33439, doi: 10.1371/journal.pone.0033439.
- 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: e01950, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01950.
- Quigley, E.M.M. (2013):** Gut Bacteria in Health and Disease. *Gastroenterology & Hepatology*, 9: 560–569.
- Raab, A.M., Gebhardt, G., Bolotina, N., Weuster-Botz, D., Lang, C. (2010):** Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid. *Metabolic engineering*, 12: 518–525, doi: 10.1016/j.ymben.2010.08.005.
- Rahlfs, S., Müller, V. (1997):** Sequence of subunit c of the Na<sup>+</sup>-translocating F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase of *Acetobacterium woodii*: proposal for determinants of Na<sup>+</sup> specificity as revealed by sequence comparisons. *FEBS letters*, 404: 269–271, doi: 10.1016/S0014-5793(97)00088-4.
- Rakoff-Nahoum, S., Coyne, M.J., Comstock, L.E. (2014):** An ecological network of polysaccharide utilization among human intestinal symbionts. *Current biology : CB*, 24: 40–49, doi: 10.1016/j.cub.2013.10.077.
- Reichardt, N., Duncan, S.H., Young, P., Belenguer, A., McWilliam Leitch, C., Scott, K.P., Flint, H.J., Louis, P. (2014):** Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *The ISME journal*, 8: 1323–1335, doi: 10.1038/ismej.2014.14.
- Reichardt, N., Vollmer, M., Holtrop, G., Farquharson, F.M., Wefers, D., Bunzel, M., Duncan, S.H., Drew, J.E., et al. (2018):** Specific substrate-driven changes in human faecal microbiota composition contrast with functional redundancy in short-chain fatty acid production. *The ISME journal*, 12: 610–622, doi: 10.1038/ismej.2017.196.

- Reyes-Prieto, A., Barquera, B., Juárez, O. (2014):** Origin and evolution of the sodium-pumping NADH: ubiquinone oxidoreductase. *PloS one*, 9: e96696, doi: 10.1371/journal.pone.0096696.
- Ricke, S.C. (2003):** Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poultry science*, 82: 632–639, doi: 10.1093/ps/82.4.632.
- Ríos-Covián, D., Ruas-Madiedo, P., Margolles, A., Gueimonde, M., Los Reyes-Gavilán, C.G. de, Salazar, N. (2016):** Intestinal Short Chain Fatty Acids and their Link with Diet and Human Health. *Frontiers in microbiology*, 7: 185, doi: 10.3389/fmicb.2016.00185.
- Roe, A.J., O'Byrne, C., McLaggan, D., Booth, I.R. (2002):** Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology (Reading, England)*, 148: 2215–2222, doi: 10.1099/00221287-148-7-2215.
- Rose, C., Parker, A., Jefferson, B., Cartmell, E. (2015):** The Characterization of Feces and Urine: A Review of the Literature to Inform Advanced Treatment Technology. *Critical reviews in environmental science and technology*, 45: 1827–1879, doi: 10.1080/10643389.2014.1000761.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., Tuohy, K. (2018):** Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57: 1–24, doi: 10.1007/s00394-017-1445-8.
- Rowley, C.A., Kendall, M.M. (2019):** To B12 or not to B12: Five questions on the role of cobalamin in host-microbial interactions. *PLoS pathogens*, 15: e1007479, doi: 10.1371/journal.ppat.1007479.
- Russell, J.B. (2007):** The energy spilling reactions of bacteria and other organisms. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 13: 1–11, doi: 10.1159/000103591.
- Russell, J.B., Diez-Gonzalez, F. (1997):** The Effects of Fermentation Acids on Bacterial Growth. Elsevier: pp. 205–234.
- Russell, J.B., Houlihan, A.J. (2003):** Ionophore resistance of ruminal bacteria and its potential impact on human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 27: 65–74, doi: 10.1016/S0168-6445(03)00019-6.
- Sakamoto, M., Kitahara, M., Benno, Y. (2007):** *Parabacteroides johnsonii* sp. nov., isolated from human faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57: 293–296, doi: 10.1099/ijs.0.64588-0.

- Salyers, A.A. (1984):** Bacteroides of the human lower intestinal tract. *Annual review of microbiology*, 38: 293–313, doi: 10.1146/annurev.mi.38.100184.001453.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. (1989)** *Molecular cloning. A laboratory manual : Vol. 2*, Cold Spring Harbor. S.I.
- Samuelov, N.S., Lamed, R., Lowe, S., Zeikus, J.G. (1991):** Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> Levels and pH on Growth, Succinate Production, and Enzyme Activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 3013–3019.
- Sandle, G.I. (1998):** Salt and water absorption in the human colon: a modern appraisal. *Gut*, 43: 294–299, doi: 10.1136/gut.43.2.294.
- Sauer, U., Eikmanns, B.J. (2005):** The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 29: 765–794, doi: 10.1016/j.femsre.2004.11.002.
- Schauber, J., Svanholm, C., Termén, S., Iffland, K., Menzel, T., Scheppach, W., Melcher, R., Agerberth, B., Lührs, H., Gudmundsson, G.H. (2003):** Expression of the cathelicidin LL-37 is modulated by short chain fatty acids in colonocytes: relevance of signalling pathways. *Gut*, 52: 735–741.
- Scher, J.U., Sczesnak, A., Longman, R.S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., Rostron, T., Cerundolo, V., et al. (2013):** Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2: e01202, doi: 10.7554/eLife.01202.
- Schlegel, K., Welte, C., Deppenmeier, U., Müller, V. (2012):** Electron transport during acetoclastic methanogenesis by *Methanosarcina acetivorans* involves a sodium-translocating Rnf complex. *The FEBS journal*, 279: 4444–4452, doi: 10.1111/febs.12031.
- Scholten, E., Dägele, D. (2008):** Succinic acid production by a newly isolated bacterium. *Biotechnology letters*, 30: 2143–2146, doi: 10.1007/s10529-008-9806-2.
- Schuchmann, K., Müller, V. (2014):** Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 12: 809–821, doi: 10.1038/nrmicro3365.
- Schuller, J.M., Birrell, J.A., Tanaka, H., Konuma, T., Wulfhorst, H., Cox, N., Schuller, S.K., Thiemann, J., et al. (2019):** Structural adaptations of photosynthetic complex I enable ferredoxin-dependent electron transfer. *Science (New York, N.Y.)*, 363: 257–260, doi: 10.1126/science.aau3613.

- Schurmann, M., Sprenger, G.A. (2001):** Fructose-6-phosphate aldolase is a novel class I aldolase from *Escherichia coli* and is related to a novel group of bacterial transaldolases. *The Journal of biological chemistry*, 276: 11055–11061, doi: 10.1074/jbc.M008061200.
- Scott, K.P., Gratz, S.W., Sheridan, P.O., Flint, H.J., Duncan, S.H. (2013):** The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research*, 69: 52–60, doi: 10.1016/j.phrs.2012.10.020.
- Sender, R., Fuchs, S., Milo, R. (2016):** Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS biology*, 14: e1002533, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Shearer, M.J., Fu, X., Booth, S.L. (2012):** Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Advances in nutrition (Bethesda, Md.)*, 3: 182–195, doi: 10.3945/an.111.001800.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T.J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., et al. (2011):** Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular systems biology*, 7: 539, doi: 10.1038/msb.2011.75.
- Skulachev, V.P. (1998):** Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1363: 100–124, doi: 10.1016/S0005-2728(97)00091-1.
- Slauch, J.M. (2011):** How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Molecular microbiology*, 80: 580–583, doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x.
- Sommer, F., Bäckhed, F. (2013):** The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nature reviews. Microbiology*, 11: 227–238, doi: 10.1038/nrmicro2974.
- Sonnenburg, E.D., Zheng, H., Joglekar, P., Higginbottom, S.K., Firbank, S.J., Bolam, D.N., Sonnenburg, J.L. (2010):** Specificity of polysaccharide use in intestinal *Bacteroides* species determines diet-induced microbiota alterations. *Cell*, 141: 1241–1252, doi: 10.1016/j.cell.2010.05.005.
- Sperry, J.F., Appleman, M.D., Wilkins, T.D. (1977):** Requirement of heme for growth of *Bacteroides fragilis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 34: 386–390.
- Stahlberg, H., Müller, D.J., Suda, K., Fotiadis, D., Engel, A., Meier, T., Matthey, U., Dimroth, P. (2001):** Bacterial Na<sup>+</sup>-ATP synthase has an undecameric rotor. *EMBO reports*, 2: 229–233, doi: 10.1093/embo-reports/kve047.



- Steigmiller, S., Turina, P., Gräber, P. (2008):** The thermodynamic H<sup>+</sup>/ATP ratios of the H<sup>+</sup>-ATPsynthases from chloroplasts and *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 3745–3750, doi: 10.1073/pnas.0708356105.
- Steuber, J. (2001):** Na<sup>+</sup> translocation by bacterial NADH:quinone oxidoreductases: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. Dedicated to Peter Dimroth on the occasion of his 60th birthday. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1505: 45–56, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00276-0.
- Steuber, J., Schmid, C., Rufibach, M., Dimroth, P. (2000):** Na<sup>+</sup> translocation by complex I (NADH:quinone oxidoreductase) of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 35: 428–434, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01712.x.
- Steuber, J., Vohl, G., Muras, V., Toulouse, C., Claußen, B., Vorbürger, T., Fritz, G. (2015):** The structure of Na<sup>+</sup>-translocating of NADH:ubiquinone oxidoreductase of *Vibrio cholerae*: implications on coupling between electron transfer and Na<sup>+</sup> transport. *Biological chemistry*, 396: 1015–1030, doi: 10.1515/hsz-2015-0128.
- Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M.M.C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N.-M., et al. (2015):** The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90: 927–963, doi: 10.1111/brv.12140.
- Stockar, U. von, Liu, J.-S. (1999):** Does microbial life always feed on negative entropy? Thermodynamic analysis of microbial growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1412: 191–211, doi: 10.1016/S0005-2728(99)00065-1.
- Stockar, U. von, Maskow, T., Liu, J., Marison, I.W., Patiño, R. (2006):** Thermodynamics of microbial growth and metabolism: an analysis of the current situation. *Journal of biotechnology*, 121: 517–533, doi: 10.1016/j.jbiotec.2005.08.012.
- Strobel, H.J. (1993):** Pentose utilization and transport by the ruminal bacterium *Prevotella ruminicola*. *Archives of microbiology*, 159: 465–471, doi: 10.1007/bf00288595.
- Sudom, A., Walters, R., Pastushok, L., Goldie, D., Prasad, L., Delbaere, L.T.J., Goldie, H. (2003):** Mechanisms of activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Escherichia coli* by Ca<sup>2+</sup> and of desensitization by trypsin. *Journal of Bacteriology*, 185: 4233–4242, doi: 10.1128/jb.185.14.4233-4242.2003.

- Susskind, B.M., Warren, L.G., Reeves, R.E. (1982):** A pathway for the interconversion of hexose and pentose in the parasitic amoeba *Entamoeba histolytica*. *The Biochemical journal*, 204: 191–196, doi: 10.1042/bj2040191.
- Szafrański, S.P., Deng, Z.-L., Tomasch, J., Jarek, M., Bhujju, S., Meisinger, C., Kühnisch, J., Sztajer, H., Wagner-Döbler, I. (2015):** Functional biomarkers for chronic periodontitis and insights into the roles of *Prevotella nigrescens* and *Fusobacterium nucleatum*; a metatranscriptome analysis. *NPJ biofilms and microbiomes*, 1: 15017, doi: 10.1038/npjbiofilms.2015.17.
- Tailford, L.E., Crost, E.H., Kavanaugh, D., Juge, N. (2015):** Mucin glycan foraging in the human gut microbiome. *Frontiers in genetics*, 6: 81, doi: 10.3389/fgene.2015.00081.
- Takahashi, N., Yamada, T. (2000):** Glucose metabolism by *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral microbiology and immunology*, 15: 188–195.
- Thakker, C., Martínez, I., San, K.-Y., Bennett, G.N. (2012):** Succinate production in *Escherichia coli*. *Biotechnology journal*, 7: 213–224, doi: 10.1002/biot.201100061.
- Thauer, R.K., Jungermann, K., Decker, K. (1977):** Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41: 100–180.
- Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2012):** Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489: 242–249, doi: 10.1038/nature11552.
- Tsai, C.-H., Liao, R., Chou, B., Palumbo, M., Contreras, L.M. (2015):** Genome-wide analyses in bacteria show small-RNA enrichment for long and conserved intergenic regions. *Journal of Bacteriology*, 197: 40–50, doi: 10.1128/JB.02359-14.
- Unemoto, T., Tokuda, H., Hayashi, M. (1990):** Chapter 2 - Primary Sodium Pumps and Their Significance in Bacterial Energetics. In *Bacterial Energetics*. Krulwich, T.A. (Ed). Academic Press: pp. 33–54.
- Vadder, F. de, Kovatcheva-Datchary, P., Zitoun, C., Duchamp, A., Bäckhed, F., Mithieux, G. (2016):** Microbiota-Produced Succinate Improves Glucose Homeostasis via Intestinal Gluconeogenesis. *Cell metabolism*, 24: 151–157, doi: 10.1016/j.cmet.2016.06.013.
- Vadder, F. de, Mithieux, G. (2018):** Gut-brain signaling in energy homeostasis: the unexpected role of microbiota-derived succinate. *The Journal of endocrinology*, 236: R105–R108, doi: 10.1530/JOE-17-0542.

- van Handel, E. (1965):** Estimation of glycogen in small amounts of tissue. *Analytical Biochemistry*, 11: 256–265, doi: 10.1016/0003-2697(65)90013-8.
- van Heerden, C.D., Nicol, W. (2013):** Continuous and batch cultures of *Escherichia coli* KJ134 for succinic acid fermentation: metabolic flux distributions and production characteristics. *Microbial cell factories*, 12: 80, doi: 10.1186/1475-2859-12-80.
- Vanderhaeghen, S., Lacroix, C., Schwab, C. (2015):** Methanogen communities in stools of humans of different age and health status and co-occurrence with bacteria. *FEMS microbiology letters*, 362: fnv092, doi: 10.1093/femsle/fnv092.
- Varel, V.H., Bryant, M.P. (1974):** Nutritional Features of *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Applied Microbiology*, 28: 251–257.
- Voigt, R.M., Forsyth, C.B., Green, S.J., Engen, P.A., Keshavarzian, A. (2016):** Circadian Rhythm and the Gut Microbiome. *International review of neurobiology*, 131: 193–205, doi: 10.1016/bs.irn.2016.07.002.
- Walsh, C.J., Guinane, C.M., O'Toole, P.W., Cotter, P.D. (2014):** Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS letters*, 588: 4120–4130, doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.035.
- Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E. (2010):** Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107: 16823–16827, doi: 10.1073/pnas.1011099107.
- Weerakoon, D.R., Olson, J.W. (2008):** The *Campylobacter jejuni* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) utilizes flavodoxin rather than NADH. *Journal of Bacteriology*, 190: 915–925, doi: 10.1128/JB.01647-07.
- Wegner, G.H., Foster, E.M. (1963):** Incorporation of Isobutyrate and Valerate into cellular plasmalogen by *Bacteroides succinogenes*. *Journal of Bacteriology*, 85: 53–61.
- Welte, C., Deppenmeier, U. (2011a):** Membrane-bound electron transport in *Methanosaeta thermophila*. *Journal of Bacteriology*, 193: 2868–2870, doi: 10.1128/JB.00162-11.
- Welte, C., Deppenmeier, U. (2011b):** Re-evaluation of the function of the F420 dehydrogenase in electron transport of *Methanosarcina mazei*. *The FEBS journal*, 278: 1277–1287, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08048.x.
- Westphal, L., Wiechmann, A., Baker, J., Minton, N.P., Müller, V. (2018):** The Rnf Complex Is an Energy-Coupled Transhydrogenase Essential To Reversibly Link Cellular NADH and

- Ferredoxin Pools in the Acetogen *Acetobacterium woodii*. *Journal of Bacteriology*, 200, doi: 10.1128/JB.00357-18.
- Wetzstein, H.G., Gottschalk, G. (1985):** A sodium-stimulated membrane-bound fumarate reductase system in *Bacteroides amylophilus*. *Archives of microbiology*, 143: 157–162.
- Wexler, A.G., Schofield, W.B., Degnan, P.H., Folta-Stogniew, E., Barry, N.A., Goodman, A.L. (2018):** Human gut *Bacteroides* capture vitamin B12 via cell surface-exposed lipoproteins. *eLife*, 7, doi: 10.7554/eLife.37138.
- Wexler, H.M. (2007):** *Bacteroides*: the good, the bad, and the nitty-gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 20: 593–621, doi: 10.1128/CMR.00008-07.
- Wilson, W.A., Roach, P.J., Montero, M., Baroja-Fernández, E., Muñoz, F.J., Eydallin, G., Viale, A.M., Pozueta-Romero, J. (2010):** Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 34: 952–985, doi: 10.1111/j.1574-6976.2010.00220.x.
- Wolf, P.G., Biswas, A., Morales, S.E., Greening, C., Gaskins, H.R. (2016):** H<sub>2</sub> metabolism is widespread and diverse among human colonic microbes. *Gut microbes*, 7: 235–245, doi: 10.1080/19490976.2016.1182288.
- Wolfe, A.J. (2010):** Physiologically relevant small phosphodonors link metabolism to signal transduction. *Current opinion in microbiology*, 13: 204–209, doi: 10.1016/j.mib.2010.01.002.
- Wolin, E.A., Wolin, M.J., Wolfe, R.S. (1963):** Formation of methane by bacterial extracts. *The Journal of biological chemistry*, 238: 2882–2886.
- Woting, A., Blaut, M. (2016):** The Intestinal Microbiota in Metabolic Disease. *Nutrients*, 8: 202, doi: 10.3390/nu8040202.
- Wu, H., Tremaroli, V., Bäckhed, F. (2015):** Linking Microbiota to Human Diseases: A Systems Biology Perspective. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 26: 758–770, doi: 10.1016/j.tem.2015.09.011.
- Yatsunencko, T., Rey, F.E., Manary, M.J., Trehan, I., Dominguez-Bello, M.G., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., et al. (2012):** Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486: 222–227, doi: 10.1038/nature11053.
- Yilmaz, B., Li, H. (2018):** Gut Microbiota and Iron: The Crucial Actors in Health and Disease. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 11, doi: 10.3390/ph11040098.
- Yu, J.-H., Zhu, L.-W., Xia, S.-T., Li, H.-M., Tang, Y.-L., Liang, X.-H., Chen, T., Tang, Y.-J. (2016):** Combinatorial optimization of CO<sub>2</sub> transport and fixation to improve succinate

production by promoter engineering. *Biotechnology and bioengineering*, 113: 1531–1541, doi: 10.1002/bit.25927.

**Zeikus, J.G., Jain, M.K., Elankovan, P. (1999):** Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Applied microbiology and biotechnology*, 51: 545–552, doi: 10.1007/s002530051431.

**Zeuschner, C.L., Hokin, B.D., Marsh, K.A., Saunders, A.V., Reid, M.A., Ramsay, M.R. (2013):** Vitamin B<sub>12</sub> and vegetarian diets. *The Medical journal of Australia*, 199: S27–32.

**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: 138, doi: 10.1186/s13068-015-0304-1.

**Zmora, N., Suez, J., Elinav, E. (2019):** You are what you eat: diet, health and the gut microbiota. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 16: 35–56, doi: 10.1038/s41575-018-0061-2.

# Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die die Erstellung dieser Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle gilt mein Dank selbstverständlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Uwe Deppenmeier für die Vergabe des außerordentlich spannenden sowie herausfordernden Themas meiner Doktorarbeit. Mit Diskussionsfreude und zahlreichen Ratschlägen haben Sie mich in die richtigen Bahnen gelenkt, wenn ich drohte ungünstig abzubiegen. Außerdem möchte ich mich für Ihre Geduld und Ihr Verständnis bedanken, in Zeiten, die nicht immer einfach waren.

Des Weiteren möchte ich mich bei PD. Dr. Christiane Dahl bedanken. Nicht nur für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit, sondern auch für das Entfachen meiner wissenschaftlichen Neugier für die kleinsten (aber offensichtlich wichtigsten) Organismen der Erde. Wegen Ihnen bin ich Mikrobiologe geworden!

Ein weiteres Dankeschön geht natürlich auch an Prof. Dr. Lukas Schreiber und Prof. Dr. Sigurd Höger, die sich bereit erklärt haben, als fachnahes und fachfremdes Mitglied meiner Prüfungskommission beizuwohnen.

Meinen außerordentlichen Dank gilt außerdem meinen Mitstreitern und Leidensgenossen der Arbeitsgruppe Deppenmeier und des gesamten IfMB. Es war mir eine Freude mit euch zusammenzuarbeiten! Bedanken möchte ich mich besonders bei Anna, Sarah, Laura, Jacqueline, Juliane und Fabian. Und explizit bei Lena – Du warst der beste *Bench Buddy*! Konrad und Marcel, euch gilt mein besonderer Dank, weil ihr mir auch abseits des Labors zu wahren Freunden geworden seid. Mögen die *BrewDudes* noch manch' Abenteuer bestreiten.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei den vielen Studierenden, die ich im Laufe meiner Doktorarbeit betreuen durfte. Hervorheben möchte ich Laura und Aline, die sich als erste unter meine Ägide begeben haben. Ihr beiden habt es mir leicht gemacht.

Elisabeth Schwab möchte ich herzlich danken für ihre stete Hilfe im Labor und für die Ruhe, die sie grundsätzlich auch in stressigen Momenten des Laboralltags ausstrahlte.

Bei meinen Jungs von *WildRider* möchte ich mich für den hardrockigen Ausgleich vom Wissenschaftler-Dasein bedanken, für die Treue und den Spaß der letzten Jahre und für die nach wie vor wilde Zeit.

Zum Schluss möchte ich mich noch bei den wohl wichtigsten Menschen bedanken, die sich in meinem Leben befinden. Meiner Familie, Stella und meiner Schwiegerfamilie in Spe für die

## **Danksagung**

Liebe und Unterstützung, die man in einer so intensiven Zeit definitiv benötigt. Ich werde Gleiches mit Gleichem vergelten. Versprochen.

# Publikationsliste

## Veröffentlichungen

**Franke, T., Deppenmeier, U. (2018):** Physiology and central carbon metabolism of the gut bacterium *Prevotella copri*. *Molecular microbiology*, 109: 528–540, doi: 10.1111/mmi.14058.

**Kurth, J.M., Brito, J.A., Reuter, J., Flegler, A., Koch, T., Franke, T., Klein, E.-M., Rowe, S.F., *et al.* (2016):** Electron Accepting Units of the Diheme Cytochrome c TsdA, a Bifunctional Thiosulfate Dehydrogenase/Tetrathionate Reductase. *The Journal of biological chemistry*, 291: 24804–24818, doi: 10.1074/jbc.M116.753863.

## Konferenzbeiträge

**Franke, T., Deppenmeier, U. (2018):** Small differences may turn the scale: How carbonate effects the growth of *Prevotella copri* in contrast to *Bacteroides* spp.. *ePoster presentation, VAAM 2018, Wolfsburg.*

**Franke, T., Augsburg, A., Garschagen, L., Deppenmeier, U. (2017):** Insights into the central energy metabolism of the important human gut microbe *Prevotella copri*. *Poster contribution, VAAM 2017, Würzburg.*