

DEUTSCHES INSTITUT FÜR ERNÄHRUNGSFORSCHUNG POTSDAM-REHBRÜCKE  
ABTEILUNG GASTROINTESTINALE MIKROBIOLOGIE

---

**Identifizierung und Charakterisierung der  
Isoflavon-umsetzenden Enzyme  
aus dem humanen Darmbakterium  
*Slackia isoflavoniconvertens***

---

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
„doctor rerum naturalium“  
(Dr. rer. nat.)

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität Potsdam

von  
Diplom-Biochemikerin

**CHRISTINE SCHRÖDER**

geboren am 15.08.1984 in Magdeburg

Potsdam, im Februar 2015

Ein Teil dieser Arbeit wurde in *Applied and Environmental Microbiology* veröffentlicht:

Schröder, C.; Matthies, A.; Engst, W.; Blaut, M.; Braune, A.

„Identification and expression of genes involved in the conversion of daidzein and genistein by the equol-forming bacterium *Slackia isoflavoniconvertens*.“

*Appl. Environ. Microbiol.* June 2013 79(11):3494-502;

published ahead of print 29 March 2013, doi: 10.1128/AEM.03693-12

Online veröffentlicht auf dem

Publikationsserver der Universität Potsdam:

URN urn:nbn:de:kobv:517-opus4-80065

<http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-80065>

# Zusammenfassung

Aufgrund ihrer potenziell gesundheitsfördernden Wirkung sind die polyphenolischen Isoflavone für die menschliche Ernährung von großem Interesse. Eine Vielzahl an experimentellen und epidemiologischen Studien zeigen für die in Soja enthaltenen Isoflavone Daidzein und Genistein eine präventive Wirkung bezüglich hormon-abhängiger und altersbedingter Erkrankungen, wie Brust- und Prostatakrebs, Osteoporose, Herz-Kreislauf-Erkrankungen sowie des menopausalen Syndroms. Die Metabolisierung und Bioaktivierung dieser sekundären Pflanzenstoffe durch die humane intestinale Darmmikrobiota ist individuell unterschiedlich. Nur in einem geringen Teil der westlichen Bevölkerung wird der Daidzein-Metabolit Equol durch spezifische Darmbakterien gebildet. Ein isoliertes Equol-produzierendes Bakterium des menschlichen Darmtrakts ist *Slackia isoflavoniconvertens*. Anhand dieser Spezies sollten die bislang unbekannt, an der Umsetzung von Daidzein und Genistein beteiligten Enzyme identifiziert und charakterisiert werden.

Fermentationsexperimente mit *S. isoflavoniconvertens* zeigten, dass die Gene der Daidzein und Genistein-umsetzenden Enzyme nicht konstitutiv exprimiert werden, sondern induziert werden müssen. Mit Hilfe der zweidimensionalen differentiellen Gelelektrophorese wurden sechs Proteine detektiert, welche in einer *S. isoflavoniconvertens*-Kultur in Anwesenheit von Daidzein induziert wurden. Auf Grundlage einzelner Peptidsequenzen erfolgte die Sequenzierung eines Genkomplexes mit den in gleicher Orientierung angeordneten Genen der durch Daidzein induzierten Proteine. Sequenzvergleiche identifizierten zudem äquivalente Genprodukte zu den Proteinen von *S. isoflavoniconvertens* in anderen Equol-produzierenden Bakterien. Nach der heterologen Expression in *Escherichia coli* wurden drei dieser Gene durch enzymatische Aktivitätstests als Daidzein-Reduktase (DZNR), Dihydrodaidzein-Reduktase (DHDR) und Tetrahydrodaidzein-Reduktase (THDR) identifiziert. Die Kombination der *E. coli*-Zellextrakte führte zur vollständigen Umsetzung von Daidzein über Dihydrodaidzein zu Equol. Neben Daidzein setzte die DZNR auch Genistein zu Dihydrogenistein um. Dies erfolgte mit einer größeren Umsatzgeschwindigkeit im Vergleich zur Reduktion von Daidzein zu Dihydrodaidzein. Enzymatische Aktivitätstests mit dem Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* zeigten ebenfalls eine schnellere Umsetzung von Genistein. Die Kombination der rekombinanten DHDR und THDR führte zur Umsetzung von Dihydrodaidzein zu Equol. Der korrespondierende Metabolit 5-Hydroxyequol

konnte als Endprodukt des Genistein-Metabolismus nicht detektiert werden. Zur Reinigung der drei identifizierten Reduktasen wurden diese genetisch an ein *Strep-tag* fusioniert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die übrigen durch Daidzein induzierten Proteine IfcA, IfcBC und IfcE wurden ebenfalls in *E. coli* exprimiert und als *Strep*-Fusionsproteine gereinigt. Vergleichende Aktivitätstests identifizierten das induzierte Protein IfcA als Dihydrodaidzein-Racemase. Diese katalysierte die Umsetzung des (*R*)- und (*S*)-Enantiomers von Dihydrodaidzein und Dihydrogenistein zum korrespondierenden Racemat. Neben dem Elektronentransfer-Flavoprotein IfcBC wurden auch die THDR, DZNR und IfcE als FAD-haltige Flavoproteine identifiziert. Zudem handelte es sich bei IfcE um ein Eisen-Schwefel-Protein. Nach Induktion der für die Daidzein-Umsetzung kodierenden Gene wurden mehrere verschieden lange mRNA-Transkripte gebildet. Dies zeigte, dass die Transkription des durch Daidzein induzierten Genkomplexes in *S. isoflavoniconvertens* nicht in Form eines einzelnen Operonsystems erfolgte.

Auf Grundlage der identifizierten Daidzein-umsetzenden Enzyme kann der Mechanismus der bakteriellen Umsetzung von Isoflavonen durch *S. isoflavoniconvertens* eingehend erforscht werden. Die ermittelten Gensequenzen der durch Daidzein induzierten Proteine sowie die korrespondierenden Gene weiterer Equol-produzierender Bakterien bieten zudem die Möglichkeit der mikrobiellen Metagenomanalyse im humanen Darmtrakt.

# Summary

Gut bacteria play a crucial role in the metabolism of dietary isoflavones which have been implicated in the prevention of hormone-dependent and age-related diseases. Only the intestinal bacteria are able to catalyze the bioactivation of the main soybean isoflavones daidzein and genistein to equol and 5-hydroxy-equol, respectively. Although several equol-forming gut bacteria have been isolated in recent years, the knowledge on the involved enzymes is still scarce. *Slackia isoflavoniconvertens* represents one of the few equol-forming gut bacteria isolated from humans.

Growth experiments with *S. isoflavoniconvertens* indicated that the enzymes catalyzing the conversion of daidzein and genistein were inducible by these isoflavones. Using two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE), several proteins were found to be upregulated in *S. isoflavoniconvertens* cells grown in the presence of daidzein. Based on selected protein sequences, a cluster of eight genes was identified encoding the daidzein-induced proteins. Sequence analysis revealed also similarities of daidzein-induced proteins to corresponding enzymes from other equol-forming human gut bacteria. The heterologous expression of three of those proteins in *Escherichia coli* and enzyme activity tests identified them as a daidzein reductase (DZNR), a dihydrodaidzein reductase (DHDR) and a tetrahydrodaidzein reductase (THDR). The combined cell extracts catalyzed the complete conversion of daidzein to equol. The recombinant DZNR also converted genistein to the intermediate dihydrogenistein at higher rates than observed for the conversion of daidzein to dihydrodaidzein. Higher rates were also observed with *S. isoflavoniconvertens* cell extracts. In combination, the recombinant DHDR and THDR catalyzed the reduction of dihydrodaidzein to equol, while the corresponding formation product 5-hydroxy-equol was not observed.

The three reductases were functionally expressed as *Strep*-tag fusion proteins and purified by a one-step affinity chromatography. In addition, the remaining daidzein-induced proteins IfcA, IfcBC and IfcE were successfully expressed in *E. coli* and purified. In a comparative enzyme activity test, IfcA was identified as a dihydrodaidzein racemase, which converts the (*R*)- and (*S*)-enantiomers of dihydrodaidzein and dihydrogenistein to the corresponding racemate. Flavin analysis revealed flavin adenine dinucleotide (FAD) as the cofactor of THDR, DZNR, IfcE and also of the putative heterodimeric electron transfer

flavoprotein IfcBC. In addition, IfcE was identified as iron-sulfur enzyme. The analysis of intergenic regions and gene expression indicated a non-operon genetic structure of daidzein-induced proteins, because mRNA expression occurs at different transcriptional units. Furthermore, the transcription start site was determined for *ifcA* as the first gene of daidzein-induced gene cluster.

In summary, the identification and incipient characterization of the daidzein-induced enzymes provides the basis for detection corresponding genes in other equol-forming gut bacteria within the microbial metagenome of the human gut. The results enable also further studies to elucidate the catalytic mechanism underlying the isoflavone bioactivation by *S. isoflavoniconvertens* and to clarify the regulation of enzyme induction.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung . . . . .	1
1.1	Isoflavone - eine Substanzklasse der Flavonoide . . . . .	1
1.2	Bioverfügbarkeit und Metabolismus der Isoflavone im Menschen . .	3
1.3	Wirkung von Isoflavonen im Menschen . . . . .	4
1.4	Der mikrobielle Metabolit Equol als ein nicht steroidales Estrogen .	6
1.5	Umsetzung von Daidzein und Genistein durch die intestinale Mikro- biota . . . . .	9
1.5.1	<i>Slackia isoflavoniconvertens</i> , eine Equol-synthetisierende Spezies . . . . .	11
1.5.2	Die enzymatische Umsetzung von Daidzein und Genistein durch Equol-produzierende Bakterien . . . . .	12
1.6	Zielstellung . . . . .	15
2	Material und Methoden . . . . .	16
2.1	Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien . . . . .	16
2.2	Molekularbiologische Methoden . . . . .	18
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus <i>Slackia isoflavoniconver-</i> <i>tens</i> . . . . .	18
2.2.2	Amplifizierung von Genfragmenten mittels PCR . . . . .	18
2.2.3	Reinigung von PCR-Produkten . . . . .	20
2.2.4	Herstellung von <i>Escherichia coli</i> -Klonen . . . . .	20
2.2.5	Plasmid-Präparation . . . . .	21
2.2.6	Inverse PCR . . . . .	21
2.2.7	Isolation der Gesamt-RNA aus <i>Slackia</i> <i>isoflavoniconvertens</i> . . . . .	22
2.2.8	RNA-Gelelektrophorese . . . . .	23
2.2.9	Subklonierung von Daidzein-induzierten-Genen in <i>Esche-</i> <i>richia coli</i> . . . . .	24
2.2.10	Heterologe Genexpression in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	25
2.2.11	Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse . . . . .	26
2.2.12	Bestimmung der Position von Transkriptionsstarts . . . . .	26

---

2.2.13	<i>Northern-Blot-Analyse</i> . . . . .	27
2.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	31
2.3.1	Herstellung von bakteriellen Zellextrakten . . . . .	31
2.3.2	Reinigung von <i>Strep</i> (II)-Fusionsproteinen . . . . .	32
2.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration . . . . .	32
2.3.4	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) . . . . .	33
2.4	Enzymkinetik . . . . .	36
2.4.1	Bestimmung der Enzymaktivitäten bei der Umsetzung von Isoflavonen . . . . .	36
2.4.2	NAD(P)H-Dehydrogenase-Assay . . . . .	37
2.5	Chemisch-Analytische Methoden . . . . .	38
2.5.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) . . . . .	38
2.5.2	Dünnschichtchromatographie . . . . .	39
2.5.3	Aufnahme von Absorptionsspektren . . . . .	40
2.5.4	Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen . . . . .	40
2.5.5	Bestimmung von säurelabilem Schwefel . . . . .	40
2.6	Computerbasierte Anwendungen . . . . .	41
2.6.1	Primerdesign und DNA-Sequenzierung . . . . .	41
2.6.2	Sequenzanalysen . . . . .	41
3	Ergebnisse . . . . .	43
3.1	Identifizierung der durch Daidzein induzierten Proteine von <i>Slackia</i> <i>isoflavoniconvertens</i> . . . . .	43
3.2	Computergestützte Analysen zur Charakterisierung des mit Daid- zein induzierten Genkomplexes von <i>Slackia isoflavoniconvertens</i> . . . . .	46
3.2.1	Homologie-Analyse der identifizierten Genprodukte . . . . .	46
3.2.2	Vergleich der Genanordnung Daidzein umwandelnder Pro- teine in Equol-produzierenden Bakterien . . . . .	50
3.2.3	Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation . . . . .	52
3.3	Funktionelle Expression der Daidzein-umsetzenden Enzyme von <i>Slackia isoflavoniconvertens</i> . . . . .	53
3.3.1	Heterologe Expression in <i>Escherichia coli</i> . . . . .	53
3.3.2	Nachweis der Daidzein-umsetzenden Aktivität heterologer Proteine . . . . .	55
3.4	Reinigung der rekombinanten, durch Daidzein induzierten Proteine unter nativen Bedingungen . . . . .	58
3.4.1	Fusion der Daidzein-umsetzenden Enzyme an verschiedene Affinitäts- <i>tags</i> . . . . .	58



---

3.4.2	Reinigung der Daidzein-induzierten Proteine als <i>Strep</i> -Fusionsproteine . . . . .	58
3.5	Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität der Daidzein-induzierten Proteine . . . . .	63
3.5.1	Bestimmung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte für die Daidzein-Reduktase bei Umsetzung von Daidzein und Genistein . .	63
3.5.2	Identifizierung einer Dihydrodaidzein-Racemase . . . . .	64
3.5.3	Nachweis der NAD(P)H-Dehydrogenase-Aktivität der Elektronentransfer-Flavoproteine von <i>Slackia isoflavoniconvertens</i> . . . . .	65
3.5.4	Verwendung aller rekombinanten, durch Daidzein induzierten Proteine bei der Umsetzung von Daidzein . . . . .	66
3.6	Identifizierung von enzyme-spezifischen Kofaktoren der durch Daidzein induzierten Proteine von <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	66
3.6.1	Charakterisierung der Flavinkofaktoren . . . . .	66
3.6.2	Untersuchungen zu Eisen-Schwefel-Zentren . . . . .	68
3.7	Untersuchungen zur nativen Struktur . . . . .	69
3.8	Experimentelle Analysen zur transkriptionellen Regulation der durch Daidzein induzierten Gene in <i>Slackia isoflavoniconvertens</i> . . . . .	70
3.8.1	Identifizierung von koexprimierten Genen . . . . .	70
3.8.2	Ermittlung der Startposition einzelner Transkripte . . . . .	74
4	Diskussion . . . . .	76
4.1	Vergleich des Genkomplexes Daidzein-metabolisierender Enzyme in verschiedenen Equol-bildenden Darmbakterien . . . . .	76
4.2	Enzymatische Umsetzung von Daidzein und Genistein im zellfreien System . . . . .	78
4.3	Vergleich der durch Daidzein induzierten Proteine mit Proteinen ähnlicher bakterieller Stoffwechselwege . . . . .	82
4.4	Regulation der Genexpression . . . . .	89
4.5	Abschließende Betrachtung und Ausblick . . . . .	93
5	Anhang . . . . .	94

# Abbildungsverzeichnis

1	Grundkörper von Flavanen und Isoflavonen sowie Struktur ausgewählter Isoflavonglucoside. . . . .	2
2	Strukturelle Ähnlichkeit des Isoflavonmetaboliten Equol zum Steroidhormon $17\beta$ -Estradiol. . . . .	6
3	Umsetzungen von Daidzein und Genistein durch die intestinale Darmmikrobiota. . . . .	10
4	Umsetzung von Daidzein und Genistein durch <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	12
5	Enzymatische Umsetzung von Daidzein über Dihydrodaidzein und (3 <i>S</i> ,4 <i>R</i> )-Tetrahydrodaidzein zu (3 <i>S</i> )-Equol durch <i>Eggerthella</i> sp. Stamm Julong. . . . .	14
6	2D-DIGE-Dualbild der zytoplasmatischen Proteine von <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	43
7	Genorganisation der durch Daidzein induzierten Proteine im 12 kb großen DNA-Fragment von <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	44
8	Vergleich der Genorganisation innerhalb des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von <i>S. isoflavoniconvertens</i> mit korrespondierenden Genen Equol-produzierender Bakterien. . . . .	51
9	Genorganisation des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von <i>S. isoflavoniconvertens</i> mit den potenziellen Promotoren und Transkriptionsterminatoren. . . . .	52
10	SDS-PAGE-Analyse von Zellextrakten der <i>tdr</i> -, <i>ddr</i> - und <i>dzt</i> -exprimierenden <i>E. coli</i> -Klone. . . . .	53
11	Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von Daidzein und Genistein unter anoxischen Bedingungen in Anwesenheit von NADPH. . . . .	55
12	SDS-PAGE-Analyse der aus <i>E. coli</i> -Zellextrakten gereinigten <i>Strep</i> (II)-Fusionsproteine DZNR, DHDR und THDR. . . . .	59
13	SDS-PAGE der aus <i>E. coli</i> -Zellextrakten gereinigten <i>Strep</i> (II)-Fusionsproteine IfcA, IfcB, IfcC und IfcE. . . . .	60
14	SDS-PAGE-Analyse des aus <i>E. coli</i> -Zellextrakt gereinigten Heterodimers IfcBC. . . . .	61

---

15	SDS-PAGE-Analyse der aus <i>E. coli</i> -Zellextrakt gereinigten Proteine Orf1-Val und Orf1-Leu. . . . .	62
16	Michaelis-Menten-Kinetik der gereinigten Daidzein-Reduktase für die Substrate Daidzein und Genistein. . . . .	63
17	Postulierte Umsetzungsreaktion von Daidzein zu ( <i>S</i> )-Equol in <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	64
18	Nachweis der Flavinkofaktoren von THDR, IfcBC, DZNR und IfcE. . . . .	67
19	RT-PCR-Analysen der intergenen Bereiche des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	70
20	RT-PCR-Analyse der Gene <i>orf1</i> , <i>ifcD</i> und <i>ifcE</i> . . . . .	71
21	Exemplarischer <i>Northern-Blot</i> zum Nachweis der bei der Induktion mit Daidzein in <i>S. isoflavoniconvertens</i> gebildeten Transkripte. . . . .	72
22	Schematische Darstellung des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von <i>S. isoflavoniconvertens</i> mit den mittels <i>Northern-Blot</i> -Analyse identifizierten Transkripten. . . . .	74
23	Identifizierter Transkriptionsstart des durch Daidzein induzierten Gens <i>ifcA</i> in <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	75
24	Vergleich der Genorganisation genabwärts von <i>ifcBC/fixAB</i> gelegener Gene in drei Equol-produzierenden Bakterien. . . . .	88

# Tabellenverzeichnis

1	Ausgewählte Daidzein- und Genistein-umsetzende Darmbakterien. . . . .	9
2	Verwendete Oligonukleotidprimer, deren Ableitung aus Peptidsequenzen der durch Daidzein induzierten Proteine erfolgte. . . . .	19
3	Charakteristische Eigenschaften der neun identifizierten Gene und ihrer korrespondierenden Genprodukte. . . . .	45
4	Identitätsvergleich von Aminosäuresequenzen der identifizierten <i>S. isoflavoniconvertens</i> -Genprodukte mit äquivalenten Proteinen Equol-produzierender Bakterien. . . . .	47
5	Mögliche Quartärstruktur der gereinigten, durch Daidzein induzierten Proteine nach nativer Gelelektrophorese. . . . .	69
6	Mittels <i>Northern-Blot</i> -Analyse nachgewiesene Transkripte durch Verwendung spezifischer DNA-Sonden für die mit Daidzein induzierten Gene von <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	73
7	Verwendete Primer und Primerkombinationen. . . . .	94
8	Nachgewiesene Peptidsequenzen der sichtbar induzierten Daidzein-umwandelnden Proteine von <i>S. isoflavoniconvertens</i> . . . . .	97

# Abkürzungsverzeichnis

aa	Aminosäuren
ACP	Acyl-Carrier-Protein
<i>A. equolifaciens</i>	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARF-TSS	<i>Adaptor- and radioactivity-free identification of transcription start sites</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
CSPD	Dinatrium-3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-chloro)tricyclo [3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)phenyl-phosphat
2D-DIGE	Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese
DAI	Daidzein
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
DCPIP	2,6-Dichlorphenolindophenol
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
<i>ddr</i>	Dihydrodaidzein-Reduktase-Gen
DEPC	Diethyldicarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DHD	Dihydrodaidzein
DHDR	Dihydrodaidzein-Reduktase

---

DHG	Dihydrogenistein
DIfE	Deutsches Institut für Ernährungsforschung
DIG	Digoxygenin
DMPD	<i>N,N</i> -Dimethyl-1,4-phenylendiamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
DZNR	Daidzein-Reduktase
<i>dzr</i>	Daidzein-Reduktase-Gen
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. mucosicola</i>	<i>Enterorhabdus mucosicola</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
EQ	Equol
ER	Estrogenrezeptor
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisation-Massenspektrometrie
ETF	Elektronentransfer-Flavoprotein
FAD	Flavinadenindinukleotid
FBEB	<i>Flavin-based electron bifurcation</i>
FMN	Flavinmononukleotid
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
GAM	<i>Gifu anaerobic medium</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GEN	Genistein
GST	Glutathion-S-Transferase
HABA	4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HMW	<i>High molecular weight</i>
HTH	Helix-Turn-Helix-Motiv
IfcA	Dihydrodaidzein-Racemase
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
$K_m$	Michaelis-Konstante
KPP	Kaliumphosphatpuffer

---

LB	<i>Lysogeny broth</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
5-OHEQ	5-Hydroxyequol
LPH	Lactase-Phlorizin-Hydrolase
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure-Lösung
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
OD <sub>600</sub>	Optische Dichte bei 600 Nanometer
ORF	Offenes Leseraster
OYE	<i>Old yellow enzyme</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
RBA	Relative Bindungsaffinität
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
ppm	<i>Parts per million</i>
R <sub>f</sub>	Retentionsfaktor
R <sub>t</sub>	Retentionszeit
RNA	Ribonukleinsäure
Rnf	<i>Rhodobacter nitrogen fixation</i>
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse
SAM	<i>S</i> -Adenosylmethionin
SDR	<i>Short chain dehydrogenases/reductases</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler
SERM	Selektiver Estrogenrezeptormodulator
<i>S. isoflavoniconvertens</i>	<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>
SOC	<i>Super optimal broth</i>
sp.	Spezies
SSC	<i>Saline-sodium citrate</i> -Lösung
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TB	<i>Terrific Broth</i>

---

TCA	Trichloressigsäure
<i>tdr</i>	Tetrahydrodaidzein-Reduktase-Gen
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
THD	Tetrahydrodaidzein
THDR	Tetrahydrodaidzein-Reduktase
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
T3	Triiodthyronin
T4	Tetraiodthyronin
U	Unit
UV	Ultraviolett
UDP	Uridindiphosphat
V	Volt
v	Volumen
$V_{max}$	Maximalgeschwindigkeit
VOC	<i>Vicinal Oxygen Chelate</i>
w	Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel



# 1 Einleitung

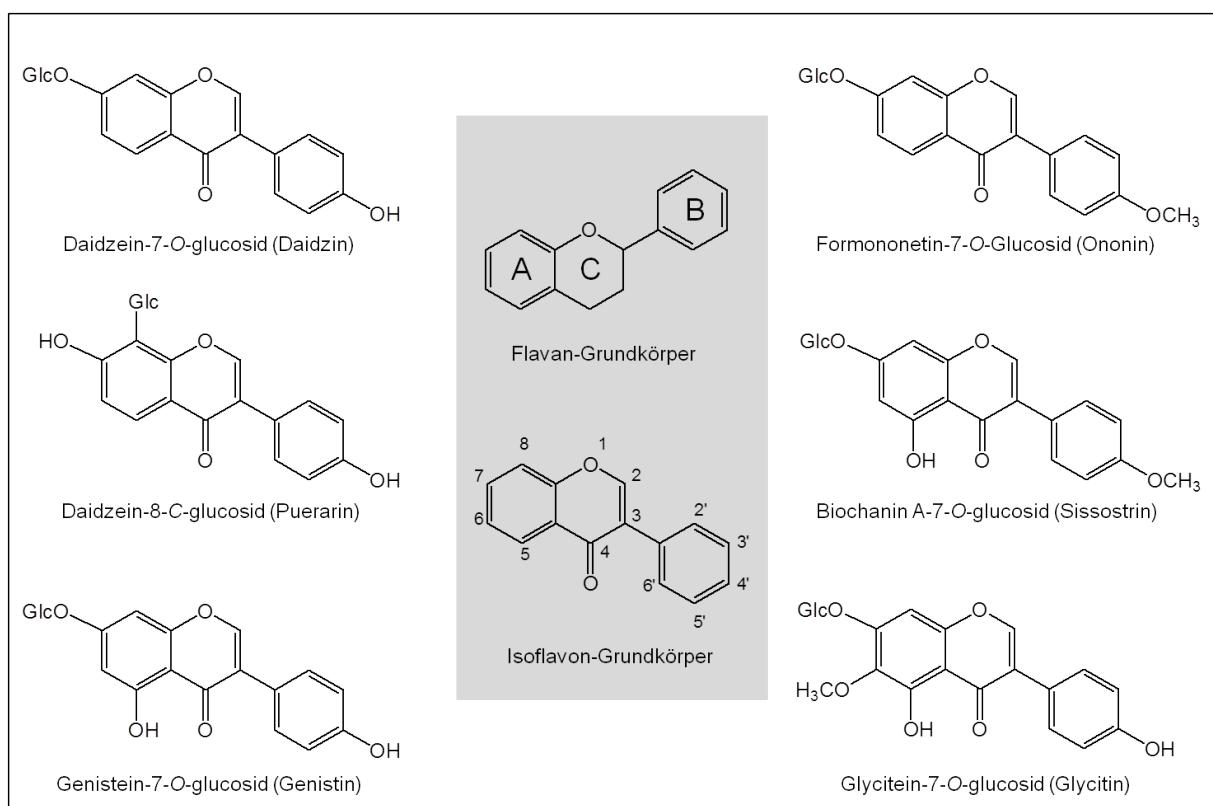
## 1.1 Isoflavone - eine Substanzklasse der Flavonoide

Mit dem Begriff Flavonoid werden im Allgemeinen polyphenolische sekundäre Pflanzenstoffe mit einem C6-C3-C6-Atom-Kohlenstoffgerüst bezeichnet. Flavonoide sind Phenylchromanderivate und werden, abhängig von der Substitution des aromatischen B-Rings, in die biogenetisch verwandten Verbindungen der Flavane (2-Phenyl-chromane), Isoflavane (3-Phenyl-chromane) und Neoflavane (4-Phenyl-chromane) eingeteilt (Abbildung 1). Eine weitere Unterteilung der Isoflavane in Isoflavone, Isoflavanone und Isoflavanole erfolgt anhand des Oxidationszustands am C2-, C3- und C4-Atom [103, 216]. Die Synthese der Flavonoide findet über einen separaten Zweig des Phenylpropan-Stoffwechselwegs statt. Katalysiert durch einen Multienzymkomplex reagieren drei Moleküle Malonyl-Coenzym A mit einem Phenylacryloyl-Coenzym A-Derivat. Durch Arylwanderung gehen Isoflavane anschließend aus Flavanen hervor, ein Schritt, der durch das Cytochrom-P450-Enzym Isoflavon-Synthase katalysiert wird [103, 216]. Dieses Enzym kommt hauptsächlich in Leguminosen (auch bezeichnet als Hülsenfrüchtler oder *Fabaceae*) und einigen anderen Pflanzenspezies vor. Dementsprechend sind Isoflavone im Pflanzenreich nicht weit verbreitet [120, 230, 256]. In Form von 6''-O-Malonyl-7-O- $\beta$ -glykosiden werden Isoflavone an einen Zuckerrest konjugiert und in der Pflanzenvakuole gespeichert [13, 238].

Flavone wie auch Isoflavone sind essentiell für die Rhizobien-vermittelte Ausbildung von Wurzelknöllchen in Leguminosen, durch die molekularer Stickstoff aus der Luft fixiert und in Form von Ammonium für die Pflanze verfügbar gemacht wird [210, 213]. Als wirtsspezifische Substanzen aktivieren sie die Nodulations(*nod*)-Gene des kompatiblen Rhizobium-Stamms und wirken zusätzlich als Chemoattraktantien [182, 212, 213]. Weiterhin besitzen Isoflavone antimikrobielle Eigenschaften und sind als Phytoalexine an der Abwehr von Pflanzenpathogenen beteiligt [45].

Im Vergleich zu anderen Leguminosen ist der Gehalt an Isoflavonen in der Sojabohne (*Glycine max*) und den daraus hergestellten Lebensmitteln hoch [103]. Die für die menschliche Ernährung relevanten Isoflavone sind die Glucoside Genistin, Daidzin und Glycitin aus der Sojabohne sowie Sissostrin und Ononin aus der Kichererbse (*Cicer arietinum*) [50, 76, 143] (Abbildung 1). Je nach Anbaubedingungen, Erntejahr, klimatischen Bedingungen, Genetik und Reifestadium variiert die Gesamtisoflavonmenge von 0,1 bis 3 mg (Aglyka und Glucoside) pro Gramm an Sojabohnen [120, 143, 196, 208, 238]. Durch die un-

terschiedliche Verarbeitung von Sojabohnen verändert sich der Gehalt und die Struktur der Isoflavone. So enthalten fermentierte Produkte wie Tempeh, Sojasoße, Miso und Natto hauptsächlich Isoflavonaglyka, während nicht fermentierte Sojanahrungsmittel wie Tofu und Soja-Milch fast ausschließlich die entsprechenden  $\beta$ -Glucoside beinhalten [14, 120]. In asiatischen Ländern wie Japan, China und Korea werden im Durchschnitt täglich zwischen 15 und 50 mg Isoflavone durch den Verzehr von traditionell hergestellten Sojalebensmitteln aufgenommen. Der hauptsächliche Konsum von Soja in den westlichen Ländern erfolgt durch Sojaprotein mit einer durchschnittlichen täglichen Aufnahme von bis zu 5 mg Isoflavonen [103, 120].



**Abbildung 1: Grundkörper von Flavanen und Isoflavonen sowie Struktur ausgewählter Isoflavonglucoside.**

Aufgrund ihrer estrogenen Wirkung (siehe auch Kapitel 1.3) werden Isoflavone aus der Sojabohne und dem Rotklee (*Trifolium pratense*) als Bestandteil von Nahrungsergänzungsmitteln und diätetischen Lebensmitteln angeboten. Längere Zeit galten die Isoflavon-Präparate als pflanzliche Alternative zur Hormontherapie bei Behandlung von klimakterischen Beschwerden in der Peri- und Postmenopause von Frauen [54, 166]. Inzwischen wird jedoch von der Einnahme zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden abgeraten, da die positive Wirkung als auch die Sicherheit von hoch konzentrierten Isoflavonen nicht ausreichend belegt ist [20, 54].

## 1.2 Bioverfügbarkeit und Metabolismus der Isoflavone im Menschen

Die Bioverfügbarkeit der Isoflavone ist im Menschen individuell verschieden. Mit dem Begriff der Bioverfügbarkeit wird im Allgemeinen die Menge einer Verbindung bezeichnet, die nach Aufnahme direkt im Blut nachweisbar ist und im Gewebe des Organismus eine physiologische Wirkung ausübt [120]. Die individuellen Unterschiede in der Bioverfügbarkeit von Isoflavonen sind abhängig von Faktoren wie dem Geschlecht, der Darmpassagezeit und der Darmmikrobiota sowie vom aufgenommenen Lebensmittel und der Art der Ballaststoffe [20].

Nach dem Verzehr von Sojalebensmitteln werden Isoflavonaglyka im Vergleich zu den hydrophilen Isoflavonglucosiden direkt durch passive Diffusion im mittleren Teil des Dünndarms resorbiert [88, 195, 251]. Die Hydrolyse von Isoflavonglucosiden erfolgt durch wirts-eigene  $\beta$ -Glucosidasen in der Darmmukosa oder durch bakterielle bzw. in der Nahrung enthaltene Enzyme [46, 120, 186]. Im Dünndarm von Säugern identifizierte  $\beta$ -Glucosidasen umfassen u. a. eine zytosolische  $\beta$ -Glucosidase mit breiter Substratspezifität und die membrangebundene Lactase-Phlorizin-Hydrolase (LPH). Neben ihrer primären Funktion als Laktose-spaltendes Enzym katalysiert die LPH auch die Hydrolyse von Daidzin und Genistin an der apikalen Seite der Dünndarm-Epithelzellen [46, 47, 120]. Die Hydrolyse durch die zytosolische  $\beta$ -Glucosidase erfordert die Aufnahme der Glucoside in die Zelle. Puerarin, ein C-Glucosid des Daidzeins, wird vermutlich wie das Flavonol Quercetin-4'- $\beta$ -glucosid direkt über einen Natrium/Glucose-Transporter in die Epithelzelle aufgenommen [174, 235]. Ähnliche zelluläre Aufnahmesysteme für Isoflavon-O-glucoside wie Daidzin und Genistin sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht bekannt.

Aufgrund ihrer unpolaren Struktur werden Isoflavonaglyka durch Konjugationsreaktionen in ausscheidbare Stoffe umgewandelt (Phase II des Biotransformations-Stoffwechsels). So liegen Isoflavone im Plasma zum Großteil in Form von glucuronidierten, sulfatierten als auch sulfoglucuronidierten Konjugaten vor [160, 202]. Die Konjugation der Isoflavone erfolgt an der C7-und/oder C4'-Hydroxygruppe durch Uridindiphosphat (UDP)-Glucuronosyltransferasen und 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS)-Sulfotransferasen, welche in der Leber und der Darmwand lokalisiert sind [120, 193, 202, 252]. Die Isoflavon-Konjugate gelangen durch den enterohepatischen Kreislauf von der Leber über die Gallenblase erneut in den Darmtrakt oder werden zur Niere transportiert und darüber ausgeschieden [120, 251]. Nicht resorbierte Isoflavonglucoside und -konjugate erreichen den Dickdarm und werden durch bakterielle Enzyme deglycosyliert bzw. dekonjugiert [120]. Zudem können Isoflavonaglyka durch geeignete Darmbakterien weiter umgesetzt werden (siehe auch Kapitel 1.5). Die entsprechenden Umsetzungsmetaboliten werden ebenfalls resorbiert und sind in Blutplasma, Urin und Fäzes nachweisbar [103].

Die Gesamtkonzentration der Soja-Isoflavone im Plasma wird bei Asiaten nach Verzehr von sojahaltigen Lebensmitteln mit 870 nmol/l angegeben. Europäer mit einem niedrigeren Isoflavon-Konsum weisen im Vergleich dazu durchschnittlich 10 nmol/l Gesamtisoflavon im Plasma auf [3, 20]. Nur 10–60 % der aufgenommenen Isoflavone werden über den Urin ausgeschieden, zumeist in Form von konjugierten Verbindungen [34, 120, 201]. In Fäzes beträgt der Anteil der ausgeschiedenen Isoflavone, hauptsächlich in nicht konjugierter Form, weniger als 5 % [2, 103, 120, 242, 251, 252]. Neben der zusätzlichen Ausscheidung über die Galle können Isoflavone auch durch mikrosomale Cytochrome P450 oxidiert werden [80, 103, 114, 120].

### 1.3 Wirkung von Isoflavonen im Menschen

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zum endogenen Estrogen  $17\beta$ -Estradiol binden Isoflavone an Estrogenrezeptoren (ER) [196] (Abbildung 2). Natürlich vorkommende, nicht steroidale Pflanzeninhaltsstoffe, die gering estrogen (agonistisch) als auch antiestrogen (antagonistisch) wirken, werden als Phytoestrogene oder auch selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERM) bezeichnet [120, 192]. Die bekannten Phytoestrogene gehören den Klassen der Isoflavone (z.B. Daidzein, Genistein, Biochanin A, Formononetin), Lignane (z.B. Secoisolariciresinol-Diglucosid), Coumestane (z.B. Coumestrol) und Stilbene (z.B. Resveratrol) an [171]. Abhängig vom ER-Subtyp, dem Gewebe und der endogenen Estrogenkonzentration besitzen Isoflavone entweder agonistische oder antagonistische Eigenschaften [113, 120, 196, 236]. Sojakonsum führt dabei zu einer Isoflavonkonzentration, welche dem normalen Plasmaspiegel an  $17\beta$ -Estradiol um einen bis zu  $10^4$ -fachen Wert übersteigt [196]. Im Vergleich zum Hormon  $17\beta$ -Estradiol besitzen Isoflavone aber eine 100-fach geringere Affinität zu den Estrogenrezeptoren [113]. Humane Estrogenrezeptoren werden in die Subtypen  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  unterteilt und wirken als DNA-bindende Transkriptionsfaktoren [112, 113]. Im Uterus, dem Hypothalamus/Hypophyse, den Nieren und dem Skelett wird die Estrogenwirkung vor allem durch  $ER\alpha$  vermittelt, während  $ER\beta$  vorrangig in den Eierstöcken, den Blutgefäßen, der Prostata, der Lunge und im Gehirn lokalisiert ist [111, 171, 196]. Kompetitive Bindestudien zeigen, dass Isoflavone eine stärkere Affinität zum  $ER\beta$  besitzen als zu  $ER\alpha$  [113, 158].

Zudem wird vermutet, dass Isoflavone neben ihrer estrogenen Wirkung und dem daraus resultierenden Einfluss auf die Genexpression auch über membranständige ERs wirken [170, 171, 243]. Die Aktivierung von membranständigen ERs initiiert intrazelluläre Signalkaskaden, welche die Aktivität von G-Proteinen, Adenylatzyklen, Phospholipasen oder Kinasen regulieren können und damit Änderungen in der Ionenkonzentration, Membranpermeabilität oder Stickstoffmonoxid-Produktion hervorrufen [171, 211]. Neben der ER-bindenden Aktivität interagieren Isoflavone mit den Peroxisom-Proliferator-

aktivierten Rezeptoren (PPAR $\alpha/\gamma$ ) und sind Inhibitoren verschiedener Enzyme [229]. So inhibiert Genistein spezifisch die vor allem in Krebszellen stark überexprimierte Protein-Tyrosinkinase [4, 83]. Ein weiteres Zielenzym ist die in follikulären Schilddrüsenzellen enthaltene Thyreoperoxidase. Durch Daidzein und Genistein wird das Enzym *in vitro* bei Konzentrationen von 1–10  $\mu\text{M}$  kompetitiv gehemmt und die Bildung der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Tetraiodthyronin (Thyroxin, T4) aus Thyrosin inhibiert [49]. Die Hemmung ist in Anwesenheit von Iod reversibel. Bezüglich der physiologischen Relevanz scheint es jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer Schilddrüsenunterfunktion und dem Konsum von Soja oder isolierten Isoflavonen zu geben [35, 146].

Aufgrund ihrer estrogenen, antioxidativen und antikanzerogenen Aktivität wurden Isoflavone in zahlreichen Studien auf potenzielle gesundheitsfördernde Effekte untersucht. Epidemiologische Studien belegen, dass in der asiatischen Bevölkerungen mit einem hohen Konsum an Sojalebensmitteln Hormon-abhängige Krankheiten wie Brust- und Prostatakrebs sowie postmenopausale Symptome (vasomotorische Beschwerden, Osteoporose) und Herz-Kreislauf-Erkrankungen seltener auftreten als in Ländern mit geringem Sojakonsum [1, 120]. Ein Großteil der Fall-Kontroll-Studien und prospektiven Studien belegen einen präventiven Effekt der Isoflavone bezüglich der Entwicklung von endokrinem Prostata- und Brustkrebs. So korreliert in verschiedenen Studien mit asiatischen als auch europäischen Männern der Konsum von sojahaltigen Lebensmitteln oder isolierten Isoflavonen mit einem reduzierten Risiko für Prostatakrebs [150, 169, 221, 253]. Die Daten aktueller Analysen und Studien belegen einen möglichen Zusammenhang zwischen dem verringerten Risiko für Brustkrebs und der verstärkten Aufnahme von Soja-Isoflavonen. Korrelationen lassen sich jedoch häufig nur für postmenopausale asiatische Frauen beobachten [52, 159, 233, 248, 250]. Grund hierfür wird der hohe Konsum von Sojalebensmitteln in den asiatischen Ländern sein [250]. Weitere Studien zeigen zudem eine Korrelation zwischen der Aufnahme von Soja in jungen Lebensjahren (Kindheit und Adoleszenz) und einem verringerten Risiko für Brustkrebs im Erwachsenenalter [108, 122, 206].

Aufgrund der nachlassenden Estrogenproduktion und der damit einhergehenden hormonellen Umstellung leiden viele Frauen in den Wechseljahren unter klimakterischen Beschwerden. So sind vasomotorische Symptome (Hitzewallungen, Schweißausbrüche) und die Abnahme der Knochendichte (Osteoporose) typisch für peri- und postmenopausale Frauen [166]. Eine Vielzahl von Studien belegt, dass die Einnahme von Soja-Isoflavonen einen positiven Effekt auf die Knochenmineraldichte hat [133, 172, 173, 214, 258]. Im Vergleich dazu ist der Einfluss von Isoflavonen auf die Reduktion von vasomotorischen Symptomen wahrscheinlich gering [24, 92, 215]. Derzeitige Metaanalysen schlussfolgern sogar, dass Isoflavone und weitere Phytoestrogene keine therapeutische Wirksamkeit in Bezug auf Wechseljahresbeschwerden haben und demzufolge nicht zur Linderung von Hitzewallungen und anderen Symptomen empfohlen werden können [53, 123].

Neben Krebs gehören Herz-Kreislauf-Erkrankungen zu den häufigsten Erkrankungen beim Menschen. Interessanterweise treten kardiovaskuläre Todesfälle in westlichen Industrienationen bis zu acht mal häufiger auf als in asiatischen Ländern [16, 171]. Eine Metaanalyse zeigt, dass der durchschnittliche Verzehr von 47 g Soja-Protein/Tag zu einer Reduktion des Serum-LDL-Cholesterols führt [6]. Dieser Effekt war abhängig von einer anfänglich erhöhten Konzentration an Cholesterol im Serum [6]. Gegenwärtige Metastudien bestätigen gleichfalls einen positiven Zusammenhang zwischen einer isoflavonhaltigen Diät und der Abnahme der Gesamtcholesterol-, *Low density lipoprotein* (LDL)-Cholesterol- und Triglyceridkonzentration im Serum [5, 257]. Wahrscheinlich üben Isoflavone auch einen positiven Effekt auf die arterielle Endothelfunktion aus und wirken blutdrucksenkend bei Hypertonie-Patienten [17, 126].

#### 1.4 Der mikrobielle Metabolit Equol als ein nicht steroidales Estrogen

Das Isoflavan Equol [7-Hydroxy-3-(4'-Hydroxyphenyl)-chroman] wurde 1932 erstmalig im Urin einer trächtigen Stute nachgewiesen [137]. Fünfzig Jahre später wurde beobachtet, dass Equol auch im Urin des Menschen nach Verzehr von Soja ausgeschieden wird [11]. Vorläuferstudien in Tieren hatten zudem gezeigt, dass Equol nicht mit der Nahrung aufgenommen wird, sondern ein bakterieller Daidzein-Metabolit der gastrointestinalen Mikrobiota ist [12, 207].

Aufgrund eines chiralen Zentrums am C3-Atom kann Equol in der Konformation des (*S*)- und (*R*)-Enantiomers vorliegen. Die bakterielle Umsetzung von Daidzein ist enantiospezifisch und führt ausschließlich zur Bildung von (*S*)-Equol [28, 199]. Im Vergleich zum (*R*)-Enantiomer ist (*S*)-Equol eher planar und ähnelt der Konformation von  $17\beta$ -Estradiol [198] (Abbildung 2).

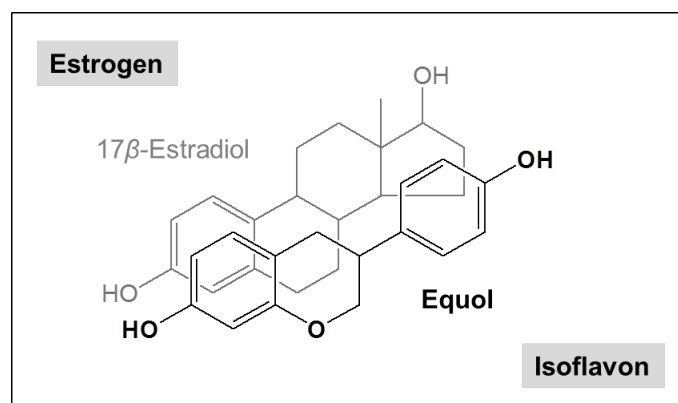


Abbildung 2: Strukturelle Ähnlichkeit des Isoflavonmetaboliten Equol zum Steroidhormon  $17\beta$ -Estradiol [196].

Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit bindet (*S*)-Equol an Estrogen-spezifische Rezeptoren und wirkt als SERM [198]. Während  $17\beta$ -Estradiol nicht selektiv an  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  bindet, besitzt das schwächer bindende (*S*)-Equol eine größere Affinität für  $ER\beta$  [154, 156, 158, 199]. In einem kompetitiven Bindungsassay wurde die relative Bindungsaffinität (RBA) auf die Affinität von  $17\beta$ -Estradiol bezogen. Der Vergleich der Equol-Enantiomere zeigt, dass (*S*)-Equol stärker an  $ER\beta$  (RBA: 32 %) bindet als an  $ER\alpha$  (RBA: 0,1 %), während (*R*)-Equol stärker an  $ER\alpha$  bindet (RBA: 0,4 %) [154, 158]. Auch ist die Bindeaffinität der Equol-Isomere zu  $ER\beta$  stärker im Vergleich zu den Isoflavonen Daidzein (RBA: 0,04 %) und Genistein (RBA: 7,4 %) [158].

Weiter besitzt Equol anti-androgene Eigenschaften, ohne an den Androgenrezeptor zu binden. Durch die spezifische Bindung von  $5\alpha$ -Dihydrotestosteron an Equol wird das Andocken des Hormons an den Androgenrezeptor verhindert, so dass ein vermindertes Wachstum der Prostata in Ratten beobachtet werden konnte [130].

Außer in Menschen und Pferden wurde Equol in einer Vielzahl von weiteren Säugetieren (z.B. Schaf, Affe, Hund, Maus, Ratte, Schwein) im Urin und/oder im Plasma nachgewiesen [12, 29, 74, 97, 131, 151, 161]. Vor allem Nager sind im Vergleich zum Menschen und dem Schwein sehr effiziente Equolbildner [74, 194]. Interessanterweise sind nur 20–25 % der nordamerikanischen und europäischen Bevölkerung in der Lage, (*S*)-Equol nach Verzehr von isoflavonhaltiger Nahrung zu bilden [10, 118, 183]. In Japan, Korea und China sind dagegen bis zu 80 % der Bevölkerung Equolbildner, wie auch 59 % der Vegetarier [69, 155, 200]. Ungeklärt ist, wie es zu den Populationsunterschieden in Bezug auf Equol-produzierende Darmbakterien kommt. Versuche an keimfreien Ratten zeigen, dass sich der Status eines guten bzw. schlechten Equolbildners durch den Transfer von humanen Fäzesproben auch auf keimfreie Ratten übertragen lässt [25]. Dies verdeutlicht den Einfluss individuellen Darmmikrobiota auf die Bildung von Equol. Eine weitere mögliche Erklärung bietet die verschiedenartige Zusammensetzung der konsumierten Sojaprodukte in den Bevölkerungsgruppen [197]. Da ein Drittel der in Asien verzehrten Sojaprodukte fermentiert sind, nehmen weite Teile dieser Bevölkerungsgruppe große Mengen an Isoflavonaglyka auf [209, 234]. Diese werden im Vergleich zu den Isoflavonglucosiden vom Körper schneller resorbiert, wodurch eine raschere Umwandlung des Aglykons Daidzein zu Equol erfolgen kann [89, 197, 242]. Dass ein Equolbildner auch über einen Zeitraum von 1–3 Jahren bleibend Equol produziert, wurde lange Zeit als stabile Eigenschaft angesehen [61, 119, 201]. Studien an prä- und postmenopausalen Frauen zeigen allerdings, dass ein Wechsel vom Equolbildner zum Nicht-Equol-produzierenden Individuum nach Verzehr von Sojaprotein erfolgen kann und umgekehrt (*Crossers*) [58, 59, 61, 107, 129].

Die Unterscheidung zwischen Equol-produzierenden und Nicht-Equol-produzierenden Individuen erfolgt anhand der Equol-Konzentration im Blut oder Urin nach Verzehr von Soja-Isoflavonen [118, 183, 194]. Eine von Setchell und Cole durchgeführte Studie defi-

nierte Individuen als Equolbildner mit einer Serum-Equol-Konzentration von  $> 20$  nM ( $> 5$  ng/ml) bzw. einer Urin-Equol-Konzentration von  $> 82$  nM ( $> 20$  ng/ml) [200].

Die Fähigkeit von Subpopulationen, das Soja-Isoflavon Daidzein in das biologisch aktivere (*S*)-Equol umzuwandeln, könnte für die gesundheitsfördernden Effekte von Daidzein in Bezug auf hormon-abhängige Erkrankungen verantwortlich sein (Equol-Hypothese). Gleichzeitig wären die teils widersprüchlichen Ergebnisse zur Wirkung von Isoflavonen auf die menschliche Gesundheit erklärbar, da in den wenigsten Studien zwischen Equolbildnern und Nichtbildnern unterschieden wurde [194]. In den folgenden vorgestellten humanen Studien wurde der Equolstatus der Teilnehmer in Hinblick auf potenziell gesundheitsfördernde Effekte bei Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Wechseljahresbeschwerden, Osteoporose und Prostatakrebs bestimmt. So zeigen vier Studien mit europäischen als auch asiatischen Teilnehmern keine inverse Korrelation zwischen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und der Bildung von Equol. Weder die Konzentration der Plasma-Lipide (LDL-, HDL- und Gesamtcholesterol) noch verschiedene Entzündungsmarker unterschieden sich zwischen Equolbildnern und Nicht-Equolbildnern [75, 109, 125, 218]. Dagegen führte der Verzehr einer mit Isoflavonaglyka angereicherten Sojakeim-Pasta bei Equolbildner mit Hypercholesterinämie zu verringerten Konzentrationen an LDL- und Gesamtcholesterol sowie des C-reaktiven Proteins [41].

Hinsichtlich von klimakterischen Stimmungsschwankungen und vasomotorischen Symptomen bewirkte die direkte Verabreichung von 10–30 mg (*S*)-Equol pro Tag eine Verbesserung des Befindens von japanischen Frauen in der peri- und postmenopausalen Phase [8, 87]. Die Studienlage zur Osteoporose bei postmenopausalen Frauen ist in Bezug auf die positive Wirkung von Equol widersprüchlich. Eine in den Niederlanden durchgeführte Studie an 202 postmenopausalen Frauen zeigte keine Wirkung von Sojaprotein (99 mg Isoflavone/Tag) auf die Knochendichte im Vergleich zur Kontrollgruppe oder in Abhängigkeit vom Equolstatus [109]. Andere Studien mit peri- und postmenopausalen Frauen zeigten dagegen, dass die tägliche Aufnahme von 40–76 mg Isoflavonen den Abbau der Knochen substanz in Equolbildnern verringert [132, 225, 249]. Vor allem menopausale Frauen unter 60 Jahren schienen auf den reduzierten Knochenabbau durch Equol anzusprechen [91, 101].

Der Einfluss des Equolstatus auf die Entwicklung von Prostatakrebs wurde bisher in zwei Fall-Kontroll-Studien untersucht. Im Vergleich zu Nicht-Equolbildnern korrelierte eine hohe Equolkonzentration im Plasma/Urin von Equolbildnern mit einem geringeren Risiko für Prostatakrebs [90, 115].



## 1.5 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch die intestinale Mikrobiota

Der Nachweis, dass Equol ein Metabolit der Säugerdarmmikrobiota ist, wurde in verschiedenen Studien erbracht. So scheiden keimfreie Ratten nach Fütterung einer isoflavonhaltigen Diät Daidzein und Genistein über den Urin aus, jedoch kein Equol [25]. Versuche mit resuspendierten Fäzesproben humaner Equolbildner zeigten außerdem, dass die Inkubation mit Daidzein zur Bildung von Equol führt [9,36,199]. Durch die Gabe bestimmter Antibiotika ließ sich die Bildung von Equol in Langschwanzmakaken deutlich reduzieren oder auch, wie *in vitro*-Versuche mit humanen Fäzesproben zeigen, vollständig inhibieren [9,23].

In den letzten Jahren wurden mehrere Equol-produzierende Bakterien aus dem Darmtrakt des Menschen und von Nagern isoliert und beschrieben. Eine für diese Arbeit relevante Auswahl an Spezies und ihrer katalysierenden Reaktionen ist in Tabelle 1 zusammengefasst. Die bakterielle Umsetzung von Daidzein zu Equol erfolgt in allen Stämmen außer *Eggerthella* sp. Julong 732 über Dihydrodaidzein (Abbildung 3) [239].

**Tabelle 1: Ausgewählte Daidzein- und Genistein-umsetzende Darmbakterien.**

Spezies	Familie	Umsetzung <sup>a</sup>	Quelle	Referenz
<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ	Mensch	[138]
<i>Asaccharobacter celatus</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ	Ratte	[148,149]
<i>Eggerthella</i> sp. Stamm Julong 732	<i>Coriobacteriaceae</i>	DHD → EQ	Mensch	[239]
<i>Eggerthella</i> sp. Stamm YY7918	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ	Mensch	[255]
<i>Enterorhabdus mucosicola</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ GEN → 5-OHEQ	Maus	[40,141]
<i>Lactococcus</i> sp. Stamm 20-92	<i>Streptococcaceae</i>	DAI → EQ	Mensch	[205]
<i>Slackia equolifaciens</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ GEN → 5-OHEQ	Mensch	[93,94]
<i>Slackia isoflavoniconvertens</i>	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ GEN → 5-OHEQ	Mensch	[140]
<i>Slackia</i> sp. Stamm NATTS	<i>Coriobacteriaceae</i>	DAI → EQ	Mensch	[224]

<sup>a</sup> DAI, Daidzein; DHD, Dihydrodaidzein; EQ, Equol; GEN, Genistein; 5-OHEQ, 5-Hydroxyequol.

Der überwiegende Teil der isolierten Equol-produzierenden Bakterienspezies gehört der Familie der *Coriobacteriaceae* an. Diese Familie scheint demzufolge eine zentrale Rolle im Equol-Metabolismus bei Säugern einzunehmen [255]. Die Bildung von 5-Hydroxyequol als Endprodukt der bakteriellen Genistein-Umsetzung wurde bisher in drei isolierten Stämmen nachgewiesen. Die humanen Darmbakterien *Slackia isoflavoniconvertens* und *Slackia equolifaciens* sowie das Maus-Isolat *Enterorhabdus mucosicola* setzen Genistein über Dihydrogenistein zu 5-Hydroxyequol um [40,94,140,141] (Abbildung 3).

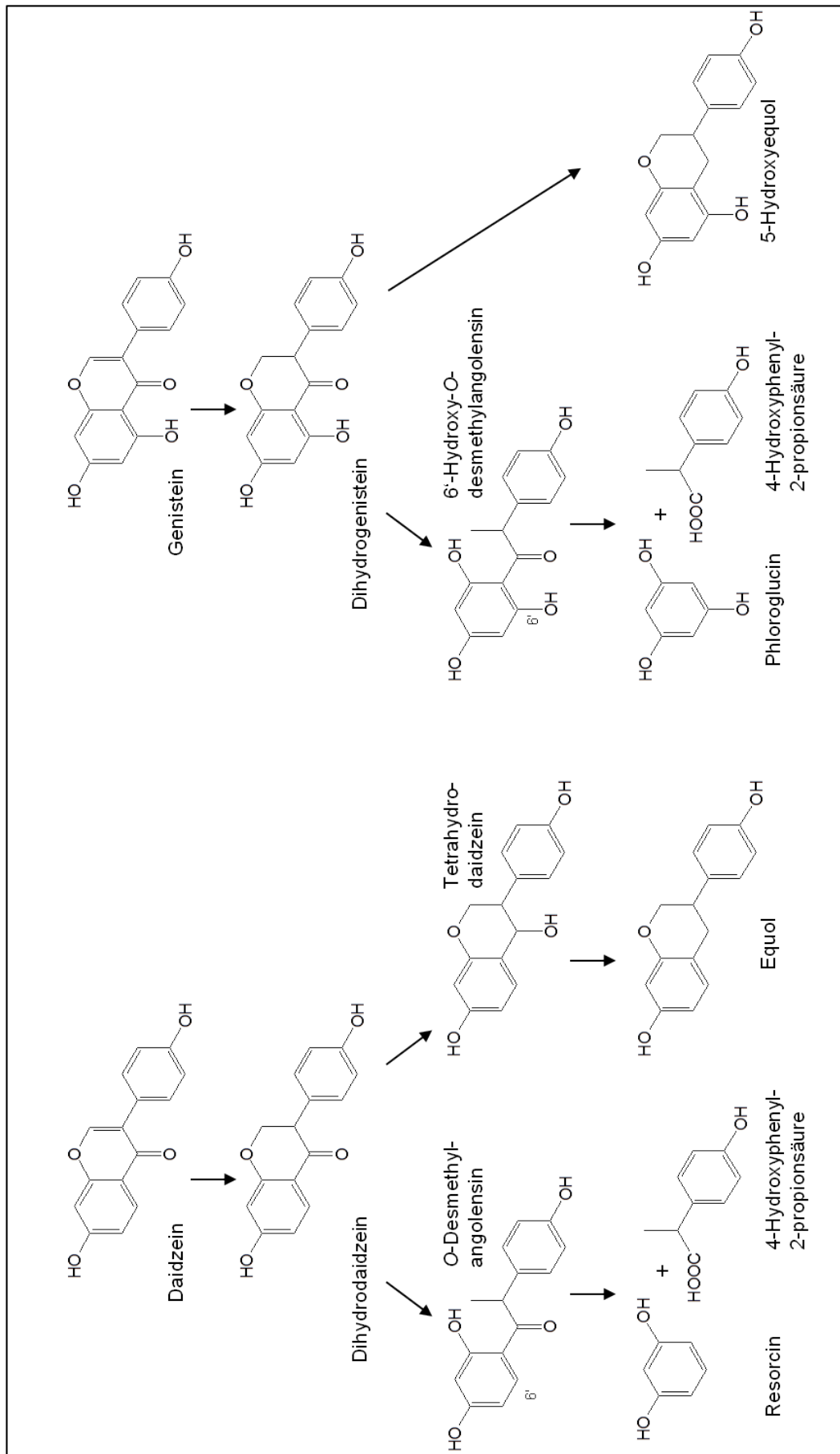


Abbildung 3: Umsetzungen von Daidzein und Genistein durch die intestinale Darmmikrobiota.

Neben Equol und 5-Hydroxyequol können alternative Abbauprodukte von Daidzein und Genistein durch einen zweiten bakteriellen Stoffwechselweg entstehen. Die Spaltung des heterozyklischen C-Rings führt zur Bildung von *O*-Desmethylangolensin bei der Daidzein-Umsetzung und zu 6'-Hydroxy-*O*-desmethylangolensin bei der Genistein-Umsetzung [95] (Abbildung 3). Durch die Abspaltung des dreiwertigen Phenols Phloroglucin wird das Intermediat 6'-Hydroxy-*O*-desmethylangolensin zu 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure abgebaut [43,44,95] (Abbildung 3). Die Ansicht, dass *O*-Desmethylangolensin aufgrund der fehlenden C6'-Hydroxygruppe nicht weiter abbaubar ist, wurde inzwischen widerlegt. Als einzig bekannte Spezies setzt der Bakterienstamm CG19-1 sowohl *O*-Desmethylangolensin als auch 6'-Hydroxy-*O*-desmethylangolensin um. Außerdem katalysiert der Stamm CG19-1 die Freisetzung von Daidzein aus Puerarin ohne den weiteren Abbau zu Dihydrodaidzein, Equol oder *O*-Desmethylangolensin [26].

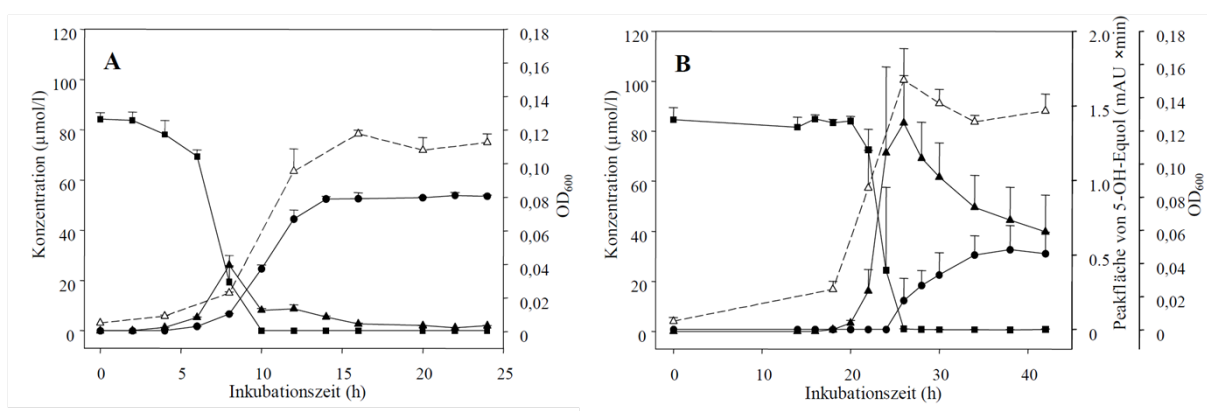
Beim Abbau von Daidzein bzw. Genistein zu den korrespondierenden Endprodukten ist in den bisher isolierten Bakterienstämmen immer nur ein Abbauweg möglich. So produzieren Equol-bildende Bakterien kein *O*-Desmethylangolensin und umgekehrt. Identifizierte *O*-Desmethylangolensin-produzierende Bakterien sind *Eubacterium ramulus* und *Clostridium* sp. Stamm HGH 136 [84,188]. Der Abbau von Genistein zu 4-Hydroxyphenyl-2-propionsäure wird gleichfalls von *E. ramulus* katalysiert [188].

Studien zeigen, dass ungefähr 80–95 % der Menschen *O*-Desmethylangolensin-produzierende Bakterien besitzen [7, 60, 100]. Abhängig von der individuellen Mikrobiota kann ein Mensch sowohl Equol- als auch *O*-Desmethylangolensin-Bildner sein [7, 9, 85]. Auch ist es möglich, nach sojareicher Ernährung ausschließlich Equol oder *O*-Desmethylangolensin auszuscheiden, oder keines von beiden [9, 62, 63, 183].

### 1.5.1 *Slackia isoflavoniconvertens*, eine Equol-synthetisierende Spezies

Das Equol-bildende Darmbakterium *S. isoflavoniconvertens* wurde aus der Fäzesprobe einer gesunden Frau isoliert. Es ist ein strikt anaerobes, stäbchenförmiges, nicht Sporenbildendes Bakterium. Die Gram-positiven Zellen der zur Familie der *Coriobacteriaceae* gehörenden Spezies sind paarweise oder in Ketten angeordnet. *S. isoflavoniconvertens* weist eine Arginin-Dihydrolase-Aktivität auf, welche zur Erhöhung der Zelldichte nach Zugabe von 1 % Arginin führt. Hinsichtlich der Verwertung von Zuckern weist *S. isoflavoniconvertens* asaccharolytische Eigenschaften auf [139, 140]. Unter anoxischen Wachstumsbedingungen setzt *S. isoflavoniconvertens* Daidzein zu Equol und Genistein zu 5-Hydroxyequol um. Innerhalb der exponentiellen Wachstumsphase wird Daidzein in Abhängigkeit von der Ausgangskonzentration vollständig über das Intermediat Dihydrodaidzein zu Equol umgesetzt (Abbildung 4 A).

Der Abbau von Genistein beginnt verzögert in der späten exponentiellen Wachstumsphase. Innerhalb kurzer Zeit wird Genistein zu Dihydrogenistein umgesetzt und anschließend 5-Hydroxyequol gebildet (Abbildung 4 B). Dabei erfolgt die Anreicherung des Intermediats Dihydrogenistein [139,140]. Auch wurde die Umsetzung von Daidzein und Genistein zu Equol und 5-Hydroxyequol *in vivo* beobachtet. Dazu wurden keimfreie Ratten mit *S. isoflavoniconvertens* und einer vereinfachten humanen Darmmikrobiota besiedelt und mit sojahaltiger Nahrung gefüttert. Die Umsetzungsprodukte Equol und 5-Hydroxyequol wurden anschließend in den Darminhalten, in Fäzes und im Urin detektiert [142]. Dies war der erste Nachweis, dass 5-Hydroxyequol durch ein Darmbakterium *in vivo* gebildet werden kann.



**Abbildung 4: Umsetzung von Daidzein und Genistein durch *S. isoflavoniconvertens* [139].**

(A) Daidzein, schwarze Quadrate; Dihydrodaidzein, schwarze Dreiecke; Equol, schwarze Kreise. (B) Genistein, schwarze Quadrate; Dihydrogenistein, schwarze Dreiecke; 5-Hydroxyequol (5-OH-Equol), schwarze Kreise (Peakflächen). Das bakterielle Wachstum (leere Dreiecke) ist als OD<sub>600</sub> an der rechten y-Achse dargestellt. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (SEM).

### 1.5.2 Die enzymatische Umsetzung von Daidzein und Genistein durch Equolproduzierende Bakterien

Die Umsetzung von Daidzein und Genistein durch Zellextrakte von *S. isoflavoniconvertens* oder *E. mucosicola* erfolgt nur unter strikt anoxischen Bedingungen. Ein in Gegenwart von Luftsauerstoff hergestellter Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* katalysiert die Umsetzung von Daidzein zu Dihydrodaidzein nicht [139]. Die Umsetzung der beiden Isoflavone ist sowohl im zellfreien System von *S. isoflavoniconvertens* als auch von *E. mucosicola* NADPH-abhängig [139]. Dass NADPH im Vergleich zu NADH der bevorzugte Elektrodendonator ist, zeigt auch die schnellere Umsetzung von Tetrahydrodaidzein zu Equol durch den Zellextrakt von *Eggerthella* sp. Stamm Julong 732 in Anwesenheit von NADPH [104]. Enzymatische Tests im zellfreien System von *A. celatus* AHU1763 zeigen ebenfalls die

Sauerstoffsensitivität und NADPH-Abhängigkeit der Enzyme mit Daidzein-umsetzender Aktivität [217]. Von großer Bedeutung für den bakteriellen Daidzein-Metabolismus scheint molekularer Wasserstoff zu sein. So führt die Inkubation einer Equol-bildenden Mischkultur aus vier Stämmen nur in Anwesenheit von mikrobiellem Wasserstoff zur Bildung von Equol. Enthält der Inkubationsansatz durch Zugabe von Palladium keinen molekularen Wasserstoff, ist die Umsetzung von Daidzein nicht mehr möglich, ohne dass das Zellwachstum beeinträchtigt wird [48]. Die Bildung von Equol durch *S. isoflavoniconvertens* wird gleichfalls durch Wasserstoff begünstigt. Zwar erfolgt die Umsetzung zu Equol auch unter einer Stickstoffatmosphäre, jedoch verschiebt sich das Verhältnis der Metabolite zugunsten von Equol bei steigender Wasserstoffkonzentration [139]. Neben den kurzkettigen Fettsäuren als Hauptprodukt wird Wasserstoff beim Abbau von Kohlenhydraten gebildet. Diese werden durch die gastrointestinale Mikrobiota im Dickdarm fermentiert [134]. Der Zusatz der kurzkettigen Fettsäuren Propionat und Butyrat erhöht in Anwesenheit von Wasserstoff die Bildung von Equol in einer Daidzein-umsetzenden Mischkultur [48]. Fermentationsexperimente mit der aus der Ratte isolierten Spezies *A. celatus* zeigen ebenfalls den positiven Effekt von Butyrat. So verbessern Butyrat als auch Arginin das bakterielle Wachstum und erhöhen dadurch die Bildungsrate von Equol um den fünffachen Wert [149].

Fermentationsexperimente mit *S. isoflavoniconvertens* und *E. mucosicola* zeigen, dass die Umsatzraten von Daidzein und Genistein in der stationären Wachstumsphase bis zu 12-fach bzw. 54-fach erhöht sind, wenn die Kulturen zuvor mit dem entsprechenden Isoflavon inkubiert werden [140, 141]. Dies verdeutlicht, dass die beteiligten Enzyme nicht konstitutiv exprimiert sind, sondern durch die Substrate induziert werden müssen. Interessanterweise erfolgt die Umsetzung von Genistein oder Dihydrogenistein auch nach Vorinkubation mit Daidzein. Demnach könnten die Umsetzungsreaktionen von Daidzein und Genistein durch die gleichen Enzyme katalysiert werden [141]. Weiter wurde die Induzierbarkeit eines Dihydrodaidzein reduzierenden Enzyms für *Eggerthella* sp. Stamm Julong 732 nachgewiesen. Nur nach Vorinkubation des Stammes mit Dihydrodaidzein katalysierte der Zellextrakt die Reduktion von Dihydrodaidzein zu (*S*)-Equol [104].

Wie in Abbildung 5 dargestellt, erfolgt die Umsetzung von Daidzein zu Equol in drei reduktiven Schritten. Aufgrund des asymmetrischen C3-Atoms können zwei Stereoisomere des Metaboliten Dihydrodaidzein bei der Umsetzung von Daidzein entstehen. Der aus Rinderpannen isolierte anaerobe Bakterienstamm Niu-O16 setzt sowohl Daidzein als auch Genistein zu einer racemischen Gemisch aus (*S*)- und (*R*)-Dihydrodaidzein bzw. Dihydrogenistein um [241]. Die Bildung des (*S*)-Enantiomers von Equol durch isolierte Bakterien wurde bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit für *Eggerthella* sp. Stamm Julong 732, *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *S. equolifaciens* (Stamm DZE) nachgewiesen [93, 94, 239, 255]. Anhand der Spezies *Eggerthella* sp. Stamm Julong 732 wurde die stereospezifische Umsetzung von Dihydrodaidzein zu (*S*)-Equol aufgeklärt [104, 105]. Durch

die Reduktion von Dihydrodaidzein entsteht ausschließlich  $(3S,4R)$ -Tetrahydrodaidzein als eines von vier möglichen Stereoisomeren. In einem weiteren Reaktionsschritt wird das Intermediat  $(3S,4R)$ -Tetrahydrodaidzein anschließend zu  $(3S)$ -Equol umgesetzt [105] (Abbildung 5).

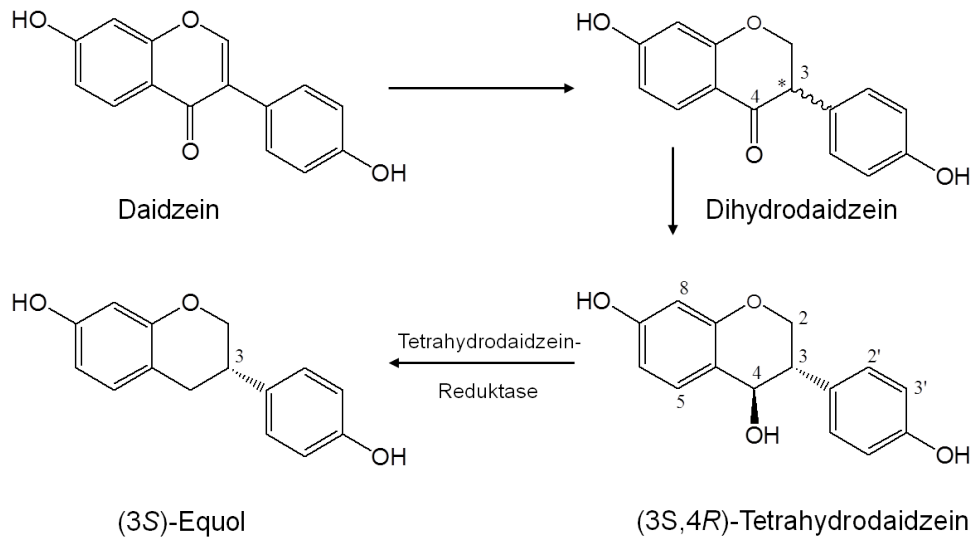


Abbildung 5: Enzymatische Umsetzung von Daidzein über Dihydrodaidzein und  $(3S,4R)$ -Tetrahydrodaidzein zu  $(3S)$ -Equol durch *Eggerthella* sp. Stamm Julong 732 [105].

## 1.6 Zielstellung

Die Metabolisierung der Isoflavone Daidzein und Genistein durch die intestinale Mikrobiota als auch die damit einhergehende Bioaktivierung war lange unzureichend erforscht. Während der letzten Jahre wurden mehrere Daidzein-metabolisierende und damit auch Equol-produzierende Bakterien aus dem Darmtrakt von Mensch und Tier isoliert und identifiziert. Die Enzymologie der bakteriellen Reduktion von Daidzein und Genistein ist bisher jedoch noch wenig erforscht.

Ziel dieser Arbeit war daher die Identifizierung und Charakterisierung der unbekanntenen Isoflavon-reduzierenden Enzyme. Dazu wurde das humane Darmbakterium *Slackia isoflavoniconvertens* verwendet, welches im Rahmen einer früheren Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe der Gastrointestinalen Mikrobiologie isoliert wurde. Im Zuge der Identifizierung Daidzein-umsetzender Enzyme sollte gleichfalls die Organisation der kodierenden Gene aufgeklärt werden. Auf dieser Grundlage erfolgte die funktionelle Expression der identifizierten Enzyme in *Escherichia coli* und die Reinigung der rekombinanten Enzyme mittels Affinitätschromatographie. Die gereinigten Daidzein-umsetzenden Proteine sollten chemisch-analytisch charakterisiert werden unter Bestimmung der möglichen Kofaktoren. Weiter sollten experimentelle Analysen zur Aufklärung der Genexpression in Bezug auf die transkriptionelle Genregulation Daidzein-umsetzender Enzyme erfolgen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

Die Anzucht und Handhabung anaerober Bakterienkulturen erfolgte in sauerstofffreien 16 ml-Hungate-Röhrchen (Ochs, Bovenden) und 100–1000 ml Septumflaschen (Ochs, Bovenden). Als gasdichte Verschlüsse dienten Stopfen und Septen aus Kautschuk oder Butylgummi. Mittels einer Vakuumpumpe (Vakubrand, Wertheim) und 1–2 Kanülen wurden die nur bis zur Hälfte mit Medium gefüllten Gefäße mit einem sauerstofffreien Gasgemisch unter Schütteln evakuiert und anschließend begast. Dieser Vorgang erfolgte dreimal. Anschließend wurden alle Gefäße 15 min bei 121 °C autoklaviert. Das Wachstum der bei 37 °C stehend inkubierten Kulturen wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, München).

#### *Slackia isoflavoniconvertens*

Die Stammhaltung von *S. isoflavoniconvertens* (DSM 22006) erfolgte in 16 ml-Hungate-Röhrchen mit reduziertem BHI-Medium und einer Atmosphäre aus H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v). Wöchentlich wurde die Stammkultur überimpft, maximal 24 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur gelagert. Die Identität und Reinheit des Stammes wurde in regelmäßigen Abständen durch eine mikroskopische Untersuchung nach Gram-Färbung überprüft sowie durch 16S rRNA-Gensequenzierung.

Zur Kultivierung von *S. isoflavoniconvertens* wurden 500 ml-Septumflaschen mit BHI-Medium oder GAM-Medium mit 1 % Arginin verwendet. Das Beimpfen der Hauptkultur erfolgte 2%ig mit einer über Nacht in BHI-Medium gewachsenen Vorkultur. Zusätzlich enthielten induzierte Kulturen eine in Dimethylsulfoxid (DMSO; Merck, Darmstadt) gelöste Stammlösung (40 mM) an Daidzein (600 µl; Acros Organics, Geel, Belgien). Nicht induzierte Kulturen wurden mit der äquivalenten Menge an DMSO versetzt. Die Zellernte erfolgte nach einer Inkubationszeit von ca. 20 h (OD<sub>600</sub>-Wert 0,1–0,2).

#### BHI-Medium (reduziert)

<i>Brain heart infusion broth</i> (Roth, Karlsruhe)	37 g
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat (Roth)	0,5 g
Resazurin-Natriumsalz-Stammlösung (1 mg/ml) (Roth)	1 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml



<u>GAM-Medium (reduziert)</u>	
<i>Gifu anaerobic medium broth</i>	41,7 g
(Nissui Pharmaceutical, Tokio, Japan)	
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat (Roth)	0,5 g
Resazurin-Natriumsalz-Stammlösung (1 mg/ml) (Roth)	1 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml

### ***Escherichia coli* JM109**

Die Kultivierung transformierter *E. coli* JM109-Zellen (Promega, Mannheim) erfolgte in LB-Medium (Lennox) mit Carbenicillin (100 µg/ml; Roth, Karlsruhe). Für die anaerobe Kultivierung enthielt das Medium zusätzlich L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat (0,5 g/l) und Resazurin-Natriumsalz-Stammlösung (1 ml/l). Als Atmosphäre diente ein Gasgemisch aus N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v). Eine kurzfristige Lagerung (ca. 4 Wochen) der *E. coli*-Klone erfolgte auf LB-Agarplatten. Dazu wurde LB-Agar (Lennox) mit Carbenicillin (100 µg/ml; Roth, Karlsruhe), Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) (120 µg/ml; Roth) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) (80 µg/ml; GeneOn, Ludwigshafen) versetzt. Die Platten wurden 20 h bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 4 °C aufbewahrt. Zur dauerhaften Lagerung der Klone wurde 1 ml einer frischen LB-Kultur mit 600 µl Glycerin (80 %, v/v) in Stammhaltungsröhrchen vermischt und anschließend bei -80 °C gelagert.

### ***Escherichia coli* KRX**

Transformierte *E. coli* KRX-Zellen (Promega, Mannheim) wurden in TB-Medium mit Carbenicillin (50 µg/ml; Roth) angezogen. Für die anaerobe Kultivierung enthielt das Medium zusätzlich L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat (0,5 g/l) und ein Gasgemisch aus N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80:20, v/v). Die Stammhaltungsbedingungen erfolgten wie für *Escherichia coli* JM109 beschrieben. Davon abweichend enthielten die LB-Agarplatten Carbenicillin (50 µg/ml), IPTG (120 µg/ml; Roth) und X-Gal (40 µg/ml; GeneOn, Ludwigshafen).

<u>4,45 M Kaliumphosphat</u>	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth)	23,1 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck)	125,4 g
Aqua bidest	ad 1000 ml
Steril filtriert (0,2 µm; Millipore, Billerica, USA)	

Terrific Broth (TB)-Medium

Trypton (Merck, Darmstadt)	12 g
Hefeextrakt (Merck)	24 g
Glycerin (Roth, Karlsruhe)	4 ml
Aqua bidest	ad 980 ml
Nach dem Autoklavieren:	
4,45 M Kaliumphosphat	20 ml

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus *Slackia isoflavoniconvertens*

Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*, DNA) wurde aus 10 ml einer Über-Nacht-Kultur mit dem RTP Bacteria Mini Kit (Invitex, Berlin) gemäß Herstellerangaben extrahiert. Nach Elution der genomischen DNA mit 50 µl PCR-Wasser (Fisher Scientific, Schwerte) wurde die Konzentration spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt (Nano-Drop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Die isolierte DNA lagerte bei 4–8 °C.

### 2.2.2 Amplifizierung von Genfragmenten mittels PCR

Auf der Basis von ermittelten Peptidsequenzen der durch Daidzein induzierten Proteine wurden zehn degenerierte Oligonukleotidprimer abgeleitet (Tabelle 2). Dies erfolgte jeweils in beiden Orientierungen als *Forward* (F) und *Reverse Primer* (R) mittels des typischen Codongebrauchs von *Slackia heliotrinireducens* (DSM 20476). Die Amplifizierung spezifischer DNA-Bereiche erfolgte mit der Polymeraseketten-Reaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR). Dazu wurden alle degenerierten Primer in verschiedenen Ansätzen miteinander kombiniert und die optimale Temperatur für die Primerhybridisierung ermittelt. Ein PCR-Ansatz (25 µl) enthielt 1 x *DreamTaq Green Buffer*, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM jedes Desoxynukleosidtriphosphats (dNTP), 0,2 µM von jedem Primer, 2,5 U *DreamTaq* DNA Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und 0,5 µl genomische DNA (ca. 25 ng) von *S. isoflavoniconvertens*. Die Amplifizierung erfolgte im Thermocycler (MBS 0.2G; Fisher Scientific, Schwerte) mit folgendem Programm: Denaturierung bei 95 °C für 3 min; 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 1 min, Primeranlagerung für 1 min, Polymerisation bei 72 °C für 5 min; Polymerisation bei 72 °C für 10 min.

**Tabelle 2: Verwendete Oligonukleotidprimer, deren Ableitung aus Peptidsequenzen der durch Daidzein induzierten Proteine erfolgte.**

Protein-Spot <sup>a</sup>	Peptidsequenz	Primer	Sequenz (5' → 3') <sup>b</sup>
5	YADELKAK	DR1F	TACGCSGACGARCTSAAGGCSAA
		DR1R	CTTSGCCTTSAGYTCGTCSGCGTA
	PEEDRQK	DR2F	CCSGARGARGACCGBCAGAA
		DR2R	CTTCTGVCGGTCTCYTCYTCSSG
3	VNNDPE	DR3F	G TSAACAACGACCCSGARGC
		DR3R	G CYTCSGGGTCTGTTGTTTAC
	TNAEGEG	DR4F	ACSAACGCSGARGGCGARGG
		DR4R	GCCYTCGCCYTCSSGCGTTSGT
2	DVQKCCLNV	DR5F	GACGTSCAGAAGTGCTGCCTSAACGT
		DR5R	ACGTTSAGGCAGCACTTCTGSACGTC

<sup>a</sup> Die Zahlen entsprechen den nummerierten Proteinen im 2D-DIGE-Gel (Abbildung 6).

<sup>b</sup> Die Synthese der Oligonukleotidprimer erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

Zur Größenbestimmung wurden die Amplifikate und ein DNA-Größenstandard (1 kb *Ladder*, Life Technologies, Darmstadt) auf ein 1%iges (w/v) Agarosegel aufgetragen. Zu- vor wurden die Ansätze 4:1 mit Probenladungspuffer vermengt. Die Auftrennung der DNA erfolgte in einer Gelelektrophorese-Laufkammer (Agagel Mini, Biometra, Göttin- gen) bei 85 V für ca. 1 h. Zum Sichtbarmachen der DNA wurde das Gel 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt. Dieses wurde mit 200 ml 1 x TAE-Puffer und 60 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml; Roth, Karlsruhe) angesetzt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht (UV-Transilluminator Chemi Doc, Bio-Rad, München).

#### 1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer

Tris (Roth, Karlsruhe)	40 mM
Essigsäure (Roth)	20 mM
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Roth)	1 mM

#### Probenladungspuffer für Agarosegele

Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,1 % (w/v)
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Roth)	100 mM
Tris (Roth)	10 mM
Glycerin (Roth)	50 % (v/v)

### 2.2.3 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Isolierung amplifizierter DNA wurde der PCR-Ansatz auf ein 1%iges *Low Melting* Agarosegel (Agarose Super LM, Roth, Karlsruhe) aufgetragen. Nach der gelelektrophoretischen Trennung bei 50 V für 2 h wurde das Gel in Ethidiumbromid angefärbt (Kapitel 2.2.2) und die DNA-Bande ausgeschnitten. Die Extraktion der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit dem innuPREP Doublepure Kit (Biometra, Göttingen) gemäß Herstellerangaben. Die eluierte DNA gleicher PCR-Ansätze wurde vereinigt und in einem zweiten Reinigungsschritt mit dem innuPREP Doublepure Kit konzentriert. Die DNA-Konzentration wurde spektrophotometrisch bei 260 nm ermittelt (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen).

### 2.2.4 Herstellung von *Escherichia coli*-Klonen

#### DNA-Ligation

Die Ligation des PCR-Produkts in einen Plasmid-Vektor wurde mit dem pGEM-*T Easy Vector System* (Promega, Madison, USA) durchgeführt. Dazu wurden 3 µl PCR-Produkt mit 5 µl 2 x *Rapid Ligation Buffer*, 1 µl pGEM-*T Easy Vector* (50 ng) und 1 µl T4 DNA Ligase (3 Weiss *units*) vermischt. Der Ligationsansatz wurde 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

#### Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Zur Transformation kompetenter *E. coli* JM109-Zellen bzw. *E. coli* KRX-Zellen (Promega, Madison, USA) wurden 2 µl des pGEM-*T Easy Vector*-Ligationsansatzes mit 50 µl der kompetenten Zellen vermischt. Im Anschluss wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert und durch einen Hitzeschock bei 42 °C transformiert (45–50 s für *E. coli* JM109, 15–20 s für *E. coli* KRX). Nach einem weiteren Inkubationsschritt auf Eis für 2 min wurde die Zellsuspension mit SOC-Medium (900 µl für *E. coli* JM109, 450 µl für *E. coli* KRX) versetzt und 90 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB (Lennox)-Agarplatten (Kapitel 2.1) unverdünnt sowie 1:10 und 1:100 verdünnt ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte 20 h bei 37 °C. Positiv transformierte *E. coli*-Zellen wurden anhand der Blau-Weiß-Selektion identifiziert. Dabei enthalten nur weiß eingefärbte Klone das gewünschte Insert. Wurde der Klonierungsvektor ohne Insert aufgenommen, kann der Farbstoff X-Gal durch eine im Vektor kodierte Galactosidase umgesetzt werden und die Klone erscheinen blau.

SOC-Medium, pH 7,0

Trypton (Merck, Darmstadt)	8 g
Hefeextrakt (Merck)	2 g
1 M NaCl (Roth, Karlsruhe)	4 ml
1 M KCl (Roth)	1 ml
Aqua bidest	ad 380 ml, autoklavieren
2 M Mg <sup>2+</sup> -Stammlösung, sterilfiltriert	4 ml
2 M D-Glucose (Roth), sterilfiltriert	4 ml
Aqua bidest (steril)	ad 400 ml

2 M Mg<sup>2+</sup>-Stammlösung

MgCl <sub>2</sub> Hexahydrat (Roth)	20,3 g
MgSO <sub>4</sub> Heptahydrat (Roth)	24,7 g
Aqua bidest	ad 100 ml

**2.2.5 Plasmid-Präparation**

Rekombinante *E. coli*-Klone wurden über Nacht in 5 ml LB-Medium (Lennox) mit Carbenicillin (100 µg/ml für *E. coli* JM109, 50 µg/ml für *E. coli* KRX) bei 37 °C inkubiert. Die Präparation erfolgte mit dem innuPREP Plasmid Mini Kit (Biometra, Göttingen) nach Herstellerangaben. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen).

**2.2.6 Inverse PCR**

Die flankierenden Bereiche von bereits bekannten Genfragmenten wurden durch die inverse PCR identifiziert [162]. Dabei waren die zur DNA-Sequenz homologen Oligonukleotidprimer in entgegengesetzte Richtung orientiert. Die genomische DNA von *S. isoflavoniconvertens* wurde mit dem Restriktionsenzym *SphI* nach Herstellerangaben verdaut (FastDigest; Fermentas, St. Leon-Rot). Die verdaute DNA wurde mit dem innuPREP PCR Pure Kit (Biometra, Göttingen) gereinigt und die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt. Für die Zirkularisierung der Restriktionsfragmente wurden 400 ng DNA in einem 40 µl-Ansatz nach Herstellerangaben mit einer T4 DNA Ligase (NEB, Frankfurt am Main) über Nacht bei 16 °C inkubiert. Zur Reinigung wurde die DNA durch Zugabe von 4 µl 3 M Natriumacetat und 100 µl eiskaltem Ethanol gefällt, bei -20 °C für 20 min inkubiert und abzentrifugiert (16.000 g, 4 °C, 20 min). Die präzi-

pitierete DNA wurde in 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl PCR-Wasser aufgenommen. Der PCR-Ansatz (25 µl) enthielt 1 x *LongAmp Taq reaction buffer*, 0,3 mM jedes Desoxynukleosidtriphosphats (dNTPs), 0,4 µM von jedem Primer, 2,5 U *LongAmp Taq* DNA Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) und 4 µl des gereinigten Ligationsansatzes. Für die Amplifizierung wurde das Primerpaar 4 (Tabelle 7, Anhang) eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte in einem PCR-Thermocycler mit folgendem Programm: Denaturierung bei 94 °C für 30 s; 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Primeranlagerung bei 55 °C für 1 min, Polymerisation bei 65 °C für 7 min; Polymerisation bei 65 °C für 10 min. Die PCR-Produkte wurden aus dem Agarosegel gereinigt, mit dem pGEM-*T Easy Vector System* in *E. coli* JM109 kloniert und sequenziert (Kapitel 2.2.3–2.2.5). Sich anschließende inverse PCR-Experimente erfolgten mit den Restriktionsenzymen *FspI*, *Sall*, *SapI*, *EcoRI*, *PstI* (FastDigest; Fermentas, St. Leon-Rot) und *BsgI* (NEB, Frankfurt am Main). Die Sequenzen der dafür genutzten Oligonukleotid-Primerpaare 5–10 (Tabelle 7, Anhang) basierten auf den jeweils zuvor identifizierten DNA-Bereichen.

### 2.2.7 Isolation der Gesamt-RNA aus *Slackia isoflavoniconvertens*

Die Extraktion der Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) wurde mit dem Nucleo Spin RNA II Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben mit einigen Modifizierungen durchgeführt. Um einen Verdau der RNA durch RNasen zu verhindern, wurden alle Schritte auf Eis durchgeführt, RNase-freie Lösungen verwendet und selbst hergestellte Lösungen mit 0,1 % (v/v) DEPC (Diethylidicarbonat; Roth, Karlsruhe) angesetzt. Zusätzlich wurden RNase-freie Reaktionsgefäße und Spitzen verwendet. Die Inaktivierung von RNasen auf zusätzlichen Materialien und genutzten Geräten erfolgte durch Behandlung mit *RNase away* (Roth, Karlsruhe). Für die Kultivierung von *S. isoflavoniconvertens* wurde eine Septumflasche mit 50 ml BHI-Medium verwendet, die mit 3,5 ml einer Über-Nacht-Kultur angeimpft wurde. Zusätzlich enthielt das Medium 500 µl 20 mM Daidzein (induzierte Kultur) oder 500 µl DMSO (nicht induzierte Kultur). Die Zellernte erfolgte in der exponentiellen Wachstumsphase nach 10 h Inkubation bei 37 °C. Die Kultur wurde bei 11.300 g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert und das Zellpellet eines halben Inkubationsansatzes in 500 µl Lysis-Puffer resuspendiert. Der Aufschluss der Zellen wurde wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Zur Erhöhung der Reinheit und Ausbeute wurde beim zweiten Waschschrift das Volumen von 200 µl auf 600 µl erhöht. Zusätzlich wurde ein zweiter Elutionsschritt eingeführt, wobei das erste Eluat ein weiteres Mal auf die Säule aufgetragen wurde. Die Inkubationszeit wurde von 5 min auf 10 min verlängert. Zudem entfiel der DNA-Verdau mit der im Kit enthaltenen rDNase, da der vollständige Verdau von genomischer DNA nicht erzielt wurde. Alternativ erfolgte der DNA-Verdau

im Anschluss an die RNA-Isolation mit dem Ambion Turbo DNA-free Kit (Life Technologies, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Mittels PCR (Kapitel 2.2.2) und spezifischen Primern für ein beliebiges, durch Daidzein induziertes Gen von *S. isoflavoniconvertens* (Tabelle 7, Anhang) wurde die isolierte RNA auf Kontamination durch genomische DNA überprüft. Die Konzentration der RNA wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen). Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bei -80 °C.

### 2.2.8 RNA-Gelelektrophorese

Die Kontrolle der RNA-Qualität erfolgte anhand der 16S und 23S rRNA-Banden, welche bei Intaktheit der RNA deutlich im Gel erkennbar waren. Dazu wurde ein RNA-Aliquot (1 µg) mit dem gleichen Volumen an RNA 2 x *Loading Dye* (Fisher Scientific, Schwerte) versetzt, 15 min bei 70 °C denaturiert und auf ein 1%iges (w/v) denaturierendes Agarosegel aufgetragen. Als Laufpuffer diente mit 0,1 % (v/v) DEPC hergestellter 1 x MOPS-Puffer. Die Trennung der RNA erfolgte in einer Gelelektrophorese-Laufkammer (Agagel Mini, Biometra, Göttingen) bei 32 V für ca. 4 h. Zum Sichtbarmachen der RNA wurde das Gel 30 min in einem Ethidiumbromid-Bad gefärbt. Dieses wurde aus 200 ml 0,1 % (v/v) DEPC und 60 µl Ethidiumbromid-Lösung (1 mg/ml, Roth, Karlsruhe) angesetzt. Die Detektion erfolgte mittels UV-Licht (UV-Transilluminator Chemi Doc, Bio-Rad, München).

#### 10 x MOPS-Puffer, pH 7,0

MOPS (Roth)	200 mM
Natriumacetat (Roth)	50 mM
EDTA (Roth)	20 mM

#### Denaturierendes Agarosegel (1 %, w/v)

<i>Top Vision</i> Agarose (Fisher Scientific, Schwerte)	0,5 g
0,1 % (v/v) DEPC (Roth)	42,5 ml
10 x MOPS-Puffer	5 ml
37 % (v/v) Formaldehyd (Roth)	2,5 ml

### 2.2.9 Subklonierung von Daidzein-induzierten-Genen in *Escherichia coli*

#### pGEM-*T Easy*-Expressionsplasmide

Zur Funktionsaufklärung identifizierter Gene wurden diese mit dem pGEM-*T Easy Vector System* in *E. coli* als Expressionssystem kloniert. Die Amplifizierung der zu untersuchenden Gene erfolgte durch PCR mit der *LongAmp Taq* DNA Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) (Kapitel 2.2.6) und 1 µl genomischer DNA von *S. isoflavoniconvertens*. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotid-Primerpaare 11–13 sind in Tabelle 7 aufgeführt (Anhang). Nach gelelektrophoretischer Trennung wurden die PCR-Produkte aus dem Agarosegel isoliert, in den pGEM-*T Easy Vector* ligiert und die kompetenten *E. coli*-Zellen mit der Plasmid-DNA transformiert (Kapitel 2.2.3–2.2.5).

#### Affinitäts-*tag*-Expressionsplasmide

Um heterolog exprimierte Proteine mittels Affinitätschromatographie reinigen zu können, wurden diese genetisch an das *Strep*(II)-Peptid (bestehend aus den Aminosäuren WSH-PQFEK, auch *Strep-tag*) fusioniert. Die verwendeten pPSG-Expressionsplasmide wurden nach dem Prinzip des kombinatorischen Klonierens mit Hilfe des *StarGate*-Systems (*StarGate Combi Entry Reagent Set* und *StarGate Transfer Reagent Set*; IBA, Göttingen) erzeugt. Mit Hilfe der Software *StartPrimer D'Signer* wurden die entsprechenden Primersequenzen ausgewählt. Die PCR-Reaktionsansätze mit der *LongAmp Taq* DNA Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt (Kapitel 2.2.6). Als Matrize diente dabei die genomische DNA von *S. isoflavoniconvertens* oder ein genspezifisches pGEM-*T Easy*-Expressionsplasmid (5 ng). Die für die einzelnen Gene eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaare 14–26 sind in Tabelle 7 (Anhang) aufgeführt. Das PCR-Programm war: Denaturierung bei 94 °C für 30 s; 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Primeranlagerung für 1 min, Polymerisation bei 65 °C für 5 min; Polymerisation bei 65 °C für 10 min. Bei Verwendung von Plasmiden als Matrize wurde die Zyklenzahl auf 20 herabgesetzt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden aus einem 1%igen (w/v) Agarosegel gereinigt (Kapitel 2.2.3) und zur Generierung von Donorvektoren mit dem Vektor pENTRY-IBA51 ligiert. Nach Transformation von kompetenten *E. coli* Top10-Zellen wurde der Donorvektor extrahiert (Kapitel 2.2.5) und zur Generierung des spezifischen Zielvektors verwendet. Dabei wurde das Insert kombinatorisch vom Donorvektor zum *Strep-tag*-kodierenden (*C*-terminal) Akzeptorvektor pPSG-IBA3 transferiert. Der so entstandene Zielvektor wurde in den Expressionswirt *E. coli* KRX transformiert (Kapitel 2.2.4). Zusätzlich zum *C*-terminalen *Strep-tag* erfolgte die Fusion der Gene an ein His-*tag* (bestehend aus sechs Histidinresten), GST (Glutathion-S-Transferase)-*tag* und FLAG-*tag* (bestehend aus den Aminosäuren DYKDDDDDK). Die verwendeten Ak-



zeptorvektoren waren pPSG-IBA25 (*N*-terminales GST-*tag*), pPSG-IBA35 (*N*-terminales His-*tag*), pPSG-IBA65 (*N*-terminales FLAG-*tag*) und pPSG-IBA5 (*N*-terminales *Strep-tag*).

### 2.2.10 Heterologe Genexpression in *Escherichia coli*

#### *Escherichia coli* JM109

Die Kultivierung von *E. coli* JM109-Klonen erfolgte aerob als auch anaerob (Kapitel 2.1). Eine aerobe Vorkultur wurde in 5 ml LB-Medium (Lennox) mit 100 µg/ml Carbenicillin schüttelnd über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Hauptkultur wurde 1%ig mit der Vorkultur beimpft. Bei anaerober Kultivierung erfolgte die Anzucht der Vorkultur im 10 ml-Hungate-Röhrchen. Die in Septumflaschen inkubierte Hauptkultur wurde mit der Vorkultur 2%ig beimpft und bei 37 °C bzw. 25 °C kultiviert. Nach der Zugabe von 0,5 mM IPTG wurde die Expression der klonierten Gene induziert. Zur Überprüfung der Expressionsstärke wurden Kulturen parallel mit und ohne IPTG-Induktion inkubiert. Die Induktion erfolgte bei aeroben Kulturen nach Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,6 und bei anaerober Kultivierung 3 h nach Inokulation der Hauptkultur. Das Ernten der Zellen sowie der Zellaufschluss fand unter oxischen als auch anoxischen Bedingungen statt (Kapitel 2.3.1). Zur Überprüfung der heterologen Genexpression wurden die Zellextrakte nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert.

#### *Escherichia coli* KRX

Die Anzuchtsbedingungen von *E. coli* KRX-Zellen zur heterologen Genexpression ähnelten denen der *E. coli* JM109-Klone. Für die aerob oder anaerob inkubierten Ansätze wurde jedoch TB-Medium mit 50 µg/ml Carbenicillin und 87 mM Kaliumphosphat verwendet (Kapitel 2.1). Die heterologe Genexpression begann nach Induktion des T7 RNA Polymerase-Gens mit 0,1 % L-Rhamnose (w/v; Promega, Madison, USA). Die Induktion erfolgte bei aeroben Kulturen nach Erreichen der OD<sub>600</sub> von 0,8–1,0 und bei anaerober Kultivierung 3 h nach Inokulation der Hauptkultur. Für die weitere Kultivierung der Hauptkultur wurde die Inkubationstemperatur von 37 °C auf 20–25 °C gesenkt. Nach Aufschluss der geernteten Zellen und Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die heterologe Genexpression mittels SDS-PAGE überprüft.

### 2.2.11 Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse

Die Synthese von komplementärer DNA (*complementary* DNA, cDNA) wurde mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fisher Scientific, Schwerte) nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Herstellung des Reaktionsansatzes wurden 1 µg der aus *S. isoflavoniconvertens* isolierten RNA, 1 µl *Random Hexamer Primer* (100 µM) und RNase-freies Wasser zu einem Gesamtvolumen von 12 µl vereinigt. Aufgrund des hohen GC-Gehalts des RNA-Templates und zur Denaturierung eventuell gebildeter Sekundärstrukturen wurde der Reaktionsansatz für 5 min auf 65 °C erhitzt und im Anschluss auf Eis gekühlt. Der Reaktionsansatz wurde durch das Hinzugeben folgender Kit-Komponenten vervollständigt: 4 µl 5 x *Reaction Buffer*, 1 µl *RiboLock RNase Inhibitor* (20 U/µl), 2 µl dNTP Mix (10 mM), 1 µl *RevertAid H Minus M-MuLV* Reverse-Transkriptase (200 U/µl). Im Folgenden wurde der Ansatz nacheinander 5 min bei 25 °C, 60 min bei 45 °C und 5 min bei 70 °C im Thermoblock inkubiert. Die synthetisierte cDNA diente als Matrize für die Amplifizierung intergener cDNA-Bereiche durch PCR (Primerpaare 37–52, Tabelle 7, Anhang). Die Amplifizierung mit der *LongAmp Taq* DNA Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) wurde in Abhängigkeit von der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts und der spezifischen Hybridisierungstemperatur des verwendeten Primerpaares durchgeführt (Kapitel 2.2.6). Die gelelektrophoretische Analyse der PCR-Ansätze sowie Färbung des Gels und Detektion erfolgte wie unter Kapitel 2.2.2 beschrieben.

### 2.2.12 Bestimmung der Position von Transkriptionsstarts

Zur Identifizierung des 5'-Endes eines bakteriellen mRNA-Transkripts wurde die Methode ARF-TSS (engl. *Adaptor- and radioactivity-free identification of transcription start sites*) angewandt [237]. Im ersten Schritt, der cDNA-Synthese, wurde ein für das zu untersuchende Gen spezifischer Oligonukleotidprimer verwendet, welcher am 5'-Ende phosphoryliert war. Die Synthese der cDNA (Kapitel 2.2.11) erfolgte unter Verwendung eines phosphorylierten *Reverse Primers* (20 pmol/µl) statt des im Kit enthaltenen *Random Hexamer Primers*. Der cDNA-Ansatz wurde nach Zugabe aller Komponenten nacheinander 60 min bei 45 °C und 5 min bei 70 °C im Thermoblock inkubiert. Zur Reinigung der cDNA wurde der Ansatz mit 20 µl 1 M NaOH versetzt, für 30 min bei 65 °C inkubiert und erneut mit 20 µl 1 M NaOH verdünnt. Nach Bindung an eine Säule (innuPREP Doublepure Kit, Biometra, Göttingen) wurde die cDNA mit 40 µl Elutionspuffer eluiert. Die Ligation der cDNA-Enden fand durch Inkubation mit der T4 RNA Ligase 1 (NEB, Frankfurt am Main) über Nacht bei 16 °C gemäß Herstellerangaben statt. Die Amplifizierung mit der *LongAmp Taq* DNA Polymerase (NEB, Frankfurt am Main) erfolgte mit den Primerpaa-

ren 33–36 (Tabelle 7, Anhang) mit folgendem Thermocycler-Programm: Denaturierung bei 94 °C für 30 s; 30 Zyklen aus Denaturierung bei 94 °C für 30 s, Primeranlagerung für 60 s, Polymerisation bei 65 °C für 60 s; Polymerisation bei 65 °C für 10 min. Die verwendeten PCR-Komponenten wurden in Kapitel 2.2.6 beschrieben. Nach gelelektrophoretischer Trennung und Anfärbung des Agarosegels wurde das PCR-Produkt aus dem Gel extrahiert und mittels des pGEM-T *Easy Vector Systems* in *E. coli* JM109 kloniert (Kapitel 2.2.3 und 2.2.4). Nach Extraktion der Plasmid-DNA (Kapitel 2.2.5) wurden die Inserts von mindestens zehn verschiedenen Klonen sequenziert.

### 2.2.13 Northern-Blot-Analyse

#### Herstellung von Digoxigenin-markierten DNA-Sonden

Für die Detektion von spezifischen mRNA-Transkripten wurden DNA-Sonden mit einer Länge zwischen 404 und 471 bp amplifiziert. Die Markierung der Sonden erfolgte durch den Einbau eines Desoxyuridintriphosphats (dUTP), welches an das Steroid Digoxigenin (DIG) gekoppelt war. Zur Herstellung der DIG-dUTP-markierten Sonden wurde das *PCR DIG Probe Synthesis Kit* nach Herstellerangaben verwendet (Roche, Mannheim). Für die genspezifischen PCR-Ansätze wurden die Primerpaare 26–32 verwendet (Tabelle 7, Anhang). Ein PCR-Ansatz (25 µl) enthielt 1 x *PCR Buffer* (mit MgCl<sub>2</sub>), je 200 µM von dCTP, dGTP und dATP, 165 µM dTTP, 35 µM DIG-dUTP, 500 µM von jedem Primer, 1,4 U *Enzyme Mix* und 0,5 µl genomische DNA von *S. isoflavoniconvertens*. Die Amplifizierung erfolgte mit folgendem Programm: Denaturierung bei 95 °C für 2 min; 30 Zyklen aus Denaturierung bei 95 °C für 30 s, Primeranlagerung bei 60 °C für 30 s, Polymerisation bei 72 °C für 40 s; Polymerisation bei 72 °C für 7 min. Die gelelektrophoretische Trennung der amplifizierten DIG-dUTP-markierten DNA-Sonden erfolgte in einem 2,5%igen (w/v) Agarosegel. Das Anfärben und die Detektion von DNA-Banden wurde in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Die Konzentration der DNA-Sonden von ca. 450 ng/µl wurde spektrophotometrisch bei 260 nm bestimmt (NanoDrop ND-1000, Peqlab Biotechnologie, Erlangen).

#### Blotting

Die für die *Northern-Blot-Analyse* benötigte RNA-Menge von 5 µg wurde auf ein 1%iges (w/v) denaturierendes Agarosegel aufgetragen (Kapitel 2.2.8). Dazu wurden die RNA-Proben mit dem 2-fachen Volumen an RNA-Ladungspuffer bei 65 °C für 10 min denaturiert. Zur späteren Bestimmung der Transkriptgröße wurde zusätzlich ein Digoxigenin-markierter Größenstandard aufgetragen (*RNA Molecular Weight Marker I*; Roche, Mannheim), welcher mit dem 4-fachen Volumen an RNA-Ladungspuffer vermischt und bei 65 °C

für 15 min denaturiert wurde. Zur Vermeidung von Kontaminationen durch nicht RNase-freies Glycerin wurde der RNA-Ladungspuffer ohne Glycerin hergestellt. Dazu wurden die Proben auf ein noch nicht mit 1 x MOPS-Puffer bedecktes Agarosegel gegeben (trockene Beladung). Nachdem die Laufkammer bis zum oberen Rand des Agarosegels befüllt worden war, liefen die Proben für 10 min bei 78 V in das Gel. Im Anschluss wurde das Gel vollständig mit Puffer bedeckt und die RNA bei 32 V für ca. 4 h gelelektrophoretisch getrennt. Die Färbung und Detektion erfolgte wie unter Kapitel 2.2.8 beschrieben. Um den im Gel enthaltenen Formaldehyd zu entfernen, wurde das Gel für 2 x 15 min in 100 ml 20 x SSC-Puffer (*saline-sodium citrate*, SSC) schüttelnd äquilibriert. Durch Kapillartransfer wurde die RNA auf eine positiv geladene Nylonmembran (Boehringer Mannheim, Mannheim) übertragen. Dazu wurde die auf Gelgröße (6,6 x 8 cm) zugeschnittene Membran für 10 min schüttelnd in 2 x SSC-Puffer äquilibriert. In einer RNase-freien Plastikwanne wurde ein Reservoir an 20 x SSC-Puffer angelegt und die Enden eines auf einer Brücke liegenden Filterpapiers (Gel-Blotting-Papier; Whatman 3 MM, Roth, Karlsruhe) im Puffer getränkt. Mit der Oberseite wurde das Agarosegel auf das getränkte Filterpapier gelegt und die Membran auf dem Gel platziert. Auf die Membran wurden zusätzlich zwei auf Gelgröße zugeschnittene trockene Filterpapiere gelegt sowie ein Stapel aus Papiertüchern. Den Abschluss des Blot-Aufbaus bildete eine Glasplatte mit einem Gewicht von ca. 230 g. Der Kapillartransferblot erfolgte über Nacht. Nach Beendigung des Blots wurde die Position der Geltaschen auf der Membran mittels einer Kanüle markiert und die RNA auf der Membran fixiert (*Auto Cross Linking*; UV-Stratalinker 2400, Stratagene, Kirchzarten). Dazu wurde die Membran auf ein in 2 x SSC-Puffer getränktes Blatt Filterpapier gelegt. Die Membran-Seite, auf der die RNA lokalisiert war, wurde dabei dem UV-Licht exponiert. Zur Entfernung ungebundener RNA wurde die Membran in 0,1 % (v/v) DEPC gewaschen. Abschließend erfolgte die Trocknung der Membran an der Luft.

#### 20 x SSC-Puffer, pH 7,0

Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)	3,0 M
Natriumcitrat (Roth)	0,3 M

#### RNA-Ladungspuffer

Formamid (deionisiert) (Roth)	125,0 µl
37 % Formaldehyd (Roth)	41,5 µl
10 x MOPS-Puffer (Kapitel 2.2.8)	25,0 µl
2,5 % (w/v) Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)	5,0 µl
0,1 % (v/v) DEPC (Roth)	28,5 µl

### Prähybridisierung

Die Prähybridisierung erfolgte schüttelnd für 30 min bei 50 °C und 40 rpm (Certomat U und Certomat H, Sartorius AG, Göttingen). Dazu wurde die Membran mit 15 ml des vorgewärmten Prähybridisierungspuffers (*DIG Easy Hyb*, Roche, Mannheim) in einer Plastikbox inkubiert. Dieser Schritt diente der Blockierung aller unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran.

### Hybridisierung

Zur Herstellung von 15 ml Hybridisierungspuffer wurden ca. 25 ng der jeweiligen DIG-dUTP-markierten DNA-Sonde pro Milliliter *DIG Easy Hyb* (Roche, Mannheim) verwendet. Dazu wurde die Sonde in einem Reaktionsgefäß in 50 µl 0,1 % (v/v) DEPC (Roth) verdünnt, bei 68 °C für 10 min denaturiert und zum auf 50 °C vorgewärmten *DIG Easy Hyb*-Puffer gegeben. Nach Ablauf der Prähybridisierung wurde die zuvor verwendete Lösung gegen den Hybridisierungspuffer ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 50 °C und 40 rpm.

### Immunologische Detektion

Um ungebundene DNA-Sonden nach Abschluss der Hybridisierung entfernen zu können, wurde die Membran in Lösungen absteigender Salzkonzentration inkubiert (*stringency washes*). Der erste Waschschrift erfolgte 2 x 5 min bei Raumtemperatur mit je 15 ml *Low Stringency Buffer*, bestehend aus 2 x SSC-Puffer und 0,1 % (w/v) SDS. Im Anschluss wurden 15 ml des aus 0,1 x SSC-Puffer und 0,1 % (w/v) SDS bestehenden *High Stringency Buffers* auf 68 °C vorgewärmt, gegen den *Low Stringency Buffer* ausgetauscht und 2 x 15 min mit der Membran bei 68 °C inkubiert. Für die Detektion der DNA-Sonden wurde das *DIG Luminescent Detection Kit* (Roche, Mannheim) verwendet. Dazu wurde die Membran nach einem 5-minütigen Waschschrift mit 15 ml Waschpuffer mit dem gleichen Volumen an 1 x Blockierungslösung 30 min inkubiert. Für die Antikörper-Lösung wurde das an alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat (75 mU/ml) 1:10.000 in 1 x Blockierungslösung verdünnt und im Anschluss an den Blockierungsschritt 30 min auf die Membran gegeben. Ungebundene Anti-Digoxigenin-AP-Konjugate wurden durch zwei 15-minütige Waschschriffe mit je 15 ml Waschpuffer unter Schütteln entfernt. Nach Inkubation der Membran für 5 min mit 15 ml Detektionspuffer wurde das Chemilumineszenz-Substrats CSPD 1:100 in Detektionspuffer verdünnt und auf die Membran gegeben. Die Inkubation der Membran mit dem CSPD-Substrat erfolgte zunächst für 5 min bei Raumtemperatur. Zur Intensivierung des Signals schloss sich eine weitere Inkubation für 15 min bei 37 °C an. Die Gesamtexpositionszeit mit dem Fujifilm LAS 3000 *Imager* (Düsseldorf) betrug 50–60 min. Die Größenbestimmung der detektier-

ten mRNA-Transkripte erfolgte anhand des Digoxigenin-markierten Größenstandards mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Quantity One 1-D Analysis* (Bio-Rad, München).

#### Waschpuffer, pH 7,5

Maleinsäure (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,10 M
Natriumchlorid (Roth, Karlsruhe)	0,15 M
Tween 20 (Polysorbat 20) (Merck, Darmstadt)	0,3 % (v/v)

#### Maleinsäurepuffer, pH 7,5

Maleinsäure (Sigma-Aldrich)	0,10 M
Natriumchlorid (Roth)	0,15 M

#### 10 x Blockierungslösung

<i>Blocking Reagent</i> (Roche, Mannheim)	5 g
0,1 % (v/v) DEPC (Roth)	ad 50 ml

#### 1 x Blockierungslösung

10 x Blockierungslösung	12 ml
Maleinsäurepuffer	108 ml

#### Detektionspuffer, pH 9,5

Natriumchlorid (Roth)	0,1 M
Tris (Roth)	0,1 M

### **Entfernung von DNA-Sonden**

Um die Membran mit einer anderen DNA-Sonde erneut hybridisieren zu können, mussten zuvor gebundene Sonden von der Membran entfernt werden. Dazu wurde die Membran zweimal 60 min in einer Strippinglösung bei 80 °C inkubiert, in 2 x SSC-Puffer gewaschen und darin bis zur Weiterverwendung gelagert.

#### Strippinglösung

Formamid, deionisiert (Roth)	50 % (v/v)
SDS (Roth)	5 % (w/v)
Tris-HCl (Roth), pH 7,5	50 mM

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 Herstellung von bakteriellen Zellextrakten

#### Oxische und anoxische Zellernte

Während der anoxischen Herstellung von Zellextrakten fanden alle Arbeitsschritte in einer Anaerobier-Box (MACS MG500, Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, Großbritannien) statt. Diese enthielt als Atmosphäre ein Gemisch aus  $N_2/CO_2/H_2$  (80:10:10, v/v/v). Zusätzlich wurden alle Gefäße und Pipettenspitzen mindestens 12 h vor Beginn in die Anaerobier-Box eingeschleust. Die Bakterienkultur wurde in Zentrifugenbecher aufgeteilt und 20 min bei 11.300 *g* und 4 °C abzentrifugiert. Nach Abnahme des Überstands wurden die Zellen zweimal mit 50 mM reduziertem Kaliumphosphatpuffer ( $KPP_{red}$ ) gewaschen und das Zellpellet bei -80 °C gelagert. Die Zellernte unter oxischen Bedingungen erfolgte außerhalb einer Anaerobier-Box mit nicht reduziertem und nicht begastem 50 mM Kaliumphosphatpuffer ( $KPP_{ox}$ ).

<u>50 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,8 (reduziert) (<math>KPP_{red}</math>)</u>	
$KH_2PO_4$ (Roth, Karlsruhe), 1 M	25,15 ml
M $K_2HPO_4$ (Merck, Darmstadt), 1 M	24,85 ml
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat (Roth)	0,5 g
Resazurin-Natriumsalz-Stammlösung (1 mg/ml) (Roth)	1 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml
Begast mit $H_2/CO_2$ (80:20, v/v)	

#### Zellaufschluss

Die anoxisch geernteten Zellen einer 250 ml-Kultur wurden in 500  $\mu$ l  $KPP_{red}$  (pH 6.8) mit 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail (Complete, Roche, Mannheim) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße mit Dichtung überführt, die zu einem Drittel mit Glaskugeln (*Glass Beads*, Durchmesser 0,1 mm; Roth) gefüllt waren. Der Aufschluss der Zellen erfolgte in zweifacher Durchführung für 20 s mit einer Geschwindigkeit von 6,0 m/s (FP 120 FastPrep *Cell Disrupter*, Qbiogene, Carlsbad, USA). Nach einem Zentrifugationsschritt (10.000 *g*, 4 °C, 5 min) wurde das klare Lysat abgenommen, 10 min bei 37 °C mit 3  $\mu$ l Benzonase (125 U, Merck) inkubiert und erneut zentrifugiert (14.000 *g*, 4 °C, 20 min). Der klare Überstand (im Weiteren als Zellextrakt bezeichnet) wurde abgenommen und das Pellet als unlösliche Fraktion in  $KPP_{red}$  resuspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Zellextrakt und der unlöslichen Fraktion wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

### 2.3.2 Reinigung von *Strep(II)*-Fusionsproteinen

Die Reinigung *Strep-tag*-gekoppelter Proteine erfolgte mittels Affinitätschromatographie. Das aus den Aminosäuren WSHPQFEK bestehende *Strep(II)*-Peptid bindet hierbei mit hoher Affinität an eine Matrix aus modifiziertem Streptavidin und wird durch Zugabe eines Biotin-Derivats vom immobilisierten Säulenmaterial eluiert. Die Proteinreinigung wurde mit dem *Strep-tag* Starter Kit (IBA, Göttingen) durchgeführt. Dazu wurden 0,3–1 ml Zellextrakt direkt auf die mit Puffer W (100 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA) äquilibrierte *Strep*-Tactin-Sepharosesäule (1 ml) gegeben. Der Durchfluss erfolgte dabei mittels Schwerkraft. Nachdem das Zellextrakt in die Säulenmatrix hinein gelaufen war, wurde die Säule 5 x mit 1 ml Puffer W gewaschen. Daran schloss sich die Elution mit 6 x 0,5 ml Puffer E (100 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 2,5 mM Des-thiobiotin) an. Die Regenerierung des Säulenmaterials wurde mit Puffer R (100 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM HABA) durchgeführt, welcher den gelben Azo-Farbstoff 4-Hydroxyazobenzen-2-Carboxylsäure (HABA) enthielt. Sehr niedrig konzentrierte Proben (z.B. 0,04 mg/ml) des gleichen gereinigten Proteins wurden vereinigt und konzentriert (Centricon Filter JM30, Millipore, Darmstadt). Zur Überprüfung der Reinigung wurden alle erhaltenen Fraktionen nach Bestimmung der Proteinkonzentration mittels SDS-PAGE analysiert.

### 2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, München). Für die Erstellung einer Kalibriergerade wurden Rinderserumalbumin (BSA)-Lösungen verschiedener Konzentration (0,02–0,3 mg/ml) als Standards eingesetzt. Die Analyse der Proben und Standards erfolgte in Dreifachbestimmung. Dazu wurden 10 µl pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte gegeben und anschließend mit je 200 µl des 1:5 verdünnten und filtrierten Assay-Reagenzes versetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 10 min wurden die Proben im Plattenphotometer (SLT Rainbow; Teca, Männedorf, Schweiz) bei 595 nm vermessen. Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Kalibriergerade ermittelt.



### 2.3.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

#### Denaturierende SDS-PAGE

Die Trennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde nach Laemmli durchgeführt [116]. Dazu wurden die Proteinproben im Verhältnis 2:1 mit Probenladungspuffer versetzt und für 15 min bei 100 °C denaturiert. Nach der Zentrifugation bei 6.000 g wurden die Proben sowie der Molekulargewichtsstandard (*PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*; Fermentas, St. Leon-Rot) in die Probentaschen des Sammelgels gegeben. Bis zum Einlaufen der Proben in das Trenngel wurde der Gelelektrophoreselauf bei 15 mA pro Gel durchgeführt. Daran schloss sich die Trennung bei 30 mA pro Gel an. Im Anschluss wurden die Gele unter Schwenken in einer Coomassie-Färbelösung 1 h gefärbt. Das Entfärben der Gele erfolgte über Nacht. Zur Dokumentation wurden die Gele eingescannt (*GS-800 Calibrated Densitometer*; Bio-Rad, München).

#### Trenngel (13 %)

Aqua bidest	3,23 ml
Acrylamid-Bis-Lösung (40 %) (Merck, Darmstadt)	2,60 ml
Tris-HCl (Roth, Karlsruhe) 1,5 M; pH 8,8	2,0 ml
SDS (Roth), 10 % (w/v)	80 µl
APS (Biomol, Hamburg), 10 % (w/v)	80 µl
TEMED (Roth)	3,2 µl

#### Sammelgel (5 %)

Aqua bidest	2,56 ml
Acrylamid-Bis-Lösung (40 %) (Merck)	0,53 ml
Tris-HCl (Roth) 0,5 M; pH 6,8	1,06 ml
SDS (Roth), 10 % (w/v)	42 µl
APS (Biomol), 10 % (w/v)	42 µl
TEMED (Roth)	4,2 µl

#### Probenpuffer

Tris (Roth)	125 mM
SDS (Roth)	4 % (w/v)
Glycerin (Roth)	10 % (v/v)
β-Mercaptoethanol (Fluka, Deisenhofen)	10 % (v/v)
Bromphenolblau (Sigma-Aldrich, Steinheim)	0,25 % (w/v)

Laufpuffer

Tris (Roth, Karlsruhe)	25 mM
Glycin (Roth)	192 mM
SDS (Roth)	0,1 % (w/v)

Coomassie-Färbelösung

Coomassie-Brillantblau R250 (Bio-Rad, München)	0,1 % (w/v)
Essigsäure (Roth)	7 % (v/v)
Methanol (VWR, Darmstadt)	14 % (v/v)

Entfärber

Ethanol	10 % (v/v)
Essigsäure (Roth)	7,5 % (v/v)

**Native Gradienten-PAGE**

Für diese Methode wurden native Gradientengele (Tris-HCl 4–15 %, Bio-Rad, München) genutzt. Proteinproben (2,5–5 µg) wurden dazu mit dem gleichen Volumen an Saccharose (53 %, w/v) und 3 µl Bromphenolblau (0,1 %, w/v) versetzt. Als Größenstandards dienen die Proteine Albumin (67 kDa), Lactat-Dehydrogenase (140 kDa), Katalase (232 kDa), Ferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) (*HMW Electrophoresis Calibration Kit*; GE Healthcare, Freiburg). Ein Gemisch der Standardproteine von 5 µl wurde mit 1 µl Bromphenolblau (0,1 %, w/v) versetzt. Vor dem Auftragen der Proben und des Markers erfolgte eine 20-minütige Äquilibrationsphase bei 70 V mit nativem Laufpuffer. Die Elektrophorese wurde 1,5 h bei einer konstanten Spannung von 150 V durchgeführt. Das Färben, Entfärben und Dokumentieren der Gele erfolgte wie zuvor beschrieben. Die Größenbestimmung der Proteinbanden wurde anhand des HMW-Größenstandards mit dem Bildbearbeitungsprogramm *Quantity One 1-D Analysis* (Bio-Rad, München) durchgeführt.

Nativer Laufpuffer, pH 8,5

Tris (Roth, Karlsruhe)	24 mM
Glycin (Roth)	188 mM

### Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE)

Der von Anastasia Matthies durchgeführte Versuch zur Trennung der zytoplasmatischen Proteine von *S. isoflavoniconvertens* nach Molekulargewicht und dem isoelektrischen Punkt wurde in ihrer Dissertation ausführlich dargestellt [139]. Aus diesem Grund wird die Methode im Folgenden nur kurz erläutert. Für die Herstellung des Zellextrakts wurde *S. isoflavoniconvertens* in Anwesenheit von Daidzein bzw. DMSO in 250 ml BHI-Medium kultiviert (Kapitel 2.1). Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstandes wurden die Zellen 5 x mit Waschpuffer (10 mM Tris, pH 8; 5 mM Magnesiumacetat; 30 mg/l Chloramphenicol) gewaschen. Der Waschpuffer enthielt zusätzlich einen 1:100 verdünnten Protease-Inhibitor-Mix (GE Healthcare, Freiburg). Für die Herstellung des Zellextrakts wurden die Zellen mechanisch aufgeschlossen (Kapitel 2.3.1) und die Proteinkonzentration bestimmt (Kapitel 2.3.3). Die verwendete Menge an Protein für ein DIGE-Gel (analytisches Gel) betrug 50 µg. Die Analyse differentiell regulierter Protein-Spots erfolgte mit der DeCyder-Software 6.5 (GE Healthcare, Freiburg). Für die massenspektrometrische Analyse der Protein-Spots wurden präparative, mit 500 µg Protein beladene 2D-Gele angefertigt. Die Zusammensetzung eines präparativen Gels sowie Färbung, Elektrophorese, Proteinverdau und die Analyse mit NanoLC-ESI-MS/MS wurde von Vogel-Scheel *et al.* beschrieben [231]. Das Ableiten von Peptidsequenzen aus den mit der ESI-MS/MS-Technik ermittelten Daten erfolgte mit der Software ProteinLynx Global Server 2.3 (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, USA). Bei einem Kalibrierungsfehler von 5 ppm betrug die Fragment-Toleranzgrenze 0,05 kDa.

## 2.4 Enzymkinetik

### 2.4.1 Bestimmung der Enzymaktivitäten bei der Umsetzung von Isoflavonen

Im den enzymatischen Tests wurde entweder Daidzein (Acros Organics, Geel, Belgien), Dihydrodaidzein (Toronto Research Chemicals, Toronto, Kanada), Genistein (Roth, Karlsruhe) oder Dihydrogenistein (Synthese AG M. Gütschow, Pharmazeutisches Institut Universität Bonn) als Isoflavonsubstrat verwendet. Als Standardsubstanzen dienten zusätzlich Equol (Fluka, Deisenhofen) und 5-Hydroxyequol (Isolation A. Braune, Abt. Gastrointestinale Mikrobiologie, DIfE). Alle Isoflavonstandards und -substrate wurden in DMSO (Merck, Darmstadt) gelöst. Als Koenzym dienten NADH oder NADPH als auch NADP<sup>+</sup> (Biomol, Hamburg). Sofern nicht anders angegeben, enthielten die Testansätze nach Zugabe des Substrats 0,25 % DMSO. Alle unter anoxischen Bedingungen durchgeführten enzymatischen Tests erfolgten bei 37 °C in einer Anaerobier-Box (MACS MG500, Don Whitley Scientific Ltd., Shipley, Großbritannien) mit einem Gemisch aus N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub> (80:10:10, v/v/v).

#### Enzymtests mit bakteriellen Zellextrakt

Die Durchführung der enzymatischen Tests erfolgte in einem Gesamtvolumen von 1 ml mit 50 mM KPP<sub>red</sub> (pH 6,8), 100 µM Substrat, 0,6 mM NADH oder NADPH und 50 µl des jeweiligen Zellextrakts (2–20 mg/ml). Bei der Durchführung enzymatischer Tests unter oxischen Bedingungen wurde nicht reduzierter 50 mM KPP verwendet sowie NADP<sup>+</sup> als Koenzym. Durch Zugabe des Extrakts wurde die Enzymreaktion gestartet. Nach 5, 10, 15, 20 und 30 min wurden jeweils 50 µl Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Methanol/Essigsäure/Aqua bidest (10:1:1, v/v/v) gestoppt. Die abgestoppten Reaktionsproben wurden 5 min bei 18.000 g zentrifugiert und der Überstand mit der Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (RP-HPLC) (Kapitel 2.5.1) analysiert. Alle Enzymtests wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde anhand der Produktbildung innerhalb von 5 min ermittelt. Bei Kombination aller rekombinanten *Strep*-Fusionsproteine erfolgten die dreifach durchgeführten Tests mit den Zellextrakten der verschiedenen *E. coli*-Klone. Der enzymatische Ansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 1 ml 50 mM KPP<sub>red</sub> (pH 6,8), 50 µM Substrat, 0,6 mM NADPH, 5 % DMSO und 10 µl des jeweiligen Zellextrakts.

### Enzymtests mit gereinigtem Protein

In einem Reaktionsvolumen von 0,5 ml wurden 50 mM KPP<sub>red</sub> (pH 6,8), 100  $\mu$ M Substrat, 1,2 mM NADPH und 25  $\mu$ l des gereinigten Proteins (0,05–4,0 mg/ml) verwendet. Die Durchführung enzymatischer Tests sowie die Probenvorbereitung und Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden im vorherigen Absatz beschrieben. Alle Experimente erfolgten in Dreifachbestimmung.

### Bestimmung der spezifischen Enzymparameter $K_m$ und $V_{max}$

Zur Ermittlung der Michaelis-Konstante ( $K_m$ ) und der Maximalgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) wurde die Enzymreaktion in einem Volumen von 0,5 ml durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 mM KPP<sub>red</sub> (pH 6,8), 0,5–40  $\mu$ M Substrat, 0,6 mM NADPH, 5 % DMSO und 25  $\mu$ l des gereinigten Proteins (0,12–0,19 mg/ml). Für Ansätze mit niedriger Substratkonzentration (0,5–3  $\mu$ M) wurde das gereinigte Protein zuvor 1:3 in Elutionspuffer (*Strep-tag* Starter Kit; IBA, Göttingen) verdünnt. Nach 1 min wurde die Reaktion abgestoppt und die Isoflavon-Umsetzung mittels RP-HPLC analysiert (Kapitel 2.5.1). Alle enzymatischen Tests erfolgten in Dreifachbestimmung. Die spezifische Aktivität wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration aufgetragen. Aus der gefitteten Kurve wurden mit Hilfe der GraFit Data Analysis Software (Erithacus Software, Surrey, Großbritannien) die Werte von  $K_m$  sowie  $V_{max}$  ermittelt.

#### 2.4.2 NAD(P)H-Dehydrogenase-Assay

Beim NAD(P)H-Dehydrogenase-Assay (auch Diaphorase-Assay) wurde der Farbstoff 2,6-Dichlorphenolindophenol (DCPIP; Roth, Karlsruhe) durch ein Elektronentransfer-Flavoenzym reduziert und das Koenzym NAD(P)H oxidiert [165]. Das Reaktionsgemisch von 1 ml enthielt 0,1 M reduzierten Kaliumphosphatpuffer (pH 7), 0,14 mM NADH oder NADPH, 32 mM DCPIP und 4 bis 17  $\mu$ g Protein. Die in der Anaerobierbox mit Puffer, Koenzym und Protein befüllte Quarzküvette (Suprasil; Hellma, Müllheim) wurde mit einem Stopfen verschlossen. Mittels einer Mikroliterspritze wurde das Substrat DCPIP zugegeben und die Enzymreaktion gestartet. Die Messung der Absorptionsabnahme bei 600 nm über einen Zeitraum von 10 min erfolgte bei 25 °C im Photometer (Infinite M200Pro, Tecan, Crailsheim). Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Quantifizierung des verbrauchten Substrats DCPIP wurde eine Kalibriergerade für den Bereich von 0 bis 50  $\mu$ M erstellt.

0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7 (reduziert)	
1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Roth, Karlsruhe)	50,3 ml
1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)	49,7 ml
L-Cysteinhydrochlorid-Monohydrat (Roth)	0,5 g
Resazurin-Natriumsalz-Stammlösung (1 mg/ml) (Roth)	1 ml
Aqua bidest	ad 1000 ml
Begasung mit H <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	

## 2.5 Chemisch-Analytische Methoden

### 2.5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

#### Isoflavon-Analyse

Die Analyse der Isoflavone Daidzein und Genistein sowie deren Metaboliten erfolgte mittels Umkehrphase-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*reversed phase high performance liquid chromatography*, RP-HPLC). Das HPLC-System Ultimate 3000 (Dionex, Idstein) bestand aus der Pumpe LPG-3400SD, dem Probengeber WPS-3000T SL, dem Säulenthermostat TCC-3000SD und dem Diodenarray-Detektor DAD-3000. Die Trennung der Substanzen nach Injektion von 20 µl Probe erfolgte durch eine RP-C18-Säule (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm; 250 x 4 mm; Merck, Darmstadt), welche an eine RP-C18-Vorsäule (C18 LiChrospher, 5 µm) gekoppelt war. Die Säulentemperatur betrug 37 °C. Als mobile Phase diente ein Gradient aus 2 % (v/v) Essigsäure (Roth; Eluent A) und Methanol (VWR; Eluent B) mit folgendem Verlauf: 5 % B für 15 min, von 5 auf 55 % B in 10 min, 55 % B für 3 min, von 55 auf 100 % B in 5 min, von 100 auf 5 % B in 7 min. Die Flussrate betrug 0,8 ml/min. Die Isoflavone und deren Metaboliten (Kapitel 2.4.1) wurden bei 280 nm detektiert. Die Identifizierung erfolgte anhand der Retentionszeit und von UV-Spektren. Die Steuerung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der Software Chromeleon 6.4 (Dionex, Sunnyvale, Kalifornien, USA).

#### Flavin-Analyse

Zur Probenvorbereitung wurden 100 bis 250 µl des gereinigten Proteins (0,2–4,0 mg/ml) für 10 min bei 100 °C inkubiert. Durch Zentrifugation (14.000 g, 10 min, 4 °C) wurde denaturiertes Protein und die daran assoziierten Kofaktoren entfernt. Nach Filtrieren des Überstands (Millex-GV 0,22 µm PVDF 4 mm; Merck Millipore, Darmstadt) wurden 20 µl der nicht kovalent gebundenen Flavine auf eine RP-C18-Säule (LiChrospher 100 RP-18, 5 µm; 250 x 4 mm; Merck, Darmstadt) gegeben und mit dem HPLC-System Ultimate 3000

analysiert. Als mobile Phase wurde ein Gradient aus 5 mM Ammoniumacetat (pH 6,5; Eluent A) und Methanol (VWR; Eluent B) mit folgendem Verlauf eingesetzt: 15 % B für 5 min, von 15 auf 75 % B in 20 min, von 75 auf 100 % B in 5 min, 100 % B für 5 min, von 100 auf 15 % B und 15 % B für 10 min. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Nach der Detektion bei 450 nm erfolgte die Identifizierung der Flavine anhand der Retentionszeit und ihrer UV-Spektren von jeweils 40  $\mu$ M Flavinadenindinukleotid (FAD; Sigma-Aldrich, Steinheim), Flavinmononukleotid (FMN; Fluka, Deisenhofen) und Riboflavin (Ferak, Berlin). Zur Quantifizierung von FAD wurde eine Kalibriergerade im Bereich von 2 bis 40  $\mu$ M erstellt.

### Chirale Analyse

Die qualitative Analyse chiraler Isoflavon-Metaboliten erfolgte mit der Trennung von Enantiomeren durch eine Chiralcel OJ-RH-Säule (150 x 4,6 mm, 5  $\mu$ m; Daicel, Eschborn). Für die Analyse wurden Metaboliten, welche bei der Umsetzung von Isoflavonen im Enzymtest entstanden, mittels RP-HPLC isoliert. Die Substanzen wurden getrocknet (Centrifugal Evaporator RC 10.22, Saint-Herblain, Frankreich) und in 30  $\mu$ l 70 % Methanol aufgenommen. Nach der Zentrifugation (14.000 g, 10 min) wurden 10  $\mu$ l der Probe auf die chirale Säule gegeben und mit dem HPLC-System Ultimate 3000 analysiert. Die Säulentemperatur betrug 35 °C. Als mobile Phase wurde ein Gemisch (60:40, v/v) aus mit Trifluoressigsäure (Merck, Darmstadt) behandeltem Aqua bidest (pH 3) und Acetonitril (Roth, Karlsruhe) verwendet. Die Flussrate betrug 0,5 ml/min. Die Enantiomere wurden bei 280 nm detektiert und anhand von Literaturdaten [168, 199] sowie der Reihenfolge ihrer Elution identifiziert.

#### 2.5.2 Dünnschichtchromatographie

Die Extraktion der Flavinkofaktoren erfolgte durch die Zugabe von 5  $\mu$ l 50 % (v/v) Trichloressigsäure (TCA; Merck, Darmstadt) zu 50  $\mu$ l des gereinigten Proteins (0,9 bis 3,9 mg/ml) [33]. Anschließend wurde der Ansatz 5 min auf Eis inkubiert und dann bei 10.000 g 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 20  $\mu$ l 1 M  $K_2HPO_4$  (Merck, Darmstadt) neutralisiert. Die Trennung von je 10  $\mu$ l Probe erfolgte auf Kieselgel-Platten (Silica Gel 60, Merck) mit einem Gemisch aus Butanol (Merck)/ Essigsäure (Roth)/ Aqua bidest (10:5:5, v/v/v) als Laufmittel. Nach Markierung der Laufrönt und Trocknung der Platte wurde der Retentionsfaktor ( $R_f$ -Wert) bei 366 nm ermittelt. Als Standards wurden 100 pmol Flavinadenindinukleotid (FAD,  $R_f=0,17$ ), 100 pmol Flavinmononukleotid (FMN,  $R_f=0,36$ ) und 50 pmol Riboflavin ( $R_f=0,61$ ) verwendet. Diese waren in 5 % TCA (v/v)/ 5 %  $K_2HPO_4$  (w/v) gelöst.

### 2.5.3 Aufnahme von Absorptionsspektren

Die UV/Vis-Spektren wurden im Photometer (Infinite M200Pro; Tecan, Crailsheim) im Bereich von 230–600 nm mittels einer Mikro UV-Küvette (Brand, Wertheim) aufgenommen. Vermessen wurden die gereinigten Proteine sowie der proteinfreie Überstand nach Freisetzung der Flavinkofaktoren durch TCA-Fällung (Kapitel 2.5.2). Die Messung erfolgte gegen Elutionspuffer (*Strep-tag* Starter Kit; IBA, Göttingen) bei gereinigtem Protein oder gegen 5 % TCA/ 5 %  $K_2HPO_4$  bei proteinfreiem Überstand. Für Analysen in Abwesenheit von Sauerstoff wurden die Proben in der Anaerobierbox (Kapitel 2.3.1) vorbereitet und die Küvetten mit einem Stopfen luftdicht verschlossen.

### 2.5.4 Bestimmung von Nicht-Häm-Eisen

Die Konzentration an Nicht-Häm-Eisen wurde mit der Methode von Fish mit Modifizierungen bestimmt [57, 79]. Dabei wird das im Protein enthaltene Eisen nach Zugabe von Salzsäure freigesetzt, durch Ascorbinsäure reduziert und nach Bildung eines Ferrozin-Komplexes kolorimetrisch nachgewiesen. Die Eisenkonzentration wurde mit einer Standardreihe ermittelt, für die Lösungen aus Ammoniumeisen(II)-sulfat (Merck, Darmstadt) in den Konzentrationen 5–250  $\mu M$  verwendet wurden. Nach Zugabe von 100  $\mu l$  1 % (v/v) HCl (Merck, Darmstadt) zu 100  $\mu l$  Proteinprobe bzw. zum Standard wurden die Ansätze für 10 min bei 80 °C inkubiert und im Anschluss auf Raumtemperatur abgekühlt. Nacheinander erfolgte die Zugabe von 500  $\mu l$  7,5 % (w/v) Ammoniumacetat (Merck), 100  $\mu l$  frisch hergestellte 4 % (w/v) Ascorbinsäure (Roth, Karlsruhe), 100  $\mu l$  2,5 % (w/v) SDS (Roth) und 100  $\mu l$  1,5 % (w/v) Ferrozin (Sigma-Aldrich, Steinheim). Nach Zentrifugation (9.000  $g$ , 10 min) wurde der Überstand in Küvetten überführt und die Absorption bei 593 nm mittels Photometer (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, München) bestimmt.

### 2.5.5 Bestimmung von säurelabilem Schwefel

Die Konzentrationsbestimmung von säurelabilem Schwefel erfolgte mit der Methode von Cline mit Modifizierungen [42, 79]. Dabei wurde der zu bestimmende Schwefel zunächst durch Natronlauge freigesetzt und an Zink in Form von Zinksulfid gebunden. Durch Salzsäure erfolgte das Ansäuern des Reaktionsansatzes und der entstandene Schwefelwasserstoff reagierte mit *N,N*-Dimethyl-1,4-phenylendiamin (DMPD) zum kolorimetrisch nachweisbarem Methylenblau. Als Standard wurden verschiedene Konzentrationen (5–500  $\mu M$ )



an Natriumsulfid (VWR, Darmstadt) eingesetzt. Zur Durchführung wurden 40 µl Proteingabe (0,5 bis 1,5 mg/ml) sowie die Lösungen des Standards mit 120 µl 1 % (w/v) frisch hergestellter Zinkacetat-Lösung (Sigma-Aldrich) und 10 µl 7 % (v/v) NaOH gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 30 µl 0,1 % (w/v) DMPD (Sigma-Aldrich; gelöst in 5 M HCl) und 30 µl 10 mM Eisenchlorid (Roth; gelöst in 1 M HCl) sowie eine Inkubationsphase von 20 min bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (9.000 g, 5 min) wurde der Überstand in eine Küvette überführt und bei 670 nm im Photometer (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, München) vermessen. Die Konzentrationen wurden mit der Standardreihe ermittelt. Die Analyse der Proben und Standards erfolgte in Dreifachbestimmung.

## 2.6 Computerbasierte Anwendungen

### 2.6.1 Primerdesign und DNA-Sequenzierung

Das Ableiten von Oligonukleotidprimern für die PCR erfolgte mittels des Programms *primer3* ([www.bioinfo.ut.ee/primer3/](http://www.bioinfo.ut.ee/primer3/)) [226]. Durch die zusätzliche Verwendung der Software *PrimerQuest program* wurden vorgeschlagene DNA-Sequenzen auf die Bildung von Sekundärstrukturen sowie von Homo- und Heterodimeren überprüft (IDT, Coralville, USA; [www.eu.idtdna.com](http://www.eu.idtdna.com)).

Die Sequenzierung von Plasmid-Inserts erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg) mit 750–1500 ng Plasmid-DNA unter Verwendung der Standardprimer SP6 und T7 bzw. zusätzlicher Sequenzierungsprimer (Tabelle 7, Anhang)

### 2.6.2 Sequenzanalysen

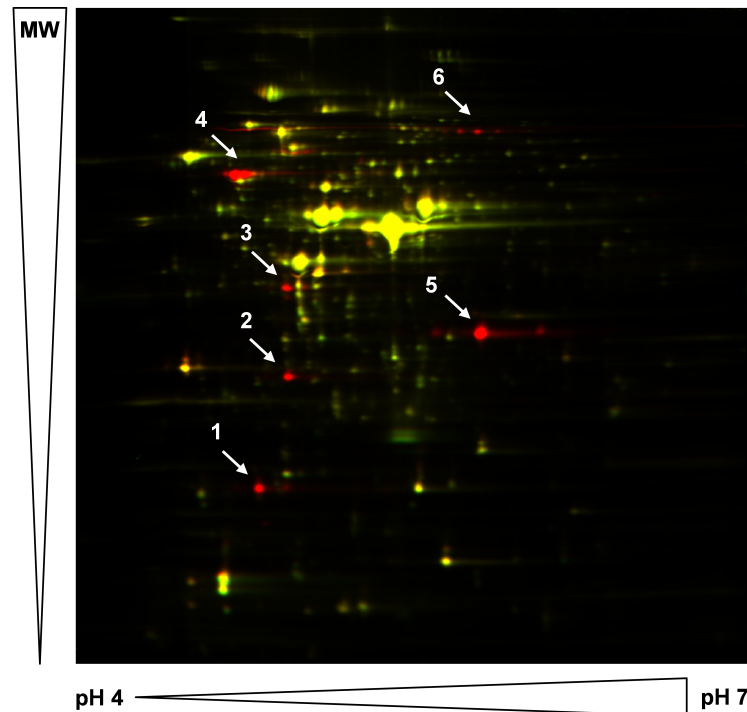
Unter Verwendung des Computerprogramms *Vector NTI Suite* (Invitrogen, Carlsbad, USA) wurden sequenzierte DNA-Fragmente bearbeitet und aneinandergesetzt. Die Datenbankrecherche von DNA- und Proteinsequenzen sowie konservierten Domänen erfolgte mit den Funktionen BLASTN und BLASTP des *Basic Local Alignment Search Tools* der Online-Datenbank NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)). Zur Identifizierung von potenziellen Transkriptionspromotoren und -terminatoren wurden die Internetprogramme BROM ([www.softberry.com](http://www.softberry.com); Softberry, Mount Kisco, USA) und ARNold ([www.rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold](http://www.rna.igmors.u-psud.fr/toolbox/arnold); Université Paris-Sud, Frankreich) genutzt. Die Analyse der G+C-Zusammensetzung von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Internetprogramm *Sciencebuddies* ([www.sciencebuddies.org](http://www.sciencebuddies.org)). Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt eines

Genprodukts wurde mit dem Programm *Protein Calculator* v3.3 ([www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html](http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html)) berechnet. Mit Hilfe des Internetprogramms *MS Digest* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/cgi-bin/msform.cgi?form=msdigest>; Universität Kalifornien, USA) wurden Proteine durch Trypsin theoretisch verdaut und die resultierenden Peptidfragmente angezeigt. Die Analyse möglicher Membranproteindomänen sowie die Vorhersage der möglichen Proteinlokalisierung in der Zelle erfolgten mit dem Programm PSORT ([www.psort.hgc.jp](http://www.psort.hgc.jp)).

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Identifizierung der durch Daidzein induzierten Proteine von *Slackia isoflavoniconvertens*

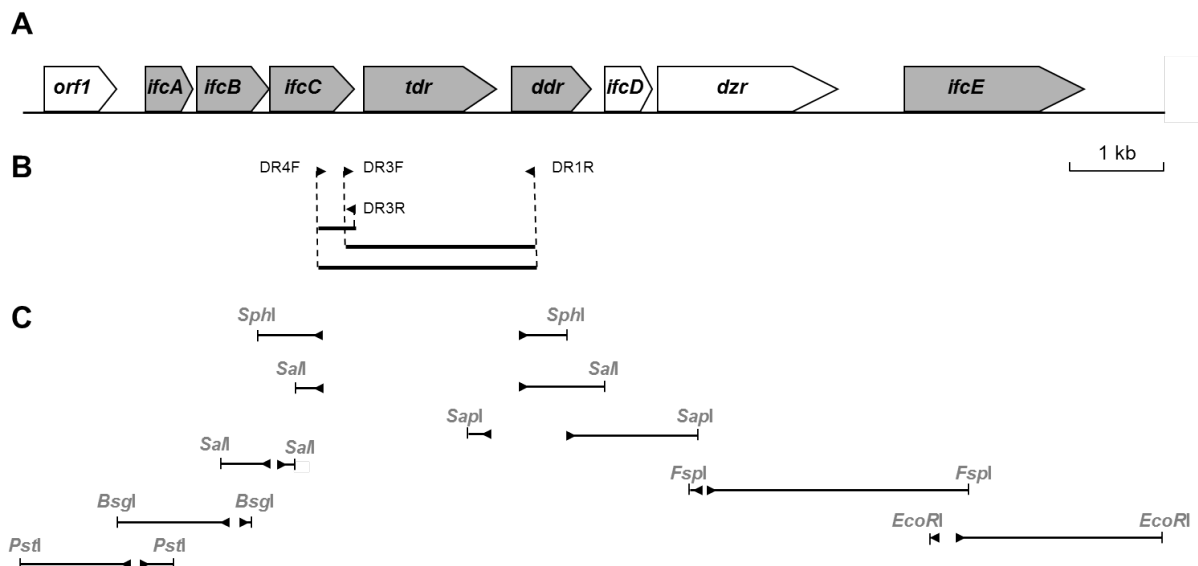
Die Fermentation von *S. isoflavoniconvertens* führte in Anwesenheit der Isoflavone Daidzein oder Genistein zur Induktion der an der Umsetzung von diesen Substraten beteiligten Enzyme [140]. Zur Identifizierung der durch Daidzein induzierten Enzyme wurden die Proteinextrakte einer mit Daidzein induzierten und nicht induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur mittels 2D-DIGE-Analyse verglichen [139]. Die Zugabe von Daidzein führte zur Induktion von mindestens sechs Proteinen (Abbildung 6). Diese waren 24- bis 210-fach stärker exprimiert (Tabelle 8, Anhang).



**Abbildung 6: 2D-DIGE-Dualbild der zytosomatischen Proteine von *S. isoflavoniconvertens* [139].**

Vergleich des Proteinmusters einer durch Daidzein induzierten Kultur (rote Spots) mit einer nicht induzierten Kultur (grüne Spots). Protein-Spots gleicher Intensität erscheinen gelb. Pfeile kennzeichnen die in Anwesenheit von Daidzein induzierten Proteine.

Um die kodierenden Gene der durch Daidzein induzierten Proteine zu identifizieren, wurden die sechs Protein-Spots aus dem 2D-DIGE-Gel isoliert und tryptisch verdaut. Einzelne Peptidabschnitte wurden durch *de-novo*-Sequenzierung ermittelt (Tabelle 8, Anhang). Für das Ableiten degenerierter Oligonukleotidprimer mit unterschiedlichen Orientierungen wurden fünf geeignete Peptidsequenzen der induzierten Protein-Spots 2, 3 und 5 ausgewählt (Tabelle 2, Kapitel 2.2.2). Nur die Kombinationen der abgeleiteten Primer von Peptidfragmenten des Spots 3 und 5 führten zur Amplifizierung von drei spezifischen PCR-Produkten im Bereich von 0,4 bis 2,3 kb (Abbildung 7 B). Die einzelnen DNA-Fragmente wurden in *E. coli* kloniert und sequenziert. Das 2,3 kb große PCR-Produkt kodierte für ein vollständiges offenes Leseraster (engl. *open reading frame*, ORF) von 1458 bp sowie für zwei unvollständige ORFs.



**Abbildung 7: Genorganisation der durch Daidzein induzierten Proteine im 12 kb großen DNA-Fragment von *S. isoflavoniconvertens*.**

(A) Schematische Darstellung der identifizierten Gene und des offenen Leserasters. Grau hervorgehobene Gene kodieren für die im 2D-DIGE-Gel durch Daidzein deutlich induzierten Proteine (Spot 1, *ifcA*; Spot 2, *ifcB*; Spot 3, *ifcC*; Spot 4, *tdr*; Spot 5, *ddr*; Spot 6, *ifcE*). (B) Nach der Kombination von degenerierten Primern amplifizierte PCR-Produkte. (C) Amplifizierte Genfragmente nach der Durchführung von acht aufeinanderfolgenden inverse PCR-Experimenten. Senkrechte Striche kennzeichnen die spezifischen Schnittstellen der eingesetzten Restriktionsenzyme.

Der Vergleich der aus den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Fragmenten der *de-novo*-Sequenzierung zeigte, dass das vollständige Gen für den induzierten 2D-DIGE-Spot 4 kodiert. Die beiden unvollständigen Gene kodieren für die durch Daidzein induzierten Proteine 3 und 5. Die Identifizierung der unbekanntes DNA-Abschnitte genau und genabwärts des zuvor amplifizierten 2,3 kb großen Genfragments erfolgte mittels inverser PCR. In acht aufeinanderfolgenden Experimenten wurde unter Verwendung von

verschiedenen Restriktionsenzymen ein 12 kb langes DNA-Fragment von *S. isoflavoniconvertens* sequenziert (Abbildung 7 C; vollständige DNA-Sequenz siehe Anhang). Das genomische DNA-Fragment umfasst neun Gene, die in gleicher Orientierung angeordnet sind (Abbildung 7 A). Der Vergleich der aus den Genen abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit experimentell ermittelten Peptiden bewies, dass *ifcA*, *ifcB*, *ifcC*, *tdr*, *ddr* und *ifcE* für die im 2D-DIGE-Gel sichtbaren, durch Daidzein induzierten Proteine 1-6 kodieren (Tabelle 8, Anhang). Einige ausgewählte Eigenschaften der identifizierten Gene und ihrer Genprodukte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es zeigte sich, dass die berechneten Parameter wie Molekulargewicht und spezifischer pI der Proteine in Relation zu den tatsächlichen Positionen der Protein-Spots im 2D-DIGE-Gel standen. Den zwischen *ddr* und *ifcE* liegenden Genen *ifcD* und *dzr* konnten keine durch Daidzein induzierten Genprodukte im 2D-DIGE-Gel zugeordnet werden. Aufgrund des hohen isoelektrischen Punkts von 8,3 ist anzunehmen, dass IfcD in der 1. Dimension mit einem pH-Gradienten von 4-7 nicht fokussiert wurde. Bezüglich des Proteins DZNR ließ der Vergleich von Proteinextrakten einer induzierten und nicht induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur durch eindimensionale SDS-PAGE die Bande eines induzierten Proteins mit einer apparenten Masse von 70 kDa erkennen (Abbildung nicht gezeigt). Die Höhe der Proteinbande entspräche der vorhergesagten Genproduktgröße von *dzr*. Möglicherweise wurde DZNR während der Probenbearbeitung für die 2D-DIGE-Analyse degradiert oder technische Probleme verhinderten das Einwandern des Proteins in das Polyacrylamid-Gel während des 2D-Laufs.

**Tabelle 3: Charakteristische Eigenschaften der neun identifizierten Gene und ihrer korrespondierenden Genprodukte.**

Gen	Länge (bp)	Genprodukt	Anzahl der Aminosäuren	Molekulare Masse (kDa)	pI
<i>orf1</i>	765	Orf1	255	27	5,1
<i>ifcA</i>	471	IfcA	157	17	4,8
<i>ifcB</i>	720	IfcB	240	26	4,9
<i>ifcC</i>	906	IfcC	302	33	4,8
<i>tdr</i>	1458	THDR	486	55	4,7
<i>ddr</i>	855	DHDR	285	29	5,4
<i>ifcD</i>	483	IfcD	161	18	8,3
<i>dzr</i>	1932	DZNR	644	70	6,0
<i>ifcE</i>	1836	IfcE	612	66	5,3

## 3.2 Computergestützte Analysen zur Charakterisierung des mit Daidzein induzierten Genkomplexes von *Slackia isoflavoniconvertens*

Die Sequenzierung des genomischen DNA-Fragments von *S. isoflavoniconvertens* zeigte, dass die Gene der an der Umsetzung von Daidzein beteiligten Proteine zu einem induzierbaren Genkomplex gehören. Die insgesamt neun korrespondierenden Genprodukte sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Um eine Vorhersage über die Funktionen der durch Daidzein induzierten Proteine zu treffen, wurden die genetischen Informationen mit bekannten Sequenzen verglichen. Zusätzlich erfolgte die Gegenüberstellung des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens* mit analogen Abschnitten weiterer Equol-produzierender Spezies. Die Untersuchung zur transkriptionellen Regulation der *S. isoflavoniconvertens*-Gene erfolgte auf Basis von potenziellen Sequenzen für Promotoren und Transkriptionsterminatoren.

### 3.2.1 Homologie-Analyse der identifizierten Genprodukte

#### Orf1

Die abgeleitete Aminosäuresequenz des hypothetischen Proteins Orf1 zeigt im Identitätsvergleich Ähnlichkeiten zu Transkriptionsregulatoren der LuxR-Familie. Diese Proteine, auch bezeichnet als LuxR-ähnliche Proteine, besitzen am *C*-terminalen Ende ein charakteristisches Helix-Turn-Helix-Motiv (HTH). Transkriptionsfaktoren eines Zwei-Komponenten-Systems werden durch eine membrangebundene Sensor kinase phosphoryliert und fungieren als Responseregulator. Im *C*-terminalen Bereich von Orf1 befindet sich neben der DNA-Bindedomäne (Position 196 bis 249) ein Sequenzabschnitt für die Bildung eines, für HTH-Proteine typischen, Homodimers oder auch Tetramers (Position 208 bis 248). Die *N*-terminale Region von Orf1 ist gekennzeichnet durch eine Signal-Erkennungs-Domäne, einschließlich der möglichen Phosphoakzeptordomäne (Position 44 bis 139). Wie für Responseregulatorproteine üblich, ist Orf1 vermutlich ein zytoplasmatisches Protein. Unklar ist, inwieweit Orf1 an der transkriptionellen Regulation der durch Daidzein induzierten Gene beteiligt ist und ob ein weiteres, noch unbekanntes Gen die fehlende Isoflavon-detectierende Sensor kinase kodiert. Im Sequenzvergleich finden sich Übereinstimmungen zu bakteriellen Responseregulatoren sowie zu je einem hypothetischen Protein der Equol-produzierenden Bakterien *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *Adlercreutzia equolifaciens* (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Identitätsvergleich von Aminosäure-Sequenzen der identifizierten *S. isoflavoniconvertens*-Genprodukte mit äquivalenten Proteinen Equol-produzierender Bakterien.**

In der Datenbank aufgeführte Proteine sind mit den entsprechenden Accession-Nummern gekennzeichnet.

		Bakterienspezies (mol % G+C-Gehalt) <sup>a</sup>		
<i>Stackia isoflavoniconvertens</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Eggerthella</i> sp.	<i>Stackia</i> sp. Stamm	<i>Adlercreutzia equolifaciens</i>
(58,5) [140]	sp. Stamm 20-92 (39,0) [153]	Stamm YY7918 (56,2) [254]	NATTS (NB) <sup>b</sup>	(64,1-66,5) [138]
Genprodukt (Accession-Nummer)	Identität (%)	Genprodukt (Accession-Nummer)	Identität (%)	Genprodukt (Accession-Nummer)
<b>Orf1</b>	NS <sup>c</sup>	<b>64</b>	NS	<b>43</b>
(-)		(BAK44720) <sup>d</sup> (259)		(BAN78204) <sup>d</sup> (256)
<b>IfcA</b>	<b>82</b>	<b>82</b>	NS	<b>46</b>
(AFV15447)	(BAM25050) (158)	(BAK44719) <sup>d</sup> (158)		(BAN78203) <sup>d</sup> (150)
<b>IfcB</b>	NS	<b>65</b>	NS	<b>49</b>
(AFV15448)		(BAK44718) <sup>d</sup> (240)		(BAN78202) <sup>d</sup> (239)
<b>IfcC</b>	<b>61</b>	<b>61</b>	NS	<b>50</b>
(AFV15449)	(BAJ72746) <sup>d</sup> (304)	(BAK44717) <sup>d</sup> (304)		(BAN78201) <sup>d</sup> (304)
<b>THDR</b>	<b>87</b>	<b>87</b>	<b>90</b>	<b>70</b>
(AFV15450)	(BAJ72747) (486)	(BAK44716) <sup>d</sup> (486)	(BAL46928) (486)	(BAN78200) <sup>d</sup> (487)
<b>DHDR</b>	<b>86</b>	<b>86</b>	<b>94</b>	<b>80</b>
(AFV15451)	(BAJ72748) (286)	(BAK44715) <sup>d</sup> (286)	(BAL46929) (282)	(BAN78199) <sup>d</sup> (282)
<b>IfcD</b>	<b>65</b>	<b>36</b>	<b>99</b>	<b>38</b>
(AFV15452) <sup>d</sup>	(BAJ72749) <sup>d</sup> (167)	(BAK44714) <sup>d</sup> (166)	(-) <sup>d</sup> (161)	(BAN78198) <sup>d</sup> (159)
<b>DZNR</b>	<b>42</b>	<b>43</b>	<b>95</b>	<b>43</b>
(AFV15453)	(BAJ72750) (644)	(BAK44713) <sup>d</sup> (644)	(BAL46930) (644)	(BAN78197) <sup>d</sup> (642)
<b>IfcE</b>	<b>65</b>	<b>66</b>	NS	<b>67</b>
(AGK44477)	(BAJ72752) <sup>d</sup> (416) <sup>e</sup>	(BAK44710) <sup>d</sup> (612)		(BAN78194) <sup>d</sup> (612)

<sup>a</sup> G+C-Gehalt in % mol für das gesamte Genom; <sup>b</sup> NB, Nicht bekannt; <sup>c</sup> NS, Nicht sequenziert; <sup>d</sup> Hypothetisches Protein; <sup>e</sup> Proteinsequenz unvollständig; (-), Accession-Nummer in Datenbank nicht aufgeführt.

### IfcA

Die Analyse von IfcA ergab an zentraler Position ein Dinukleotid-Bindemotiv mit der Sequenz GXGX<sub>2</sub>G (Position 73 bis 78). Übereinstimmungen zu konservierten Domänen wurden nicht ermittelt. Fehlende transmembrane Regionen kennzeichnen IfcA als ein vermutlich im Zytoplasma lokalisiertes Protein. IfcA besitzt mit 82 % eine hohe Sequenzübereinstimmung zur Dihydrodaidzein-Racemase von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 und zu einem hypothetischen Protein von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 (Tabelle 4). Eine geringere Sequenzübereinstimmung von 46 % findet sich auch zu einem unbekanntem Protein von *A. equolifaciens*. Weitere Peptidabschnitte zeigen Übereinstimmungen zur Methylmalonyl-CoA-Epimerase verschiedener Bakterien sowie zu Proteinen der *Vicinal Oxygen Chelate* (VOC)-Superfamilie (z.B. Glyoxalase und Dioxygenase).

### IfcB

Sequenzielle Homologien identifizierten IfcB als  $\beta$ -Untereinheit von Elektronentransfer-Flavoproteinen. Hierbei sind für die *N*-terminale Region mehrere Bindestellen für mögliche Liganden, wie z.B. FAD charakteristisch (Position 7 bis 60). Das Vorhandensein einer Transmembrandomäne (Position 116 bis 132) weist auf ein vermutlich membranassoziiertes Protein hin. Bezüglich ähnlicher Proteine finden sich Sequenzübereinstimmungen von 49 und 65 % zu den Equol-produzierenden Bakterien *A. equolifaciens* und *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 (Tabelle 4).

### IfcC

Identitätsanalysen zeigen für das Genprodukt von *ifcC* Ähnlichkeiten zur  $\alpha$ -Untereinheit der Elektronentransfer-Flavoproteine. Im *C*-terminalen Bereich befinden sich neben einer FAD-Bindedomäne der Elektronentransfer-Flavoproteine (Position 187 bis 265) zwei Motive der Glycyl-Radikal-Enzyme (RVXG; Position 187 bis 190 und 232 bis 235). Ein drittes Glycyl-Radikal-Enzym-Motiv lässt sich in der *N*-terminalen Region nachweisen (Position 41 bis 44). Wie IfcB besitzt auch IfcC eine Transmembrandomäne (Position 93 bis 109). Elektronentransfer-Flavoproteine, die aus einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit und einer größeren  $\alpha$ -Untereinheit bestehen, bilden zumeist ein Heterodimer, welches FAD als Kofaktor bindet [220]. Mit 50 bis 61 % finden sich Sequenzübereinstimmungen zu hypothetischen Genprodukten der Equol-produzierenden Bakterien *A. equolifaciens*, *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 (Tabelle 4).



### THDR

Die Sequenz des Genprodukts THDR enthält im *N*-terminalen Bereich ein verlängertes Dinukleotid-Bindemotiv (VXGXGX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>A; Position 12 bis 23). Dieses Bindemotiv ist für Redoxreaktion katalysierende Enzyme typisch. Zusätzlich besitzt THDR ein zentrales Motiv der Glycyl-Radikal-Enzyme (RVXG; Position 174 bis 177). Fehlende Transmembrandomänen sprechen für eine Lokalisierung von THDR im Zytoplasma. Hohe Sequenzübereinstimmungen finden sich mit 87 bis 90 % zur THDR von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 und *Slackia* sp. Stamm NATTS. Hypothetische Genprodukte von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* sind mit 87 % und 70 % identisch (Tabelle 4). Unabhängig von Equol-produzierenden Bakterien finden sich Übereinstimmungen der THDR zu bakteriellen Flavoproteinen wie der Succinat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase.

### DHDR

Aufgrund charakteristischer Sequenzeigenschaften wird das Genprodukt von *ddr* zu den „klassischen“ kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (*short chain dehydrogenases/reductases*, SDR) gezählt. SDR bilden eine Familie aus funktionell vielfältigen Oxidoreduktasen, welche eine einzelne, für SDR typische, Domäne besitzen sowie eine Länge von ungefähr 250 Aminosäuren. Die SDR-Domäne von DHDR besteht aus einem NAD(P)-Bindemotiv (TGX<sub>3</sub>GXG; Position 38 bis 45) und dem hochkonservierten Motiv YX<sub>3</sub>K (Position 90 bis 94), welches Bestandteil der katalytischen Tetrade ist. Aufgrund fehlender Transmembrandomänen kann DHDR vermutlich als zytoplasmatisches Protein eingeordnet werden. Sequenzidentitäten von 94 % und 86 % finden sich zur DHDR von *Slackia* sp. Stamm NATTS und *Lactococcus* sp. Stamm 20-92. Hypothetische Genprodukte von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* sind mit 80 bis 86 % identisch zur DHDR von *S. isoflavoniconvertens* (Tabelle 4).

### IfcD

Das Genprodukt IfcD besitzt keine konservierten Domänen sowie Sequenzübereinstimmungen zu bekannten Proteinen. Mehrere potenzielle Transmembrandomänen (Positionen 39 bis 55, 87 bis 103 und 125 bis 141) und eine *N*-terminale Signalsequenz (Position 1 bis 33) verdeutlichen jedoch, dass es sich um ein Membranprotein handeln könnte. In Bezug auf korrespondierende Proteine in Equol-produzierenden Bakterien finden sich Sequenzübereinstimmungen von 99 % zu *Slackia* sp. Stamm NATTS und 65 % zu *Lactococcus* sp. Stamm 20-92. Hypothetische Genprodukte von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* weisen geringere Sequenzübereinstimmungen von 36 und 38 % auf (Tabelle 4).

## DZNR

Das Genprodukt DZNR kann aufgrund einer *N*-terminalen *Old Yellow Enzyme* (OYE)-ähnlichen FMN-Bindedomäne den Flavin-abhängigen Enzymen zugeordnet werden. Im zentralen Abschnitt der DZNR-Sequenz befindet sich eine Bindedomäne für ein 4Fe-4S-Zentrum (CX<sub>2</sub>CX<sub>3</sub>CX<sub>12</sub>C; Position 343 bis 363) und ein erweitertes Motiv für die Bindung von Dinukleotiden wie NADPH (VXGXGX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>A; Position 388 bis 399). Aufgrund einer potenziellen FAD-Bindestelle (Position 467 bis 637) scheint DZNR neben FMN zusätzlich FAD als Flavin-Kofaktor zu nutzen. Fehlende transmembrane Regionen kennzeichnen DZNR als ein vermutlich im Zytoplasma lokalisiertes Protein. Eine hohe Sequenzidentität von 95 % findet sich ausschließlich zur DZNR von *Slackia* sp. Stamm NATTS. Weitere Sequenzübereinstimmungen der DZNR von 42 bis 43 % finden sich zu Genprodukten von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92, *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* (Tabelle 4).

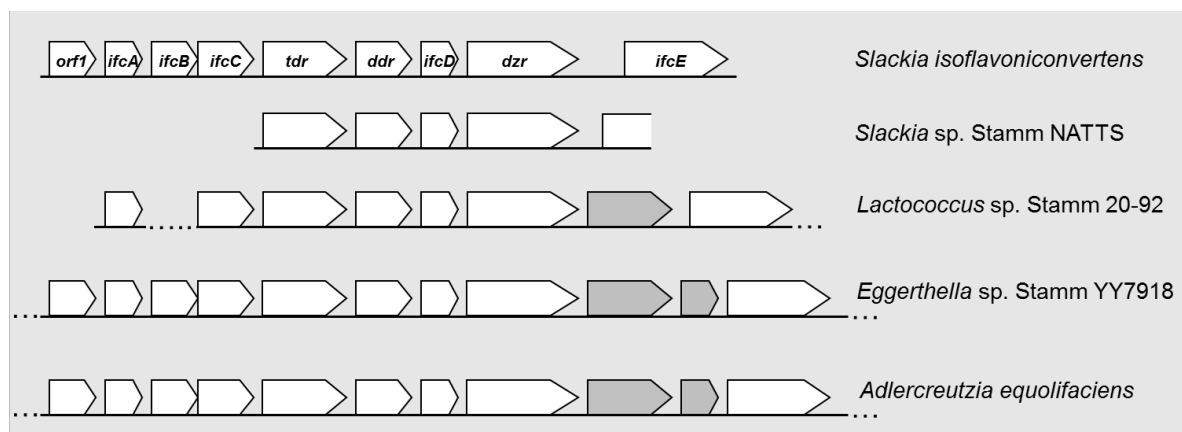
## IfcE

Die Aminosäuresequenz des Genprodukts IfcE beinhaltet neben einem verlängerten Dinukleotid-Bindemotiv (IXGXGX<sub>2</sub>GX<sub>3</sub>A; Position 231 bis 242) ein weiteres Motiv für ein 4Fe-4S-Zentrum (CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>C; Position 49 bis 58). Zusätzlich deutet die Ähnlichkeit zur Familie der Pyridinnucleotid-Disulfid-Oxidoreduktasen auf eine weitere, nicht eindeutig identifizierbare, FAD-Bindedomäne. Das Vorhandensein einer potenziellen Transmembrandomäne (Position 455 bis 471) weist auf ein vermutlich membran-assoziiertes Protein hin. Sequenzübereinstimmungen von 69 % und 66 % finden sich zur kleinen Untereinheit der NADPH-abhängigen Glutamat-Synthase (GltD) in *Cryptobacterium curtum* und der verwandten Spezies *Slackia heliotrinireducens*. Bezüglich Equol-produzierender Bakterien weist die Sequenz von IfcE Übereinstimmungen von 64 bis 67 % zu Genprodukten von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92, *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* auf (Tabelle 4).

### 3.2.2 Vergleich der Genanordnung Daidzein umwandelnder Proteine in Equol-produzierenden Bakterien

Wie beschrieben, wiesen die durch Daidzein induzierten Proteine von *S. isoflavoniconvertens* eine sehr hohe Identität zu Proteinen weiterer Equol-produzierender Bakterien auf. Die Veröffentlichung der Genome von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 [254] und *A. equolifaciens* [219] sowie von Teilsequenzen der Spezies *Slackia* sp. Stamm NATTS [223] und *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 [203–205] ermöglichten den Vergleich der Genorganisation dieser verschiedenen Equol-Produzenten.

Der Vergleich der Genorganisation innerhalb des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens* mit den zuvor aufgeführten Organismen zeigte, dass die Anordnung von acht Genen, beginnend bei *orf1*, in den vollständig sequenzierten Spezies nahezu identisch war (Abbildung 8). Unterschiede fanden sich in der Position des in *S. isoflavoniconvertens* genabwärts von *dzt* gelegenen Gens *ifcE*. Korrespondierende Gene zum durch Daidzein induzierten *ifcE* waren nicht zum kodierenden Gen der DZNR benachbart, sondern in der Entfernung von zwei Genen genabwärts angeordnet. Auch die partiell vorhandenen DNA-Fragmente von *Slackia* sp. Stamm NATTS und *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 belegen, dass die Anordnung der mit *tdr*, *ddr*, *ifcD* und *dzt* korrespondierenden Gene für alle fünf Spezies einheitlich ist. Abweichend von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* befand sich das korrespondierende Gen für *ifcE* entweder ebenfalls benachbart zum kodierenden Gen der DZNR (*Slackia* sp. Stamm NATTS) oder ein Gen abwärts gelegen (*Lactococcus* sp. Stamm 20-92) (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Vergleich der Genorganisation innerhalb des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens* mit korrespondierenden Genen Equol-produzierender Bakterien.**

Weiß hervorgehoben sind die korrespondierenden Gene. Grau dargestellte Gene repräsentieren im identifizierten Genkomplex von *S. isoflavoniconvertens* nicht vorhandene Gene.

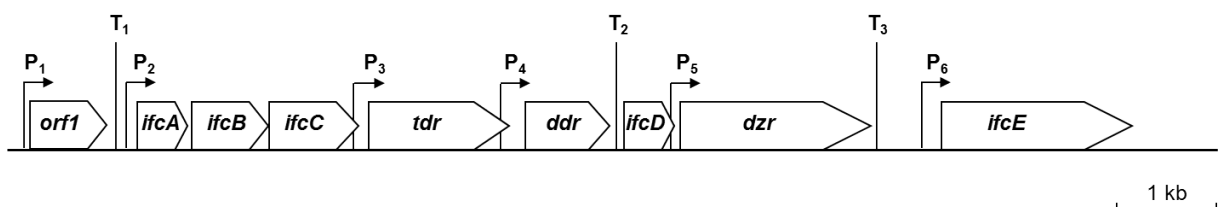
Hinsichtlich der Gengröße fanden sich nur geringfügige Unterschiede von 3 bis 21 Nukleotiden bei Vergleich der fünf verschiedenen Spezies. Die Abweichung der intergenen Sequenzen betrug maximal 147 bp im Vergleich zu den intergenen Sequenzen des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens*. Einzig eine lange, nicht kodierende Sequenz von 665 bp zwischen *dzt* und *ifcE* von *S. isoflavoniconvertens* war zu keiner anderen Spezies mit den entsprechenden Genen vergleichbar (Abbildung 8). Während der Abstand zwischen den korrespondierenden Genen von *dzt* und *ifcE* in *Slackia* sp. Stamm NATTS 296 bp betrug, waren bei *Lactococcus* sp. Stamm 20-92, *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* ein bis zwei zusätzliche Gene eingeschoben.

### 3.2.3 Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation

Sowohl in *S. isoflavoniconvertens* als auch in vier weiteren Equol-produzierenden Spezies werden die vermuteten Daidzein-umwandelnden Proteine durch Gene kodiert, welche im Genom benachbart vorliegen. Auf der Grundlage potenzieller Sequenzen von Promotoren und Transkriptionsterminatoren wurde untersucht, ob die im Komplex vorliegenden Gene von *S. isoflavoniconvertens* einer gemeinsamen Transkription unterliegen könnten.

Die Analyse ergab zwanzig potenzielle Sigma-70-abhängige Promotoren für das gesamte 12 kb große DNA-Fragment von *S. isoflavoniconvertens* (Sequenz siehe Anhang). Aufgrund der hohen Übereinstimmung zur Konsensus-Sequenz der -10- und -35-Region Sigma-70-abhängiger Promotoren könnten die möglichen Promotoren genaufwärts von *orf1* (P<sub>1</sub>; Position -10-Region: 197 bp), *ifcA* (P<sub>2</sub>; Position -10-Region: 1.179 bp) und *ifcE* (P<sub>6</sub>; Position -10-Region: 9.093 bp) als funktionell angenommen werden (Abbildung 9). Weniger stark konservierte Sequenzen innerhalb der Gene *ifcC* (P<sub>3</sub>; Position -10-Region: 3.444 bp), *tdr* (P<sub>4</sub>; Position -10-Region: 4.824 bp) und *ifcD* (P<sub>5</sub>; Position -10-Region: 6.568 bp) könnten potenzielle Promotoren für die Gene *tdr*, *ddr* und *dzt* sein. Die Promotoren P<sub>3</sub> und P<sub>6</sub> beinhalten neben der klassischen -10- und -35-Promotorsequenz eine zusätzliche -16-Region mit dem für Gram-positive Bakterien typischen Motiv TRTG (R als Purinbase). Es wird vermutet, dass ein zusätzliches -16-Promotorelement die Funktion der -35-Region übernehmen kann und somit den Beginn der Transkription erleichtert [232].

Neben den Promotoren wurden auch drei mögliche Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren innerhalb der *S. isoflavoniconvertens*-Sequenz identifiziert (Abbildung 9). Für die Ausbildung der typischen haarnadelförmigen Sekundärstrukturen wurden DNA-Abschnitte genabwärts der Gene *orf1* (Position 1.130 bis 1.154 bp), *ddr* (Position 6.069 bis 6.096 bp) und *dzt* (Position 8.695 bis 8.718 bp) erkannt. Die große Anzahl der potenziellen Promotoren und Terminatoren spricht zusammenfassend für die Bildung von zusätzlichen kleinen Transkripten statt nur eines einzigen, alle Gene umfassenden Transkripts.



**Abbildung 9: Genorganisation des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens* mit den potenziellen Promotoren und Transkriptionsterminatoren.**

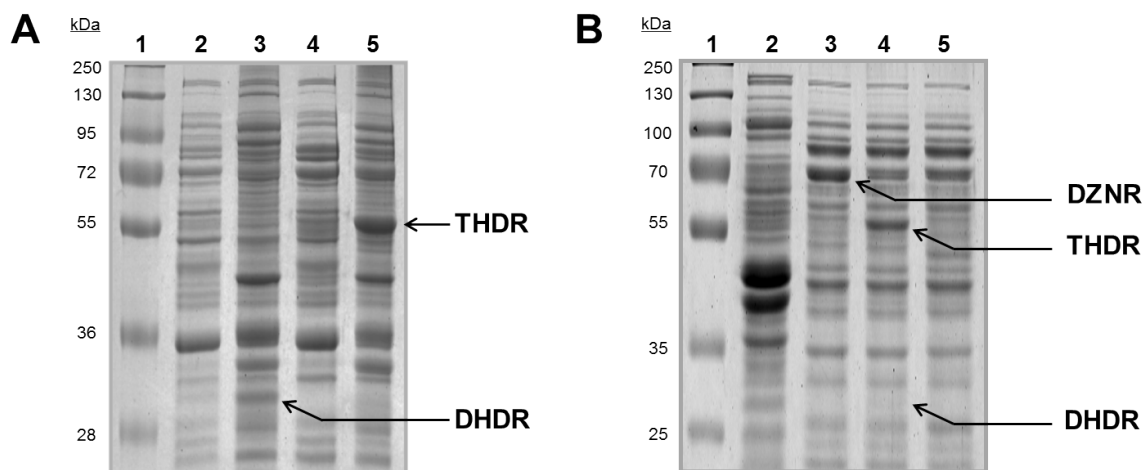
Schematisch dargestellt sind die innerhalb des 12 kb großen Genfragments postulierten sechs Sigma-70-abhängigen Promotoren (P) und die drei Rho-unabhängigen Transkriptionsterminatoren (T).

### 3.3 Funktionelle Expression der Daidzein-umsetzenden Enzyme von *Slackia isoflavoniconvertens*

Identitätsanalysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen Daidzein-induzierter Gene identifizierten die *S. isoflavoniconvertens*-Proteine THDR, DHDR, DZNR und IfcE als potenzielle Oxidoreduktasen. Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung zu den Daidzein-umsetzenden Enzymen von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 und *Slackia* sp. Stamm NATTS wurden Expressionsexperimente in *E. coli* durchgeführt, um die Funktion von THDR, DHDR und DZNR in *S. isoflavoniconvertens* aufzuklären.

#### 3.3.1 Heterologe Expression in *Escherichia coli*

In ersten Experimenten wurden die Gene *tdr* und *ddr* in *E. coli* JM109 einzeln subkloniert und ihre Expression mittels SDS-PAGE überprüft. Die Analyse des Zellextrakts der erzeugten Klone ließ die Expression von *tdr* [in *E. coli* JM109(pIFtdr)] und *ddr* [in *E. coli* JM109(pIFddr)] erkennen (Abbildung 10 A). Die apparente Masse von 30 und 55 kDa stimmte mit der berechneten molekularen Masse von THDR und DHDR überein.



**Abbildung 10: SDS-PAGE-Analyse von Zellextrakten der *tdr*-, *ddr*- und *dzt*-exprimierenden *E. coli*-Klone.**

(A) Vergleich des Anteils an rekombinantem Protein im Zellextrakt und in der unlöslichen Fraktion von *E. coli* JM109 nach Expression der *S. isoflavoniconvertens*-Gene *tdr* und *ddr* bei 37 °C. Spur 1, Größenstandard; Spur 2, lösliche Fraktion *E. coli* JM109(pIFddr); Spur 3, unlösliche Fraktion *E. coli* JM109(pIFddr); Spur 4, lösliche Fraktion *E. coli* JM109(pIFtdr); unlösliche Fraktion *E. coli* JM109(pIFtdr). (B) Koexpression der Gene *tdr*-*ddr* sowie Expression von *dzt* in *E. coli* KRX bei 25 °C. Spur 1, Größenstandard; Spur 2, lösliche Fraktion *S. isoflavoniconvertens*; Spur 3, lösliche Fraktion *E. coli* KRX(pIFdzt); Spur 4, lösliche Fraktion *E. coli* KRX(pIFtdr-ddr); Spur 5, lösliche Fraktion *E. coli* KRX(pGEM-T Easy) (Negativkontrolle). Die aufgetragene Proteinmenge betrug jeweils 10 µg.

Die SDS-PAGE-Analyse des Zellextrakts und der unlöslichen Fraktion von *E. coli* JM109 zeigte, dass THDR und DHDR nicht im Zellextrakt als lösliche Proteine vorlagen, sondern unlösliche Aggregate gebildet hatten (Abbildung 10 A). Diese auch als Einschlusskörper (*inclusion bodies*) bezeichneten Aggregate entstehen durch eine zu starke Genexpression und beinhalten nicht korrekt gefaltetes Protein. Um die Entstehung von Einschlusskörpern zu verhindern und den Anteil an gelöstem Protein zu erhöhen, wurde die Kultivierungstemperatur in allen weiteren Versuchen von 37 °C auf 25 °C gesenkt. Dies führte zur Erhöhung des Anteils an löslicher THDR und DHDR im Zellextrakt.

Eine basale Expression der Gene *tdr* und *ddr* erfolgte in den *E. coli* JM109-Klonen auch in Abwesenheit des *lac*-Induktors IPTG. Zur verbesserten Kontrolle der Genexpression wurden alle weiteren Klonierungen in *E. coli* KRX durchgeführt, in dem, je nach Orientierung des Inserts, die heterologe Expression vom *lac*- oder dem T7-Promotor abhängig war. Die Genexpression über den T7-Promotor unterlag der Kontrolle der durch Rhamnose induzierbaren T7-RNA-Polymerase. Aufgrund des direkten Aufeinanderfolgens von *tdr* und *ddr* im identifizierten Genkomplex von *S. isoflavoniconvertens* wurden beide Gene in *E. coli* KRX koexprimiert. Die SDS-PAGE-Analyse des Zellextrakts des *tdr-ddr*-kodierenden Klons [*E. coli* KRX(pIFtdr-ddr)] ließ die gemeinsame Expression beider Gene erkennen (Abbildung 10 B). Trotz einer Kultivierungstemperatur von 25 °C bildeten Teile der rekombinanten THDR und DHDR unlösliche Aggregate. Die Koexpression von *tdr-ddr* führte auch zu einer stark verringerten Expression von *ddr* im Vergleich zum einzeln in *E. coli* JM109 exprimierten Gen (Abbildung 10 B).

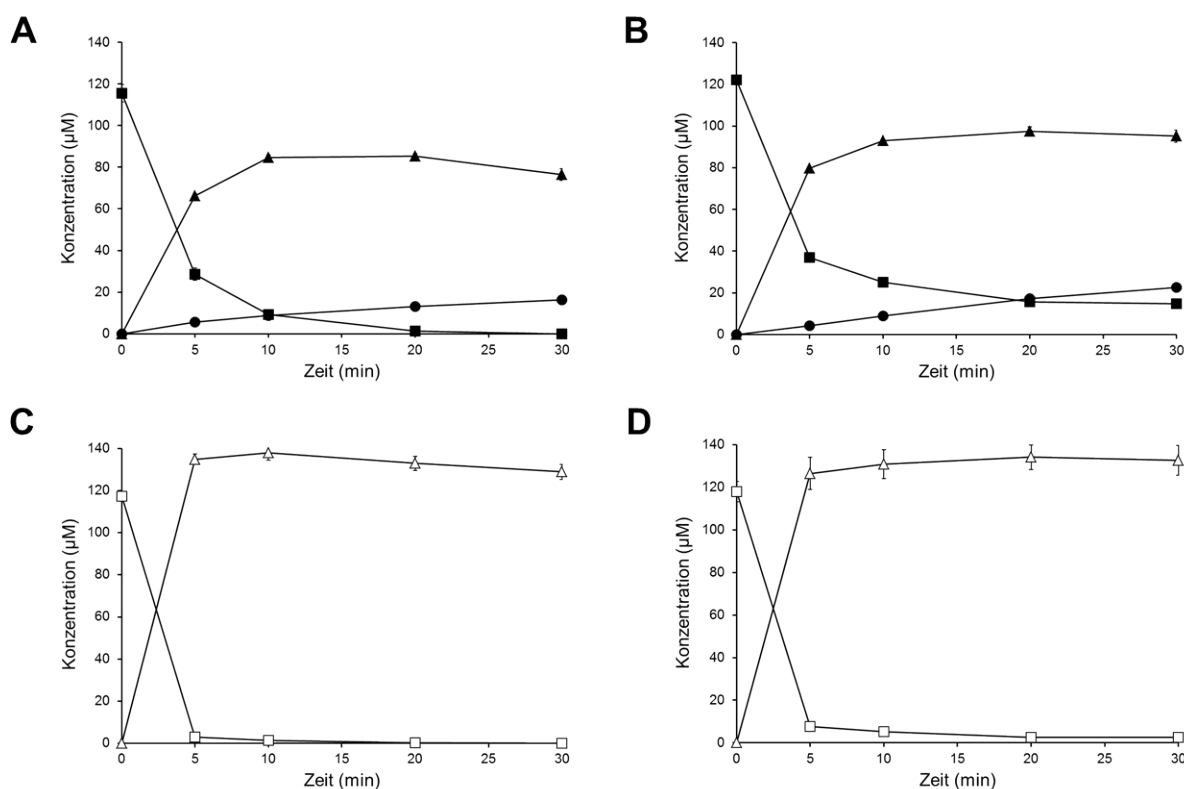
Die Analyse des Zellextrakts des *dzr*-kodierenden Klons *E. coli* KRX(pIFdzr) ließ die Expression des Gens als 70 kDa großes Protein im SDS-PAGE-Gel erkennen (Abbildung 10 B). Die apparente molekulare Masse korrelierte mit der berechneten Masse von DZNR. Wie die rekombinanten Proteine DHDR und THDR lag auch DZNR nach Inkubation bei 25 °C zum Teil in Form von unlöslichen Einschlusskörpern vor.

### 3.3.2 Nachweis der Daidzein-umsetzenden Aktivität heterologer Proteine

Für die Bestimmung der Daidzein- und Genistein umsetzenden Enzymaktivität wurde ein anoxischer Enzymtest im zellfreien System etabliert. Die Optimierung des enzymatischen Tests erfolgte mit dem Zellextrakt einer durch Daidzein induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur. Diese Ergebnisse werden im Folgenden kurz vorgestellt. Der optimierte anoxische Enzymtest wurde daraufhin zum Nachweis der enzymatischen Aktivität der heterolog exprimierten Proteine THDR, DHDR und DZNR verwendet.

#### Enzymatische Tests mit dem Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens*

Die Verwendung des Zellextrakts von *S. isoflavoniconvertens* führte in Gegenwart von NADPH zur vollständigen Reduktion von Daidzein und Genistein (Abbildung 11 A und C).



**Abbildung 11: Zeitlicher Verlauf der Umsetzung von Daidzein und Genistein unter anoxischen Bedingungen in Anwesenheit von NADPH.**

Umsetzung von Daidzein (A) und Genistein (C) durch den zellfreien Extrakt von *S. isoflavoniconvertens*. Die Kombination der Zellextrakte THDR/DHDR- und DZNR-exprimierender *E. coli*-Klone führte ebenso zur Reduktion von Daidzein (B) und Genistein (D). Daidzein, schwarze Quadrate; Dihydrodaidzein, schwarze Dreiecke; Equol, schwarze Kreise; Genistein, leere Quadrate; Dihydrogenistein, leere Dreiecke. Die Symbole repräsentieren die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken kennzeichnen den Standardfehler (SEM).

Proportional zum Substratverbrauch erfolgte die Bildung der Intermediate Dihydrodaidzein bzw. Dihydrogenistein sowie von geringen Mengen des Daidzein-Endprodukts Equol. Eine Umsetzung von Dihydrogenistein zu 5-Hydroxyequol konnte innerhalb von 30 min nicht beobachtet werden. Die Rate zur Bildung von Dihydrodaidzein aus Daidzein verringerte sich deutlich von  $36,0 \pm 1,1$  auf  $6,20 \pm 0,07$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>, wenn NADH statt NADPH als Koenzym verwendet wurde. Ohne den Zusatz eines Koenzyms betrug die Bildungsrate von Dihydrodaidzein  $3,93 \pm 0,01$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>. Die Entstehung des Daidzein-Endprodukts Equol wurde weder mit noch ohne NADH während der 30-minütigen Inkubation beobachtet. Beim Einsatz von Dihydrodaidzein als Substrat wurde Equol in Anwesenheit von NADPH gebildet ( $0,36 \pm 0,01$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>).

Die Umsetzung von Genistein zu Dihydrogenistein in Anwesenheit von NADPH verlief im Vergleich zur Reduktion von Daidzein mit einer 1,8-fach höheren Bildungsrate ( $63,5 \pm 1,7$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>). Wie für die Umsetzung von Daidzein beobachtet, verringerte sich die Umsatzrate von Genistein deutlich in Anwesenheit von NADH ( $9,85 \pm 0,08$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>) sowie ohne einen zugesetzten Kofaktor ( $6,48 \pm 0,04$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>). Die Umsetzung von Genistein bzw. Dihydrogenistein zu 5-Hydroxyequol konnte in Anwesenheit von NADPH nicht beobachtet werden.

### Enzymatische Tests mit den Zellextrakten rekombinanter *E. coli*-Klone

Die Kombination von Zellextrakten der für DZNR kodierenden [*E. coli* KRX(pIFdzt)] und der für THDR/DHDR kodierenden [*E. coli* KRX(pIFtdr-ddr)] *E. coli*-Klone führte zur Umsetzung von Daidzein über Dihydrodaidzein zu Equol (Abbildung 11 B). Bei Inkubation von Genistein mit den kombinierten Extrakten erfolgte die vollständige Umsetzung zu Dihydrogenistein (Abbildung 11 D). Die weitere Reduktion zum Endprodukt 5-Hydroxyequol wurde nicht beobachtet.

In Anwesenheit von NADPH betrug die Bildungsrate von Dihydrodaidzein aus Daidzein  $27,1 \pm 0,4$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>. Genistein wurde unter identischen Bedingungen 3,3-fach schneller zu Dihydrogenistein umgesetzt ( $89,9 \pm 3,8$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>). In Anwesenheit von NADH war die Bildungsrate von Dihydrodaidzein ( $0,35 \pm 0,11$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>) und Dihydrogenistein ( $0,02 \pm 0,01$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>) geringer. Eine Umsetzung von Daidzein und Genistein ohne den Zusatz von NAD(P)H erfolgte nicht. Es zeigte sich, dass Daidzein und Genistein nur in Anwesenheit des DZNR-enthaltenen *E. coli*-Zellextrakts umgesetzt wurden. Die Reduktion von Dihydrodaidzein zu Equol erfolgte durch den Zellextrakt des für THDR/DHDR kodierenden *E. coli*-Klons in Anwesenheit von NADPH ( $0,33 \pm 0,01$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>) oder NADH ( $0,18 \pm 0,00$  nmol min<sup>-1</sup> mg Protein<sup>-1</sup>). Die Kombination von Zellextrakten der einzelnen für THDR kodierenden [*E. coli* JM109(pIFtdr)] und DHDR kodierenden [*E. coli* JM109(pIFddr)] *E. coli*-Klone führte nicht zur Umsetzung von Dihydrodaidzein zu Equol.



Die mit den Zellextrakten der für DZNR- und THDR/DHDR-kodierenden *E. coli*-Klone durchgeführten enzymatischen Tests bestätigten die Funktion dieser Proteine als Daidzein- und Genistein-reduzierende Enzyme. So katalysierte das Genprodukt von *dzr* die Reduktion von Daidzein zu Dihydrodaidzein und wurde somit als Daidzein-Reduktase (DZNR) identifiziert. Neben Daidzein setzte die DZNR auch Genistein zu Dihydrogenistein um. Die Koexpression von *tdr* und *ddr* führte zur Umsetzung von Dihydrodaidzein zu Equol. Da das Intermediat Tetrahydrodaidzein kommerziell nicht verfügbar war, konnte die Zuordnung der Tetrahydrodaidzein-Reduktase zu THDR oder DHDR nicht direkt erfolgen. Anhand von Sequenzübereinstimmungen zur den experimentell identifizierten Proteinen von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 und *Slackia* sp. Stamm NATTS wurde THDR als Tetrahydrodaidzein-Reduktase und DHDR als Dihydrodaidzein-Reduktase in *S. isoflavoniconvertens* identifiziert. Die Funktion der beiden Enzyme im Genistein-Metabolismus bleibt unklar, da weder die Umsetzung von Dihydrogenistein noch die Bildung von 5-Hydroxyequol durch DHDR und THDR im Enzymtest beobachtet wurde.

### 3.4 Reinigung der rekombinanten, durch Daidzein induzierten Proteine unter nativen Bedingungen

#### 3.4.1 Fusion der Daidzein-umsetzenden Enzyme an verschiedene Affinitäts-tags

Die Reinigung diente als Voraussetzung zur detaillierten Charakterisierung der durch Daidzein induzierten Proteine. Für die Bestimmung des am besten geeigneten Affinitäts-tags wurden die Gene der Tetrahydrodaidzein-Reduktase (THDR), der Dihydrodaidzein-Reduktase (DHDR) und der Daidzein-Reduktase (DZNR) von *S. isoflavoniconvertens* an vier verschiedene tags fusioniert. Zusätzlich erfolgte die Koexpression der für die THDR und DHDR kodierenden Gene. Als Affinitäts-tags wurden jeweils das *Strep(II)*-, His- und FLAG-tag sowie das 26 kDa große GST-tag verwendet. Diese wurden bis auf das *Strep(II)*-tag an das N-terminale Ende der drei Reduktasen gekoppelt.

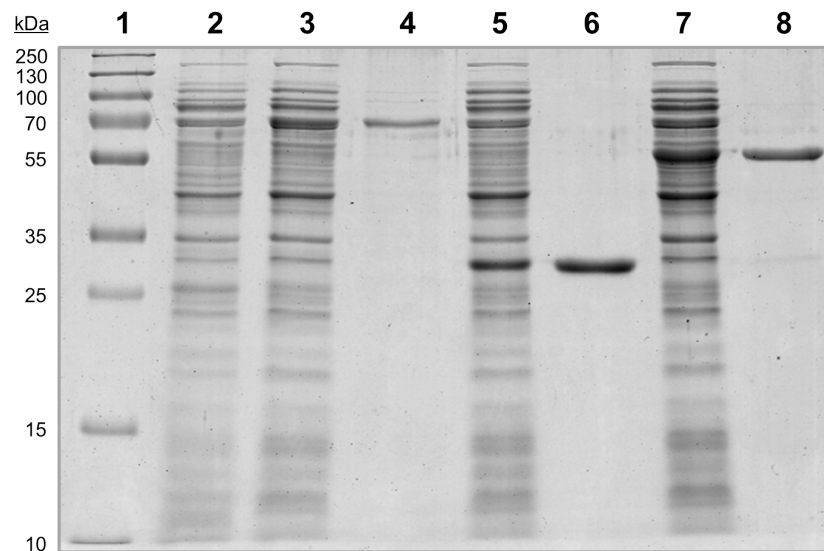
Für die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte die heterologe Expression der fusionierten Proteine unter anaeroben Bedingungen. Nach Präparation der *E. coli*-Zellextrakte und SDS-PAGE-Analyse zeigte sich, dass alle Fusionsproteine bis auf die GST-tag gekoppelte DZNR (ca. 96 kDa) exprimiert wurden. Enzymatische Tests mit den Zellextrakten der für DZNR kodierenden *E. coli*-Klone führten bei der Umsetzung von Daidzein zu Dihydrodaidzein zu einer Bildungsrate von  $13,7 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  bei Verwendung der *Strep*-DZNR. Eine niedrigere Umsatzrate von  $8,0 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  wurde für die FLAG-gekoppelte DZNR ermittelt sowie für die His-tag-gekoppelte DZNR mit  $2,2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$ . Die Reduktion von Dihydrodaidzein zu Equol erfolgte mit einer Bildungsrate von  $0,6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  für die *Strep*-fusionierte THDR/DHDR. Eine ähnliche Aktivität von  $0,5 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg Protein}^{-1}$  wurde mit der FLAG-tag-gekoppelten THDR/DHDR erreicht. Trotz der in der SDS-PAGE-Analyse sichtbaren Expression der His- und GST-gekoppelten THDR/DHDR wurde keine Equolbildung durch die Fusionsproteine beobachtet.

#### 3.4.2 Reinigung der Daidzein-induzierten Proteine als *Strep*-Fusionsproteine

##### Reinigung der Enzyme THDR, DHDR und DZNR

Von den vier getesteten Affinitäts-tags besaßen die C-terminal gekoppelten *Strep(II)*-tag-Proteine die höchste Aktivität. Bei der aeroben Kultivierung der DHDR-, THDR- und DZNR-exprimierenden *E. coli*-Klone wurde in oxischen Enzymtests keine Daidzein- und Genistein-reduzierende Aktivität der *Strep*-Enzyme festgestellt. Dies zeigte die Sen-

sitivität der Enzyme gegenüber Sauerstoff. Aus diesem Grund erfolgte die Reinigung der THDR, DHDR, DZNR und weiterer durch Daidzein induzierter Proteine unter anoxischen Bedingungen. Die Reinigung aus dem Zellextrakt der entsprechenden THDR-tragenden [*E. coli* KRX(pSTtdr)] und DHDR-tragenden [*E. coli* KRX(pSTddr)] *E. coli*-Klone führte zu einer Ausbeute von 25 % an THDR und 32 % an DHDR (Abbildung 12).



**Abbildung 12: SDS-PAGE-Analyse der aus *E. coli*-Zellextrakten gereinigten *Strep(II)*-Fusionsproteine DZNR, DHDR und THDR.**

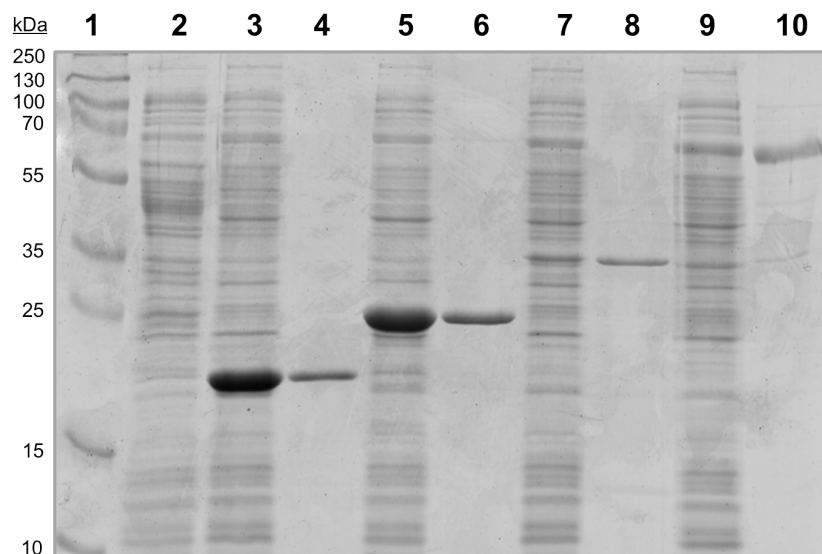
Aufgetragen wurden die Zellextrakte der entsprechenden *E. coli*-Klone (10 µg Protein) und die daraus gereinigten *C*-terminal gekoppelten Reduktasen (1 µg Protein). Spur 1, Größenstandard; Spur 2, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pGEM-T Easy) (Negativkontrolle); Spur 3, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTdzt); Spur 4, gereinigte DZNR (71 kDa); Spur 5, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTddr); Spur 6, gereinigte DHDR (30 kDa); Spur 7, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTtdr); Spur 8, gereinigte THDR (56 kDa).

Die gereinigte THDR erschien in der Elutionsfraktion mit der höchsten Konzentration als gelb gefärbtes Protein. Die in *E. coli* KRX(pSTdzt) exprimierte *Strep*-DZNR wurde mit einer Ausbeute von 0,4 bis 1,2 % aus dem Zellextrakt gereinigt. Aufgrund der geringen Ausbeute an DZNR wurde zusätzlich ein *N*-terminales *Strep(II)*-Protein generiert. Die Ausbeute an DZNR konnte jedoch nicht gesteigert werden. SDS-PAGE-Analysen der Waschfraktionen zeigten, dass die DZNR bereits in der Waschphase eluiert wurde. Wahrscheinlich waren die *C*- und *N*-terminalen *tags* der DZNR nicht ausreichend exponiert, so dass die Bindung des Proteins nur eingeschränkt möglich war.

### Reinigung der Proteine IfcA, IfcB, IfcC und IfcE

Neben THDR, DHDR und DZNR gehören auch IfcA, IfcB, IfcC und IfcE zu den durch Daidzein induzierten Proteinen in *S. isoflavoniconvertens*. Für die Reinigung dieser Proteine wurden *E. coli*-Klone generiert, welche die *Strep(II)*-Proteine IfcA [*E. coli* KRX (pSTifcA)], IfcB [*E. coli* KRX(pSTifcB)], IfcC [*E. coli* KRX(pSTifcC)] und IfcE [*E. coli* KRX(pSTifcE)] kodierte. Die Fusion des *Strep(II)*-tags an die entsprechenden Proteine erfolgte *C*-terminal.

Für die SDS-PAGE-Analyse in Abbildung 13 wurden die *E. coli*-Klone aerob kultiviert und die Zellextrakte oxisch präpariert. Es zeigte sich eine deutliche Überexpression der Gene *ifcA* und *ifcB* und eine schwache Expression von *ifcC* und *ifcE*. Eine vollständige Reinigung aus dem *E. coli*-Zellextrakt erfolgte für IfcA mit 32 % und IfcB mit 23 %. Eine geringere Ausbeute ergab die Reinigung von IfcE mit 5 % und IfcC mit 2 % . Wurde der für IfcE kodierende *E. coli*-Klon anaerob statt aerob kultiviert, eluierte IfcE als gelbbraun gefärbtes Protein. Diese Färbung wurde auch bei der Reinigung unter oxischen Bedingungen beobachtet. Die heterologe Expression von IfcD als *C*-terminal gekoppeltes *Strep(II)*-Fusionsprotein war nicht nachweisbar. Eine Reinigung von IfcD erfolgte aus diesem Grund nicht.

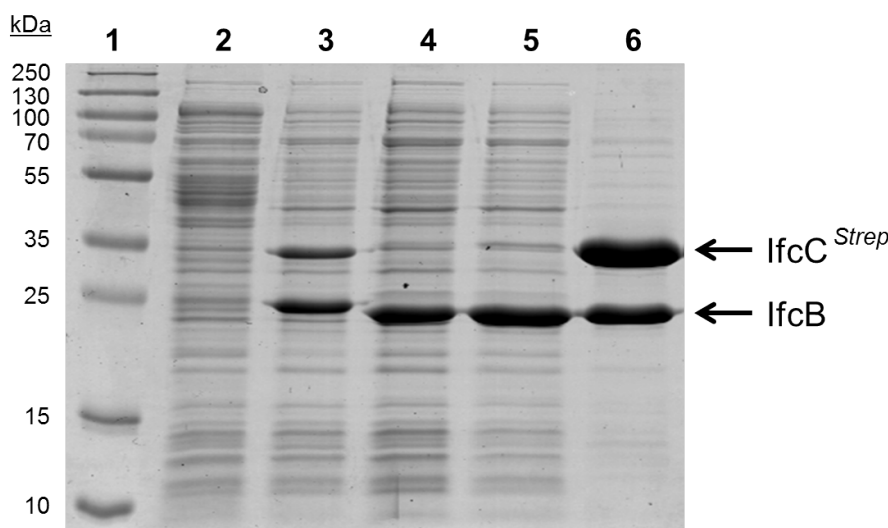


**Abbildung 13: SDS-PAGE der aus *E. coli*-Zellextrakten gereinigten *Strep(II)*-Fusionsproteine IfcA, IfcB, IfcC und IfcE.**

Aufgetragen wurden die Zellextrakte der entsprechenden *E. coli*-Klone (10 µg Protein) und die daraus gereinigten *C*-terminal gekoppelten Genprodukte (1 µg Protein). Spur 1, Größenstandard; Spur 2, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pGEM-T Easy) (Negativkontrolle); Spur 3, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTifcA); Spur 4, gereinigtes IfcA (18 kDa); Spur 5, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTifcB); Spur 6, gereinigtes IfcB (27 kDa); Spur 7, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTifcC); Spur 8, gereinigtes IfcC (34 kDa); Spur 9, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTifcE); Spur 10, gereinigtes IfcE (67 kDa).

### Reinigung von IfcBC als heterodimeres Protein

Sequenzanalysen der Genprodukte IfcC und IfcB aus *S. isoflavoniconvertens* wiesen auf Ähnlichkeiten zu der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der Elektronentransfer-Flavoproteine (ETF) hin. Die Untereinheiten bilden sowohl in pro- als auch eukaryontischen ETFs ein Heterodimer, welches mindestens ein FAD nicht kovalent bindet [220]. Aus diesem Grund wurden die Gene *ifcB* und *ifcC* in einem neu generierten Klon [*E. coli* KRX(pSTifcBC)] koexprimiert. Für die Reinigung des Heterodimers erfolgte die Fusion des *Strep*(II)-tags an das C-terminale Ende von IfcC. Sowohl bei aerober als auch bei anaerober Kultivierung von *E. coli* KRX(pSTifcBC) war das präparierte Zellextrakt stark gelb gefärbt. Dies deutete bereits auf ein überexprimiertes Flavoprotein hin.



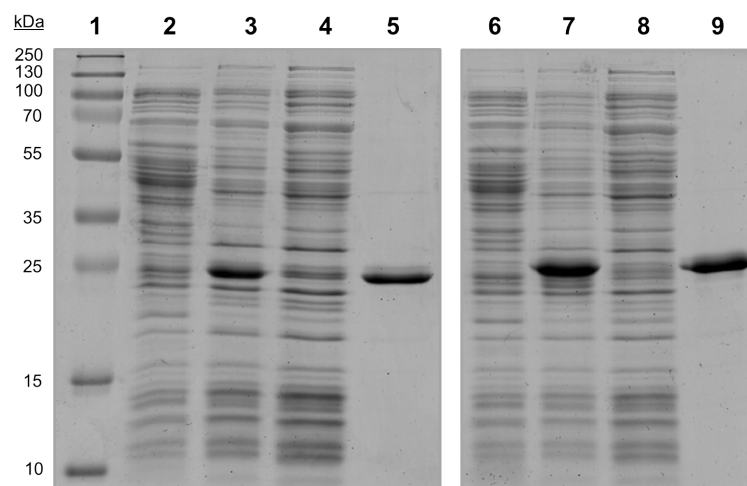
**Abbildung 14: SDS-PAGE-Analyse des aus *E. coli*-Zellextrakt gereinigten Heterodimers IfcBC.**

Dargestellt ist die Reinigung des C-terminal gekoppelten *Strep*-Proteins IfcBC. Die aufgetragene Proteinmenge betrug jeweils 10  $\mu$ g bzw. 7,5  $\mu$ g für die zweite Waschfraktion. Spur 1, Größenmarker; Spur 2, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pGEM-T Easy) (Negativkontrolle); Spur 3, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTifcBC); Spur 4, erste Waschfraktion; Spur 5, zweite Waschfraktion; Spur 6, gereinigtes IfcBC (Banden bei 26 und 34 kDa).

Die SDS-PAGE-Analyse der Reinigungsfraktionen zeigte, dass IfcB und IfcC gemeinsam eluiert werden, obwohl nur IfcC durch das C-terminale *Strep*-tag an die Reinigungssäule binden konnte (Abbildung 14, Spur 6). Dies bestätigte, dass IfcB und IfcC Untereinheiten eines Komplexes sind. Die Ausbeute an IfcBC betrug 7–10 %. Im Gegensatz zu IfcC verblieb ein Teil von IfcB in den Waschfraktionen (Abbildung 14, Spur 4 und 5). Mögliche Ursache könnte zum einem die instabile Bindung von IfcB an IfcC sein. Zum anderen würde die stärkere Expression von IfcB zu einem fehlenden IfcC-Bindungspartner führen.

### Reinigung des potenziellen Transkriptionsfaktors Orf1

Die 2D-DIGE-Analyse von Proteinen einer mit Daidzein inkubierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur zeigte, dass das Genprodukt Orf1 nicht induziert wurde. Da sich Sequenzübereinstimmungen zu Transkriptionsfaktoren fanden und *orf1* in benachbarter Position zum durch Daidzein induzierten Genkomplex vorliegt, könnte Orf1 regulatorische Funktionen besitzen. Zur Aufklärung der Funktion wurde Orf1 mittels eines *C*-terminalen *Strep*-tags gereinigt. Das Genprodukt von *orf1* besitzt mit Valin (GTG-Codon; 255 aa Genprodukt), Leucin (TTG-Codon; 241 aa Genprodukt) und Methionin (ATG-Codon; 229 aa Genprodukt) mehrere potenzielle Startcodons. Für die Reinigung der unterschiedlich langen Orf1-Genprodukte wurden *E. coli*-Klone generiert, welche die *Strep*(II)-Proteine Orf1-Val [*E. coli* KRX(pSTorf1V)], Orf1-Leu [*E. coli* KRX(pSTorf1L)] und Orf1-Met [*E. coli* KRX(pSTorf1M)] kodierten. Bei der Generierung der Expressionsplasmide wurden die unterschiedlichen Startcodons methodenbedingt durch das Methionin-Codon ATG ersetzt.



**Abbildung 15: SDS-PAGE-Analyse der aus *E. coli*-Zellextrakt gereinigten Proteine Orf1-Val und Orf1-Leu.**

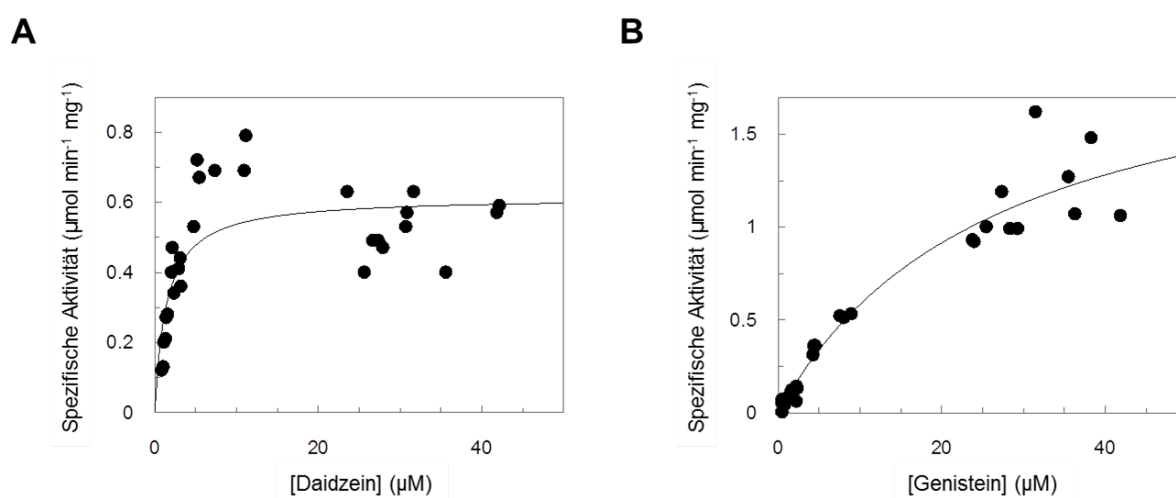
Dargestellt ist die Reinigung der *C*-terminal gekoppelten *Strep*-Proteine Orf1-Val und Orf1-Leu. Die aufgetragene Proteinmenge betrug 10 µg für Zellextrakte und Waschfraktionen bzw. 2,7 µg für die gereinigten Proteine. Spur 1, Größenmarker; Spur 2, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pGEM-T Easy) (Negativkontrolle); Spur 3, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTorf1V); Spur 4, erste Waschfraktion *E. coli* KRX(pSTorf1V); Spur 5, gereinigtes Orf1-Val (Bande bei 28 kDa); Spur 6, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pGEM-T Easy) (Negativkontrolle); Spur 7, Zellextrakt von *E. coli* KRX(pSTorf1L); Spur 8, erste Waschfraktion *E. coli* KRX(pSTorf1L); Spur 9, gereinigtes Orf1-Leu (Bande bei 27 kDa).

Für die SDS-PAGE-Analyse wurden die *E. coli*-Klone aerob kultiviert und die Zellextrakte oxisch präpariert. Es zeigte sich eine deutliche Überexpression von Orf1-Val und Orf1-Leu (Abbildung 15, Spur 3 und 7). Das 229 aa große Genprodukt Orf1-Met wurde nicht exprimiert. Die Reinigung aus dem *E. coli*-Zellextrakt erfolgte für Orf1-Val mit einer Ausbeute von 19 % und für Orf1-Leu mit 47 %.

### 3.5 Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität der Daidzein-induzierten Proteine

#### 3.5.1 Bestimmung der $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte für die Daidzein-Reduktase bei Umsetzung von Daidzein und Genistein

Für die Untersuchungen zur Substratspezifität wurde die gereinigte Daidzein-Reduktase (DZNR) mit den Substraten Daidzein bzw. Genistein inkubiert. Bei einer Substratkonzentration bis 10  $\mu\text{M}$  wurde Daidzein schneller zu Dihydrodaidzein umgesetzt als Genistein zu Dihydrogenistein (Abbildung 16). Bei erhöhten Substratkonzentrationen wurde der umgekehrte Effekt beobachtet. Der ermittelte  $K_m$ -Wert der DZNR für Genistein war mit  $26,7 \pm 8,3 \mu\text{M}$  deutlich höher als für Daidzein mit  $1,44 \pm 0,43 \mu\text{M}$ . Anhand des niedrigen  $K_m$ -Werts zeigte sich die größere Spezifität der DZNR für das Substrat Daidzein. Die Umsetzung von Daidzein erfolgte mit einer maximalen Reaktionsgeschwindigkeit von  $0,62 \pm 0,04 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$  langsamer als die von Genistein mit  $2,14 \pm 0,33 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ .



**Abbildung 16: Michaelis-Menten-Kinetik der gereinigten Daidzein-Reduktase für die Substrate Daidzein und Genistein.**

Dargestellt ist die spezifische Aktivität der Bildung von Dihydrodaidzein (A) und Dihydrogenistein (B) in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. Die Daten repräsentieren alle Werte von drei unabhängigen Messungen.

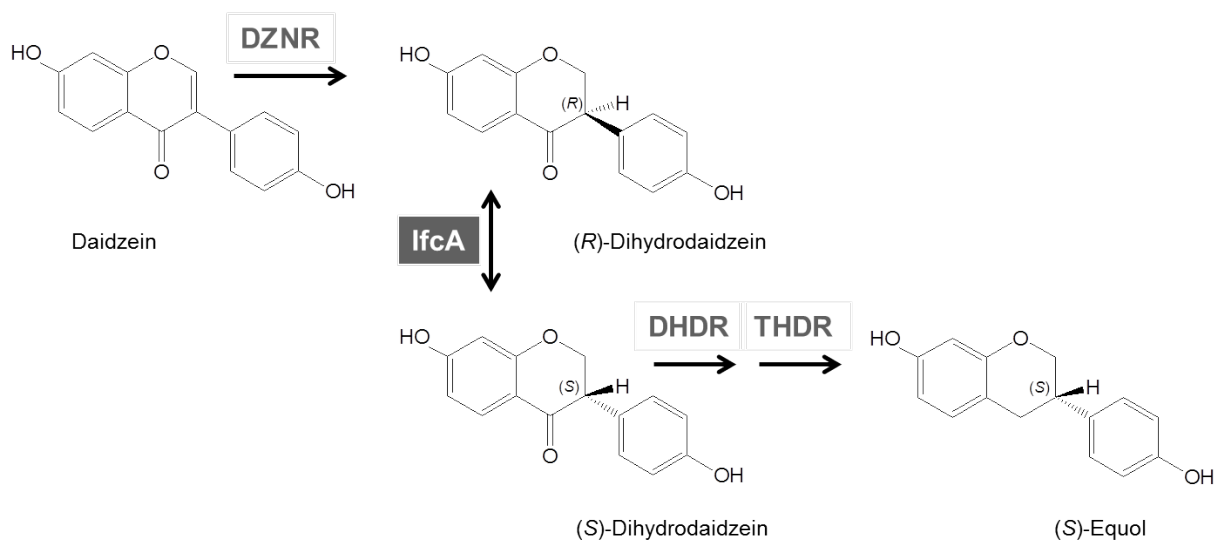
Die Daten der Daidzein-Umsetzung in Abbildung 16 A weisen auf eine Substratinhibition der DZNR bei steigender Daidzein-Konzentration hin. Dabei scheinen Konzentrationen an Daidzein höher als 10  $\mu\text{M}$  zur Inhibition der Daidzein-Reduktase zu führen. Diese Beobachtung müsste durch weiterführende Experimente bestätigt werden.

### 3.5.2 Identifizierung einer Dihydrodaidzein-Racemase

Die bei der Isoflavon-Umsetzung gebildeten Stereroisomeren wurden mittels einer chiralen HPLC-Säule identifiziert. Mit dem Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* durchgeführte Enzymtests zeigten, dass Daidzein zu einem racemischen Gemisch (Enantiomerenverhältnis von 1:1) aus (*S*)-Dihydrodaidzein (Retentionszeit [ $R_t$ ] = 8,6 min) und (*R*)-Dihydrodaidzein ( $R_t$  = 10,2 min) umgesetzt wurde. Als Daidzein-Endprodukt wurde ausschließlich das (*S*)-Enantiomer von Equol ( $R_t$  = 13,6 min) nachgewiesen. Die Reduktion von Genistein führte gleichfalls zu einem racemischen Gemisch aus (*S*)-Dihydrogenistein ( $R_t$  = 11,4 min) und (*R*)-Dihydrogenistein ( $R_t$  = 13,6 min).

Die Kombination der rekombinanten *E. coli*-Extrakte führte bei der Umsetzung von Daidzein zur Bildung von (*R*)-Dihydrodaidzein. Ab einer Inkubationszeit von 20 min wurde (*S*)-Dihydrodaidzein detektiert, welches nach 30 min 6 % des gebildeten Dihydrodaidzeins ausmachte. Als Endprodukt wurde (*S*)-Equol detektiert. Die Umsetzung von Genistein führte zur Bildung von (*R*)-Dihydrogenistein als Hauptenantiomer. Nach einer Reaktionszeit von 5 min wurde zusätzlich (*S*)-Dihydrogenistein gebildet und entsprach nach 30 min 25 % der Gesamtmenge an Dihydrogenistein.

Der Vergleich der gebildeten Enantiomere durch den Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* und *E. coli* zeigte, dass nur die Inkubation mit Extrakt von *S. isoflavoniconvertens* zu einem racemischen Gemisch an Dihydrodaidzein bzw. Dihydrogenistein führte. Das Ergebnis ließ auf ein, im Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* vorhandenes, Dihydrodaidzein- und Dihydrogenistein-racemisierendes Enzym schließen.



**Abbildung 17: Postulierte Umsetzungsreaktion von Daidzein zu (*S*)-Equol in *S. isoflavoniconvertens*.**

DZNR, Daidzein-Reduktase; IfcA, Dihydrodaidzein-Racemase; DHDR, Dihydrodaidzein-Reduktase; THDR, Tetrahydrodaidzein-Reduktase.



Aufgrund von Sequenzübereinstimmungen des induzierten Proteins IfcA zur bakteriellen Methylmalonyl-CoA-Epimerase könnte auch IfcA zur Enzymklasse der Isomerasen gehören. Die Kombination der DZNR- und THDR/DHDR-enthaltenen *E. coli*-Extrakte hatte gezeigt, dass vor allem das (*R*)-Enantiomer von Dihydrodaidzein und Dihydrogenistein bei der Umsetzung von Daidzein und Genistein entsteht. Die Anwesenheit eines *E. coli*-Extrakts mit der rekombinanten IfcA führte dahingegen zur Racemisierung der Metaboliten, bei der ein 1:1 Enantiomerenverhältnis an (*S*)- und (*R*)-Dihydrodaidzein bzw. Dihydrogenistein entstand. Demzufolge katalysiert das durch Daidzein induzierte Protein IfcA die Umsetzung des (*R*)-Enantiomers zum (*S*)-Enantiomer und ist funktionell eine Dihydrodaidzein- und Dihydrogenistein-Racemase.

Die chirale Metabolitenanalyse bei Verwendung der gereinigten DZNR ergab, dass ausschließlich die (*R*)-Enantiomere bei der Umsetzung von Daidzein und Genistein gebildet werden. Für die weiterführende Reaktion von Dihydrodaidzein zu Equol zeigte sich, dass statt des bei der Daidzein-Umsetzung gebildeten (*R*)-Enantiomers, (*S*)-Dihydrodaidzein das bevorzugte Substrat für das Enzym DHDR ist. Die Umsetzung von Daidzein und die nachgewiesenen chiralen Metaboliten sind in Abbildung 17 dargestellt.

### 3.5.3 Nachweis der NAD(P)H-Dehydrogenase-Aktivität der Elektronentransfer-Flavoproteine von *Slackia isoflavoniconvertens*

Die durch Daidzein induzierten Proteine IfcB und IfcC wurden als Heterodimer-Untereinheiten eines Elektronentransfer-Flavoenzym identifiziert. In der Zelle katalysieren diese den Transport von ein bis zwei Elektronen zwischen verschiedenen Flavin-haltigen Dehydrogenasen [220]. In artifiziellen Systemen lässt sich die Oxidation von NAD(P)H an die Reduktion eines chromogenen und nicht physiologischen Elektronenakzeptors koppeln. Dieses Charakteristikum einiger Flavoenzyme wird als NAD(P)H-Dehydrogenase-/Diaphorase-Aktivität bezeichnet [245]. Für die Aktivitätsbestimmung erfolgte die Reduktion des Farbstoffsubstrats DCPIP durch das gereinigte Elektronentransfer-Flavoprotein IfcBC im anoxischen Enzymtest. Dabei diente entweder NADH oder NADPH als Koenzym. Die Bildungsrate des reduzierten DCPIP betrug in Anwesenheit von NADPH  $33,8 \pm 5,4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ . Bei Verwendung von NADH verringerte sich die spezifische Aktivität zur Bildung von reduziertem DCPIP um die Hälfte ( $18,8 \pm 2,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg Protein}^{-1}$ ). Nach einmaligem Einfrieren des Proteins IfcBC bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  wurde das Absinken der spezifischen Enzymaktivität um bis zu 67 % (mit NADPH) und 57 % (mit NADH) beobachtet.

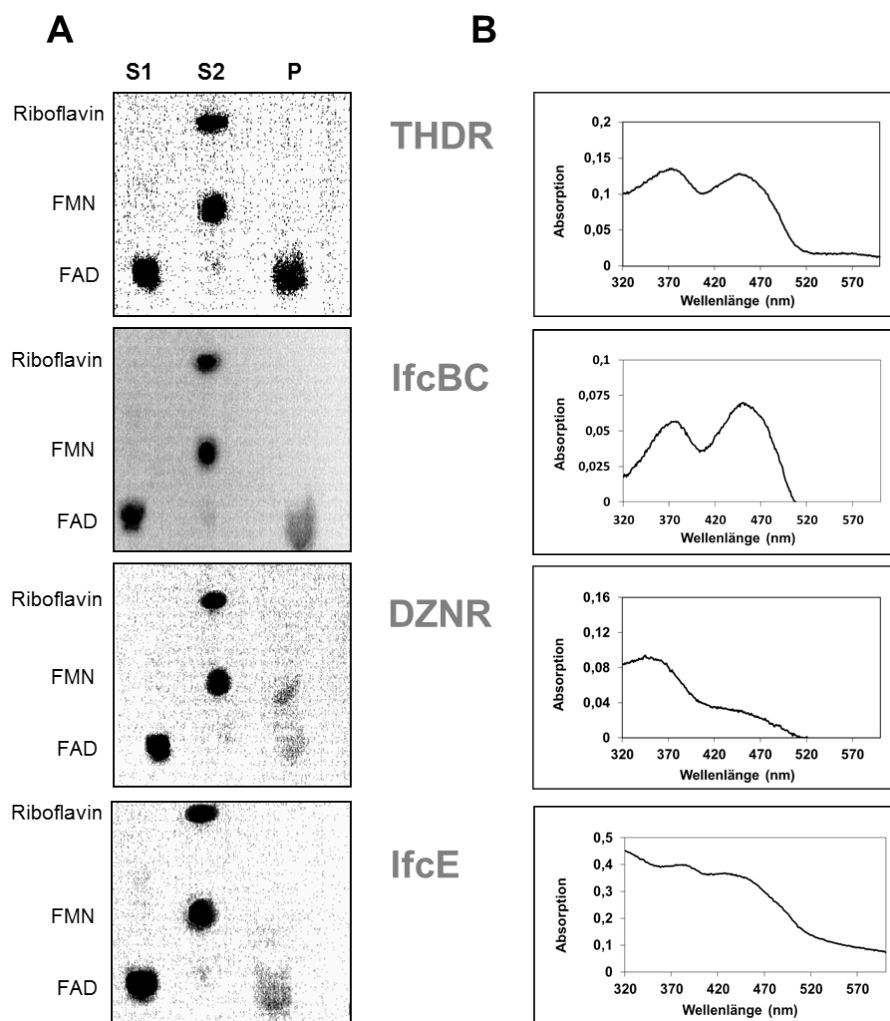
### 3.5.4 Verwendung aller rekombinanten, durch Daidzein induzierten Proteine bei der Umsetzung von Daidzein

Die Kombination der DZNR-, DHDR- und THDR-enthaltenen *E. coli*-Extrakte führte zwar zur Umsetzung von 50  $\mu\text{M}$  Daidzein, jedoch waren die detektierten Konzentrationen an Equol mit  $0,43 \pm 0,04 \mu\text{M}$  durchgehend gering. Die sehr geringe Konzentration an Equol war dabei auf die Verwendung der einzeln exprimierten DHDR und THDR zurückzuführen. Um die enzymatische Aktivität zu erhöhen, wurden alle rekombinanten, durch Daidzein induzierten Proteine miteinander kombiniert. Dazu wurde jeweils der Zellextrakt der *Strep*-Fusionsprotein-kodierenden *E. coli*-Klone verwendet. Bei Anwesenheit der Dihydrodaidzein-Racemase (IfcA) im Testansatz mit DZNR, DHDR und THDR verdoppelte sich die Konzentration an Equol auf  $0,90 \pm 0,06 \mu\text{M}$ . Enthielt ein Enzymtest-Ansatz zusätzlich das Elektronentransfer-Flavoprotein IfcBC, konnte eine weitere Erhöhung der Equolkonzentration auf  $1,32 \pm 0,02 \mu\text{M}$  beobachtet werden. Die Kombination aller Daidzein-induzierten Proteine mit IfcE erhöhte die Menge an Equol mit  $1,39 \pm 0,09 \mu\text{M}$  kaum. Bezüglich der Verwendung von Genistein wurde auch mit den kombinierten Proteinen keine Umsetzung zum Endprodukt 5-Hydroxyequol beobachtet.

## 3.6 Identifizierung von enzyme-spezifischen Kofaktoren der durch Daidzein induzierten Proteine von *S. isoflavoniconvertens*

### 3.6.1 Charakterisierung der Flavinkofaktoren

Während der Reinigung der durch Daidzein induzierten Proteine wurde eine hellgelbe Färbung von THDR und IfcBC sowie eine gelb-braune Färbung von IfcE beobachtet. Diese Färbung deutete bereits auf gebundene Flavinkofaktoren hin. Die Analyse der unter anoxischen Bedingungen aufgenommenen UV/Vis-Spektren ergab für THDR und IfcBC charakteristische Flavin-Absorptionsmaxima bei 370 und 450 nm (Abbildung 18 B). Deutlich schwächer ausgeprägte Maxima zeigten sich auch bei der UV/Vis-Analyse von IfcE. Eine Peak-Schulter bei 330 nm könnte bei IfcE auf Eisen-Schwefel-Zentren zurückzuführen sein, für welche auch die bräunliche Färbung des Proteins charakteristisch sind. Die Identifizierung der Flavinkofaktoren erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC). Für die gereinigten Proteine THDR und IfcBC wurde mit einem  $R_f$ -Wert von 0,17 und 0,15 FAD als Kofaktor bestimmt (Abbildung 18 A). Da FAD im Überstand der gefällten Proteine nachgewiesen wurde, liegt FAD in THDR als auch in IfcBC als nicht kovalent gebundener Kofaktor vor.



**Abbildung 18: Nachweis der Flavinkofaktoren von THDR, IfcBC, DZNR und IfcE.** (A) Dünnschichtchromatographie der Flavin-Standards und der Überstände der Proteinfällung. Die Fällung erfolgte aus dem gereinigten Protein (IfcBC, THDR) oder aus dem *E. coli*-Zellextrakt (DZNR, IfcE). S1, Flavin-Standard FAD; S2, Flavin-Standard Riboflavin und FMN; P, Probe. (B) UV/Vis-Absorptionsspektren der gereinigten Proteine THDR (1,48 mg/ml), IfcBC (0,94 mg/ml), DZNR (0,24 mg/ml) und IfcE (0,61 mg/ml), aufgenommen unter anoxischen Bedingungen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte gegen Elutionspuffer.

Die DC-Analyse der gereinigten DZNR und IfcE führte zu keinem sichtbaren Signal, da die Proteinkonzentration zu gering war. Bei Verwendung der gelb gefärbten DZNR- und IfcE-haltigen *E. coli*-Zellextrakte wurde FAD ( $R_f = 0,17$  für DZNR;  $R_f = 0,18$  für IfcE) im Vergleich zur Kontrolle als nicht kovalent gebundene Flavinkomponente identifiziert (Abbildung 18 A). Zusätzlich zeigte die DZNR-Probe eine schwache Bande auf Höhe des FMN-Standards ( $R_f = 0,32$ ).

Mittels HPLC-Analyse wurde die Flavin-Konzentration in den Überständen nach der Proteinfällung bestimmt. Die Analyse bestätigte FAD als die in THDR, IfcBC, IfcE und

DZNR vorhandene Flavinkomponente. Für die stark gelb gefärbten Proteine wurde ein FAD-Gehalt von 0,2–0,5 mol pro mol THDR sowie 0,7–1,0 mol FAD pro mol IfcBC nachgewiesen. IfcE enthielt 1,17–1,61 mol FAD pro mol Protein. Der bestimmte FAD-Gehalt für DZNR betrug 0,46 mol FAD pro mol Protein. Für die Daidzein-Racemase IfcA und die Dihydrodaidzein-Reduktase DHDR wurde mittels DC-Analyse und UV/VIS-Spektroskopie kein Flavinkofaktor nachgewiesen.

### 3.6.2 Untersuchungen zu Eisen-Schwefel-Zentren

Die gelb-braune Färbung des gereinigten Proteins IfcE und ein Aminosäuren-Bindemotiv deuteten auf ein Eisen-Schwefel-Zentrum hin. Der Nachweis dieses Kofaktors erfolgte über die Bestimmung des Nicht-Häm-Eisens und des säurelabilen Schwefels. Zweiwertiges Eisen, welches nicht an eine Hämgruppe gebunden ist, wird durch eine Komplexbildung mit Ferrozin photometrisch nachgewiesen. Die Analyse ergab für zwei unabhängige Messungen einen mittleren Gehalt von 11 mol Eisen pro mol IfcE.

Der Nachweis von säurelabilem Schwefel erfolgte durch die Bildung des kolorimetrisch nachweisbaren Farbstoffs Methylenblau. Die ermittelte Menge an Schwefel betrug in zwei unabhängigen Proben  $15,4 \pm 3,0$  und  $25,0 \pm 3,9$  mol Schwefel pro mol IfcE. Die Varianz der ermittelten Werte könnte auf die Nachweismethode als auch auf die Präparation des Proteins zurückzuführen sein. Die Kombination beider Methoden führte zum qualitativen Nachweis des Eisen-Schwefel-Zentrums von IfcE, jedoch erlaubten sie keine Aussage über die Art des gebundenen Zentrums.

### 3.7 Untersuchungen zur nativen Struktur

Die Analyse zur Quartärstruktur der gereinigten, durch Daidzein induzierten Proteine erfolgte mittels nativer Gelelektrophorese. Für IfcBC und DZNR wurde jeweils eine einzelne starke Bande nachgewiesen. Es zeigte sich, dass das aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit zusammengesetzte Elektronentransfer-Flavoprotein IfcBC als Heterodimer mit einer apparenten molekularen Masse von 63 kDa vorlag (Tabelle 5). Dies stimmte mit der berechneten Größe von 59 kDa überein. Mit einer molekularen Masse von 90 kDa wurde DZNR als monomeres Enzym identifiziert.

Aufgrund mehrerer detektierter Banden waren für die Proteine IfcA, THDR, DHDR und IfcE mehrere Quartärstrukturen möglich (Tabelle 5). Hierbei zeigte das gereinigte Protein IfcE nach der elektrophoretischen Trennung ein gleichmäßiges Stufenmuster mit insgesamt sieben Banden zwischen 129 und 614 kDa. Vor allem bei den hochmolekularen Proteinbanden könnte es sich um aggregiertes IfcE handeln.

**Tabelle 5: Mögliche Quartärstruktur der gereinigten, durch Daidzein induzierten Proteine nach nativer Gelelektrophorese.**

Protein	Molekulare Masse (kDa)	Apparente Masse <sup>a</sup> (kDa)	Proteinkomplex
IfcA	17	33	Trimer
		<u>50</u>	
IfcB/IfcC	26/33	<u>63</u>	Heterodimer
THDR	55	75	Dimer
		<u>136</u>	
		230	
DHDR	29	86	Tetramer
		<u>119</u>	
DZNR	70	<u>90</u>	Monomer
IfcE	66	<u>129</u>	Dimer
		190	
		265	
		436	
		501	
		561	
		<u>614</u>	

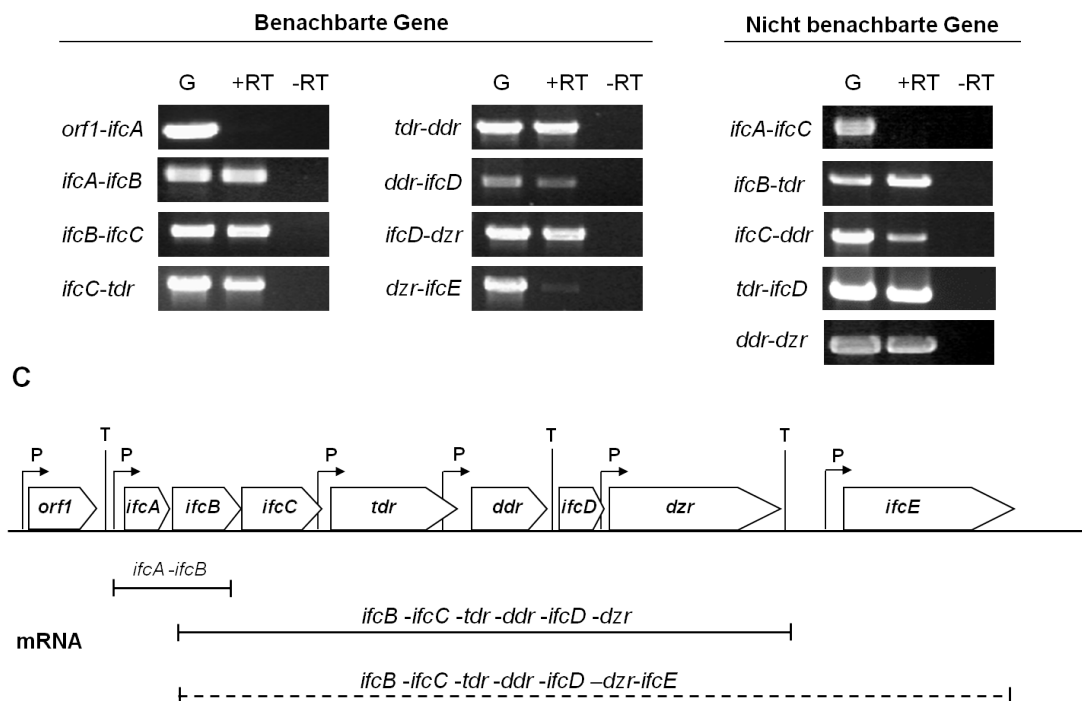
<sup>a</sup> Die unterstrichenen ermittelten Massen kennzeichnen die identifizierten Hauptbanden.

### 3.8 Experimentelle Analysen zur transkriptionellen Regulation der durch Daidzein induzierten Gene in *Slackia isoflavoniconvertens*

#### 3.8.1 Identifizierung von koexprimierten Genen

Für die Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse (RT-PCR) erfolgte zunächst die Synthese der cDNA unter Verwendung der isolierten Gesamt-RNA einer mit Daidzein induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur. Die anschließend amplifizierten DNA-Fragmente umfassen jeweils die Primerbindestellen von jeweils zwei benachbarten Genen oder auch von nicht direkt benachbarten Genen.

Experimente für *orf1* und dem genabwärts gelegenen *ifcA* führten nicht zur Amplifizierung eines PCR-Produkts (Abbildung 19 A). Das Ergebnis zeigt, dass beide Gene nicht zusammen transkribiert werden. Grund hierfür könnte ein zwischen beiden Genen pos-

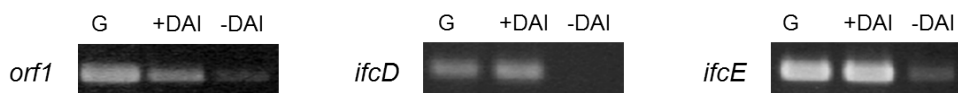


**Abbildung 19: RT-PCR-Analysen der intergenen Bereiche des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens*.**

(A) Amplifizierte PCR-Produkte von direkt benachbarten Genen und (B) nicht direkt benachbarten Genen. Die zur cDNA-Synthese verwendete Gesamt-RNA wurde aus einer durch Daidzein induzierten Kultur isoliert. +RT, cDNA-Synthese-Ansatz mit Zusatz des Enzyms Reverse-Transkriptase; -RT, cDNA-Synthese-Ansatz ohne den Zusatz von Reverse-Transkriptase (Negativkontrolle); G, genomische DNA von *S. isoflavoniconvertens* (Positivkontrolle). (C) Schematische Darstellung des Genkomplexes und der postulierten mRNA-Transkripte. P, potenzielle Sigma-70-abhängige Promotoren; T, potenzielle Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren.

tulierter Transkriptionsterminator sein (Abbildung 19 C). In Bezug auf die benachbarten Gene von *ifcA* bis *dzt* führten alle Primerkombinationen der RT-PCR-Ansätze zur Amplifizierung von PCR-Produkten. Obwohl die intergene Sequenz von *ddr* und *ifcD* einen postulierten Transkriptionsterminator enthält, weist das Ergebnis auf ein langes polycistronisches mRNA-Transkript hin, welches sowohl *ddr* als auch *ifcD* enthält (Abbildung 19 C). Die Analyse des intergenen Bereichs von *dzt* und *ifcE* führte trotz eines potenziellen Transkriptionsterminators genabwärts von *dzt* zur Amplifizierung eines PCR-Produkts (Abbildung 19 A). Da sich die Intensität der Bande im Vergleich zur Kontrollreaktion mit genomischer DNA stark unterschied, kann von einer geringen Kotranskription der Gene *dzt* und *ifcE* ausgegangen werden. Zusätzlich zur Analyse benachbarter Gene wurde auch die Koexpression nicht direkt benachbarter Gene untersucht. Aufgrund des Fehlens eines amplifizierten PCR-Produkts im Bereich *ifcA* zu *ifcC* wird davon ausgegangen, dass beide Gene nicht, wie *ifcA* und *ifcB*, zusammen transkribiert werden (Abbildung 19 B). Weitere Untersuchungen der nicht benachbarten Gene von *ifcB* bis *dzt* unterstützten hingegen die Hypothese eines langen, mit *ifcB* beginnenden, polycistronischen mRNA-Transkripts. Zusammenfassend spricht die Amplifizierung aller spezifischen PCR-Produkte für die Bildung von mindestens zwei Transkripten. Das kürzere Transkript umfasst die Gene *ifcA-ifcB*, während ein langes Transkript aus den Genen *ifcB-ifcC-ddr-ddr-ifcD-dzt-(ifcE)* gebildet wird (Abbildung 19 C).

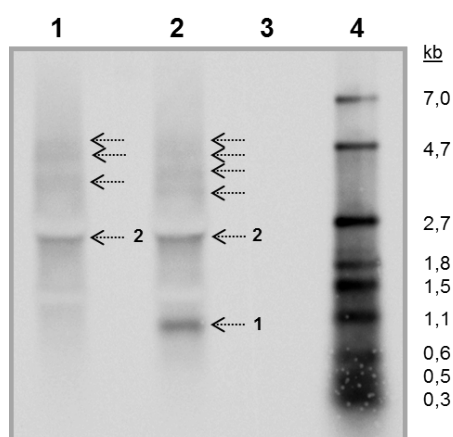
Da die Genprodukte von *orf1* und *ifcD* mittels der 2D-DIGE-Analyse nicht als induzierte Proteine identifiziert wurden, ist unklar, ob eine gemeinsame Transkription mit den übrigen durch Daidzein induzierten Genen erfolgte. Die RT-PCR-Analyse benachbarter Gene zeigte, dass *orf1* und auch das durch Daidzein induzierte Gen *ifcE* nicht bzw. kaum mit dem benachbarten Gen kotranskribiert wurde (Abbildung 19 A). Aus diesem Grund wurden *orf1*, *ifcD* und *ifcE* mittels RT-PCR-Analyse einzeln auf ihre Expression in induzierten und nicht induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Zellen untersucht. Die Analyse der Gene *orf1* und *ifcE* ergab, dass die Expressionsrate in induzierten Zellen höher war im Vergleich zu nicht induzierten Zellen (Abbildung 20). Die Induktion mit Daidzein führte zu einer gesteigerten Expression um den Faktor 2 bei *orf1* und um den Faktor 5 bei *ifcE*. Ein PCR-Produkt mit den Oligonukleotidprimern für *ifcD* wurde ausschließlich mit der cDNA einer induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur beobachtet (Abbildung 20).



**Abbildung 20: RT-PCR-Analyse der Gene *orf1*, *ifcD* und *ifcE*.**

+DAI, aus Gesamt-RNA synthetisierte cDNA einer induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur; -DAI, Synthese der cDNA aus Gesamt-RNA einer nicht induzierten *S. isoflavoniconvertens*-Kultur; G, genomische DNA von *S. isoflavoniconvertens* (Positivkontrolle).

Die RT-PCR-Ergebnisse zeigten, dass bei der Transkription der durch Daidzein induzierten Gene mindestens zwei mRNA-Transkripte entstehen (Abbildung 19 C). Unklar war, ob weitere und damit kürzere Genabschnitte zusätzlich transkribiert werden. Mit Hilfe der *Northern-Blot*-Analyse erfolgte die Identifizierung dieser Transkripte sowie die Verifizierung der RT-PCR-Ergebnisse. Beim *Northern-Blot*-Verfahren wurde die nach der Transkription gebildete mRNA der durch Daidzein induzierten Gene durch Hybridisierung mit komplementären DIG-dUTP-markierten DNA-Sonden nachgewiesen. Die verwendeten DNA-Sonden waren spezifisch für die Gene *ifcA*, *ifcB*, *ifcC*, *tdr*, *ddr*, *dzt* und *ifcE*. Pro Blot wurden die gebildeten Transkripte von zwei benachbarten Genen verglichen und die Größe der mRNA ermittelt. Für alle *Northern-Blot*-Analysen wurde die identische Membran verwendet. Die Identifizierung schwacher Banden wurde, wie in Abbildung 21 erkennbar, durch einen starken Hintergrund erschwert. Auch zeigte sich, dass die weißen Banden der 16S und 23S rRNA andere Banden gleicher Position überdeckten.



**Abbildung 21: Exemplarischer *Northern-Blot* zum Nachweis der bei der Induktion mit Daidzein in *S. isoflavoniconvertens* gebildeten Transkripte.**

Spur 1, Hybridisierung mit der *tdr*-Sonde nach Auftragung der RNA (5 µg) von einer mit Daidzein induzierten Kultur; Spur 2, Hybridisierung mit der *ddr*-Sonde nach Auftragung der RNA (5 µg) von einer mit Daidzein induzierten Kultur; Spur 3, Hybridisierung mit der *tdr*-Sonde nach Auftragung der RNA (5 µg) von einer nicht induzierten Kultur (Negativkontrolle); Spur 4, DIG-dUTP-markierter Größenstandard (100 ng). Nummerierte Banden entsprechen den Transkripten 1 und 2 in Abbildung 22.

Die *Northern-Blot*-Analyse führte zum Nachweis von drei eindeutigen Banden mit einer Größe von 990 bp, 2.200 bp und 2.400 bp. Diese werden im Weiteren als Haupttranskripte bezeichnet und sind, neben weiteren Transkripten in Tabelle 6 aufgeführt. Die Detektion des kleineren Haupttranskripts von 990 bp erfolgte ausschließlich bei Verwendung der für *ddr* spezifischen DNA-Sonde und umfasst das Gen *ddr*. Das 2.200 bp große Haupttranskript wurde bei Verwendung der DNA-Sonden für *ifcA*, *ifcB* und *ifcC* nachgewiesen und kodiert, auch aufgrund seiner Größe, für die Gene *ifcA*, *ifcB* und *ifcC*. Ein weiteres, ausschließlich mit der *tdr*- und *ddr*-Sonde nachgewiesenes Haupttranskript



umfasst die Gene *tdr* und *ddr* bei einer Transkriptgröße von 2.400 bp. Neben den drei Haupttranskripten wurden weitere, schwach ausgeprägte Transkripte mittels *Northern-Blot*-Analyse detektiert. Ein kürzeres Transkript von 1.940 bp wurde ausschließlich mit der *dzr*-spezifischen DNA-Sonde nachgewiesen und umfasst das Gen *dzr*. Zwei weitere Transkripte kodieren aufgrund des Nachweises mit den entsprechenden DNA-Sonden für die Gene *ifcA* und *ifcB* (Transkriptgröße 1.220) sowie für *ddr*, *ifcD* und *dzr* (Transkriptgröße 3.450 bp). Zusätzliche Transkripte von 3.900 bp, 4.750 bp und 7.400 bp kodieren vermutlich für fünf oder mehr durch Daidzein induzierte Gene, beginnend bei *ifcA*. Der Nachweis der mRNA-Banden durch die spezifischen DNA-Sonden erfolgte jedoch nicht für alle Gene des potenziellen Transkripts (Tabelle 6). Nicht weiter identifizierbare Transkripte hatten eine Größe von 3.940 bp, 4.000 bp, 4.870 bp und 5.230 bp. Aufgrund technischer Probleme bei der *Northern-Blot*-Analyse mit der *ifcE*-Sonde sind die Ergebnisse für die gebildeten Transkripte der durch Daidzein induzierten Gene unvollständig.

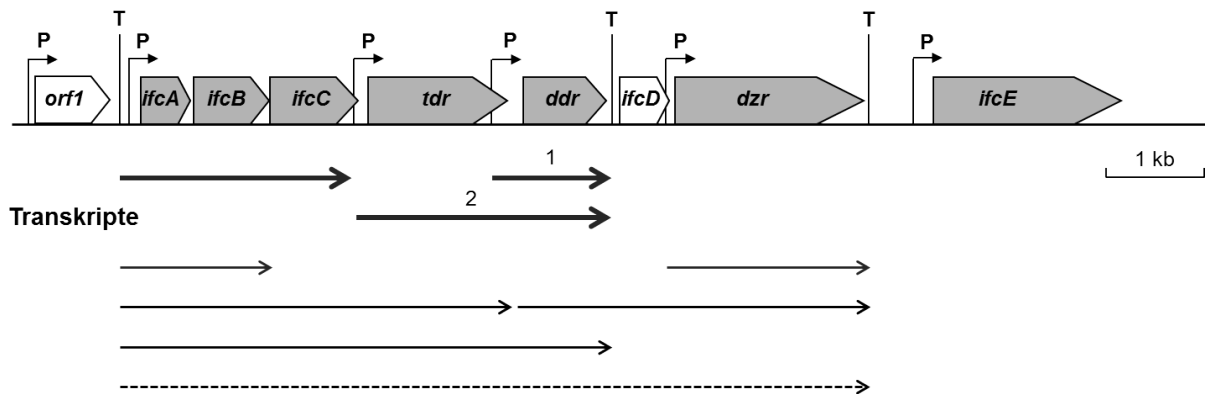
**Tabelle 6: Mittels *Northern-Blot*-Analyse nachgewiesene Transkripte durch Verwendung spezifischer DNA-Sonden für die mit Daidzein induzierten Gene von *S. iso-flavoniconvertens*.**

Transkript- größe <sup>a</sup> (bp)	Genspezifische DNA-Sonde					
	<i>ifcA</i>	<i>ifcB</i>	<i>ifcC</i>	<i>tdr</i>	<i>ddr</i>	<i>dzr</i>
<b>990</b>	-	-	-	-	+	-
1.220	+	+	-	-	-	-
1.940	-	-	-	-	-	+
<b>2.200</b>	+	+	+	-	-	-
<b>2.400</b>	-	-	-	+	+	-
3.450	-	-	-	-	+	+
3.900	+	-	-	+	-	-
3.940	-	-	-	-	-	+
4.000	-	-	-	-	+	-
4.750	+	-	+	+	+	-
4.870	-	-	-	-	-	+
5.230	-	-	-	+	+	-
7.400	+	-	-	-	-	-

<sup>a</sup> Hervorgehobene Größen kennzeichnen die gebildeten Haupttranskripte.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der *Northern-Blot*-Analyse, dass die Expression der durch Daidzein induzierten Gene nicht zu einem einzelnen langen mRNA-Transkript führt, sondern zu einer Vielzahl von Transkripten (Abbildung 22). Die drei gebildeten Haupttranskripte umfassen zum einem *ifcA-ifcB-ifcC* wie auch *ddr*, welches sowohl einzeln als auch zusammen mit *tdr* transkribiert wurde. Alle Ergebnisse der RT-PCR konnten durch die *Northern-Blot*-Analyse nicht bestätigt werden. Das in der RT-PCR identifizierte

kürzere Transkript umfasste nur die Gene *ifcA-ifcB* und nicht, wie in der *Northern-Blot*-Analyse nachgewiesen, *ifcA-ifcB-ifcC*. Im Gegensatz zur RT-PCR-Analyse umfassten größere potenzielle Transkripte auch das Gen *ifcA*. Unklar ist, ob ein einzelnes Transkript die durch Daidzein induzierten Gene *ifcA-ifcB-ifcC-tdr-ddr-ifcD-dzr* umfasst. Ein Transkript dieser Größe (ca. 7.400 bp) konnte nur einmalig bei Verwendung der *ifcA*-Sonde nachgewiesen werden.



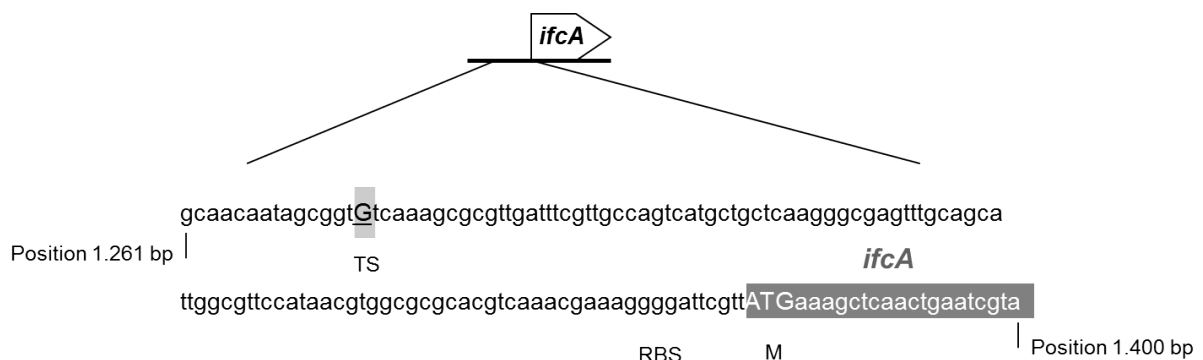
**Abbildung 22:** Schematische Darstellung des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens* mit den mittels *Northern-Blot*-Analyse identifizierten Transkripten.

Stärkere Pfeile kennzeichnen die drei Haupttranskripte. Die Haupttranskripte 1 und 2 entsprechen den nummerierten Banden in Abbildung 21. Der Nachweis der grau dargestellten Gene erfolgte mit den entsprechenden DNA-Sonden. P, potenzielle Sigma-70-abhängige Promotoren; T, potenzielle Rho-unabhängige Transkriptionsterminatoren.

### 3.8.2 Ermittlung der Startposition einzelner Transkripte

Die RT-PCR-Ergebnisse zeigten, dass bei der Transkription der durch Daidzein induzierten Gene mindestens zwei mRNA-Transkripte entstanden sind (Abbildung 19 C). Das kürzere Transkript umfasst die Gene *ifcA-ifcB*, während ein langes Transkript aus den Genen *ifcB-ifcC-tdr-ddr-ifcD-dzr-(ifcE)* gebildet wird. Um den genauwärts von *ifcA* und *ifcB* gelegenen Transkriptionsstart identifizieren zu können, wurde die Methode ARF-TSS (*adaptor- and radioactivity-free identification of transcription start sites*) genutzt. Dabei wird unter Verwendung eines genspezifischen phosphorylierten Oligonukleotidprimers eine cDNA generiert, welche am 3'-Ende den Transkriptionsstart enthält und am 5'-Ende phosphoryliert ist. Durch die Ligation mit der T4 RNA Ligase wird die einzelsträngige cDNA zirkularisiert, so dass der Transkriptionsstart und die Sequenz des phosphorylierten Primers direkt hintereinander liegen. Die zirkularisierte cDNA wird unter Verwendung eines genspezifischen Oligonukleotid-Primerpaars mittels PCR amplifiziert und das PCR-Produkt sequenziert. Als Transkriptionsstart wird das Nukleotid identi-

ziert, welches direkt an das 5'-Ende des zuvor phosphorylierten Primers anschließt. Die Verwendung von spezifischen Oligonukleotidprimern für *ifcA* führte zur Amplifizierung eines einzelnen PCR-Produkts. Die Sequenzierung des PCR-Produkts identifizierte ein Guanin-Nukleotid an Position 1.275 bp des 12 kb großen Genfragments von *S. isoflavoniconvertens* als Transkriptionsstart für *ifcA* (Abbildung 23). Die Entfernung des ermittelten Transkriptionsstarts zum potenziellen Translationsstart von *ifcA* betrug genabwärts 104 bp. Wie für bakterielle Promotoren allgemein bekannt, liegt die -10- und -35-Region in kurzem Abstand relativ zum Transkriptionsstarts genaufwärts. Dieser Bereich würde die vor dem identifizierten Transkriptionsstart von *ifcA* liegenden Positionen 1.241 bis 1.270 bp umfassen. Im Vergleich dazu erfolgte die computergestützte Vorhersage für den potenziellen Sigma-70-abhängigen *ifcA*-Promotor für einen ungefähr 90 bp vor dem identifizierten Transkriptionsstart gelegenen Bereich (Promotor P<sub>2</sub>; Position -10-Region: 1.179 bp; Abbildung 9, Kapitel 3.2.3). Dies unterstützt die Annahme, dass es sich bei dem potenziellen Promotor P<sub>2</sub> nicht um den tatsächlichen *ifcA*-Promotor handelt. Aufgrund der fehlenden Übereinstimmung mit den Konsensus-Sequenzen Sigma-70-abhängiger Promotoren könnte die Regulation von *ifcA* von einem alternativen Sigma-Faktor abhängig sein.



**Abbildung 23: Identifizierter Transkriptionsstart des durch Daidzein induzierten Gens *ifcA* in *S. isoflavoniconvertens*.**

Ausschnitt der genaufwärts gelegenen DNA-Sequenz von *ifcA*. TS, identifizierter Transkriptionsstart; M, Position des für Methionin kodierenden Startcodons ATG; RBS, potenzielle Ribosomen-Bindestelle.

Die Analyse des Transkriptionsstarts von *ifcB* führte nicht zur Amplifizierung eines PCR-Produkts. Das Ergebnis zeigt, dass kein separater Transkriptionsstart für *ifcB* vorliegt. Dies bestätigte auch die *Northern-Blot*-Analyse, bei der mehrere identifizierte Transkripte *ifcA* statt *ifcB* als erstes kodiertes Gen enthielten (Abbildung 22).

## 4 Diskussion

Aufgrund ihrer potenziell gesundheitsfördernden Wirkungen sind die polyphenolischen Isoflavone für die menschliche Ernährung von großem Interesse [120]. Die Metabolisierung und Bioaktivierung dieser sekundären Pflanzenstoffe durch die humane intestinale Darmmikrobiota ist individuell unterschiedlich. Nur in einem geringen Teil der westlichen Bevölkerung wird der Daidzein-Metabolit Equol durch spezifische Darmbakterien gebildet [10]. Mehrere Equol-bildende Bakterien wurden in den letzten Jahren aus dem Darmtrakt des Menschen isoliert. Die entsprechende Umsetzungsreaktion von Daidzein zu Equol war jedoch unzureichend erforscht. So waren weder die an der Umsetzung beteiligten Enzyme identifiziert noch war der Weg der Biotransformation vollständig aufgeklärt. Ein isoliertes und identifiziertes Equol-produzierendes Bakterium des menschlichen Darmtrakts ist die in dieser Arbeit untersuchte Spezies *Slackia isoflavoniconvertens*. Unter Einsatz verschiedener proteinbiochemischer und gentechnischer Methoden wurden die bislang unbekanntes Daidzein-metabolisierenden Enzyme von *S. isoflavoniconvertens* identifiziert und detailliert charakterisiert. Acht im Genom aufeinanderfolgende Gene werden durch das Substrat Daidzein induziert und kodieren u.a. für die direkt an der Reduktion von Daidzein beteiligten Enzyme DZNR, DHDR und THDR, für das Elektronentransfer-Flavoprotein IfcBC sowie für die Racemase IfcA.

### 4.1 Vergleich des Genkomplexes Daidzein-metabolisierender Enzyme in verschiedenen Equol-bildenden Darmbakterien

Während der Bearbeitung dieses Themas wurden die Daidzein-metabolisierenden Enzyme von zwei weiteren humanen Equol-bildenden Bakterien publiziert [204, 205, 223]. Sowohl die Enzyme von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 als auch von *Slackia* sp. Stamm NATTS zeigen bezüglich der Aminosäureabfolge eine hohe Sequenzübereinstimmung zur DZNR, DHDR und THDR von *S. isoflavoniconvertens* und katalysieren die gleichen Reaktionen [204, 205, 223]. Gleichfalls ähnelt die in *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 identifizierte Dihydrodaidzein-Racemase der durch Daidzein induzierten Racemase IfcA von *S. isoflavoniconvertens* [203]. Auch wurde das Genom der Equol-produzierenden Bakterien *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *Adlercreutzia equolifaciens* vollständig sequenziert.

Diese enthalten innerhalb ihrer Genomsequenz einen zu den durch Daidzein induzierten Genen von *S. isoflavoniconvertens* homologen Genkomplex [219, 254]. Der Vergleich der Gene des durch Daidzein induzierten Genkomplexes von *S. isoflavoniconvertens* mit den homologen Genen der vier anderen Equol-produzierenden Bakterien zeigt, dass die Genorganisation der Daidzein-umsetzenden Enzyme identisch ist. Sowohl die an der Umsetzung von Daidzein zu Equol beteiligten Reduktasen DZNR, DHDR und THDR als auch das Elektronentransfer-Flavoprotein IfcBC und die Dihydrodaidzein-Racemase sind im Genom dieser Equol-bildenden Darmbakterien in gleicher Reihenfolge und einheitlicher Leserichtung angeordnet (Abbildung 8). Die Sequenzähnlichkeit unter den einzelnen Proteinen der fünf Spezies variiert trotz der identischen Genabfolge stark. Eine sehr hohe Identität zu den Genen von *S. isoflavoniconvertens* zeigen äquivalente Genprodukte der Dihydrodaidzein-Reduktase (80–94 %) und der Tetrahydrodaidzein-Reduktase (70–90 %) (Tabelle 4). Vergleichsweise gering mit 40 % ist die Sequenzidentität der DZNR zu den korrespondierenden Genprodukten von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* sowie der weniger nah verwandten Spezies *Lactococcus* sp. Stamm 20-92. Stark konservierte Bereiche des Proteins sind vor allem potenziell katalytische Sequenzmotive und mehrfach vorhandene Kofaktor-Bindestellen. Trotz geringer Sequenzübereinstimmung katalysiert das korrespondierende membranständige Enzym L-DZNR von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 die gleiche Reaktion wie das von *S. isoflavoniconvertens* [205].

Der G+C-Gehalt der durch Daidzein induzierten Gene sowie der korrespondierenden Gene in *Slackia* sp. Stamm NATTS, *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* beträgt 56–69 mol % und entspricht dem G+C-Gehalt der vollständigen Genome (Tabelle 4). Auffällig ist, dass der G+C-Gehalt der Daidzein-umsetzenden Enzyme von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 (64–67 mol %) dem Gehalt des Genoms von 39 mol % weit übersteigt. Die Abweichungen im G+C-Gehalt deuten an, dass die Gene der Daidzein-umsetzenden Enzyme durch horizontalen Gentransfer von einem Bakterium mit hohem G+C-Gehalt auf die zu den Firmicutes zählende Spezies *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 übertragen wurden. Durch horizontalen Gentransfer erwirbt eine Rezipientenzelle zusätzlich Stoffwechselmerkmale, wodurch die Anpassungs- und Wettbewerbsfähigkeit unter bestimmten Umständen, wie z.B. der Besiedlung einer neuen Nische oder veränderte Umweltbedingungen, verbessert werden kann. Vor allem in der Rhizosphäre, in Biofilmen, dem Darmtrakt oder anderen stark besiedelten bakteriellen Lebensräumen ist der Austausch von genetischen Informationen durch horizontalen Gentransfer begünstigt [51]. Bakterienchromosome enthalten mit Genominseln instabile Bereiche, welche sich von selbst in das Genom eines anderen Bakteriums einschleusen können. Genominseln lassen sich in verschiedene Subtypen wie z.B. Pathogenitäts-, Symbiose-, Fitness-, Metabolismus- oder Resistenzinseln unterteilen und werden auch als integrative Elemente oder konjugative Transposons bezeichnet [51, 145]. Typisch für diese mobilen DNA-Elemente ist

die Anwesenheit eines Integrase-/Transposase-Gens, welches für das Herausschneiden des Elements sowie den darauf folgenden Wiedereinbau verantwortlich ist [145]. Interessanterweise enthält auch der vollständig sequenzierte Equol-Bildner *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 in direkter Nachbarschaft zum Genkomplex der Daidzein-umsetzenden Enzyme zwei Integrase-/Transposase-Gene. Diese flankieren jeweils genauf- und genabwärts der homologen, durch Daidzein induzierten Gene einen insgesamt 17 Gene umfassenden Genkomplex [254]. Die mögliche Annahme, dass die Gene der Daidzein-umsetzenden Enzyme Teil einer Genominsel sein könnten, wird in Bezug auf den ebenfalls vollständig sequenzierten Equol-Bildner *A. equolifaciens* nicht gestützt. Obwohl die Genabfolge der potenziellen Daidzein-umsetzenden Enzyme von *A. equolifaciens* dem Genkomplex von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 ähnelt (Abbildung 8), unterscheiden sich die flankierenden Gene und kodieren nicht für potenzielle Integrasen/Transposasen [219].

## 4.2 Enzymatische Umsetzung von Daidzein und Genistein im zellfreien System

### Equol wird nur mit geringer Rate aus Dihydrodaidzein umgesetzt

Durch die funktionelle Expression der durch Daidzein induzierten Gene *dzr*, *ddr* und *tdr* wurden die korrespondierenden Genprodukte als Daidzein-Reduktase, Dihydrodaidzein-Reduktase und Tetrahydrodaidzein-Reduktase identifiziert. Keine weiteren Enzyme waren für die vollständige Umsetzung von Daidzein über Dihydrodaidzein zu Equol im zellfreien System notwendig. Hauptumsatzprodukt war im Vergleich zur Fermentation durch *S. isoflavoniconvertens*-Zellen das Intermediat Dihydrodaidzein, welches mit sehr geringer Rate weiter zu Equol umgesetzt wurde. Da geringe Bildungsraten von Equol sowohl im zellfreien Extrakt von *S. isoflavoniconvertens* als auch mit den rekombinanten Enzymen beobachtet wurden, ist der Aktivitätsverlust der Enzyme DHDR/THDR vermutlich unabhängig von der heterologen Expression in *E. coli*. Möglicherweise erfolgt die Umsetzung von Dihydrodaidzein zu Equol durch ein komplexes, zum Teil membranständiges Elektronentransfersystem, welches während des mechanischen Zellaufschlusses inaktiviert wurde. Unterstützt wird diese Annahme durch das Vorhandensein der ebenfalls durch Daidzein induzierten Proteine IfcBC und IfcE. Diese vermutlich Membran-assoziierten Proteine besitzen in Gestalt eines Elektronentransfer-Flavoenzym (IfcBC) und einer Flavin-Oxidoreduktase (IfcE) potenzielle elektronenübertragende Eigenschaften und könnten somit an der Umsetzung von Dihydrodaidzein zu Equol durch DHDR und THDR beteiligt sein. Im zellfreien System von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 wird Daidzein dagegen fast vollständig zu Equol umgesetzt (Ausbeute 89,4 %), wenn die Katalyse durch die rekombinanten Enzyme

DZNR, DHDR und THDR in Anwesenheit der Dihydrodaidzein-Racemase erfolgt [203]. Dieses Ergebnis ließ sich für die rekombinanten Proteine von *S. isoflavoniconvertens* nicht beobachten. Zwar verdoppelte sich die Konzentration an Equol nach Kombination von DZNR, DHDR und THDR mit der Racemase IfcA, jedoch betrug die Ausbeute an Equol nach 30 min Reaktionszeit lediglich 2,4 %. Der enzymatische Testansatz von Shimada *et al.* enthielt als Reduktionsmittel 2 mM Dithiothreitol und 5 mM Natriumdithionit [203]. Denkbar wäre, dass das in der vorliegenden Arbeit mit einer Konzentration von 2,8 mM verwendete L-Cysteinhydrochlorid in den enzymatischen Tests ein zu hohes Redoxpotential aufwies und die Sauerstoff-sensitiven Enzyme DHDR/THDR teilweise inhibiert wurden. Auch waren die Enzyme von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 an ein His- statt an ein *Strep-tag* fusioniert [203]. Dies könnte ebenfalls Ursache der unterschiedlichen Enzymaktivitäten sein.

#### **Dihydrogenistein wird nicht weiter zu 5-Hydroxyequol umgesetzt**

Weder im zellfreien System von *S. isoflavoniconvertens* noch bei der Verwendung der rekombinanten Enzyme DHDR und THDR wurde 5-Hydroxyequol aus Dihydrogenistein gebildet. Auch ließ sich die Bildung des potenziellen Metaboliten Tetrahydrogenistein bei Inkubation von Dihydrogenistein mit dem Enzym DHDR nicht beobachten [102].

Die Umsetzung von Genistein zu 5-Hydroxyequol wurde bisher bei drei isolierten Bakterienspezies beobachtet [40, 94, 140, 141]. Der Nachweis von 5-Hydroxyequol *in vivo* gelang in einem mit *S. isoflavoniconvertens* besiedelten Rattenmodell, nicht jedoch in Proben vom Menschen oder konventionell besiedelten Ratten. Die gebildete Menge an 5-Hydroxyequol war dabei geringer als die des analogen Metaboliten Equol [139, 142]. In Fermentationsexperimenten sowohl mit Zellen von *S. isoflavoniconvertens* als auch von *E. mucosicola* zeigte sich, dass 5-Hydroxyequol erst nach vollständiger Umsetzung von Genistein zu Dihydrogenistein gebildet wurde. Die Bildung von Equol erfolgte dahingegen zeitgleich mit der Umsetzung von Daidzein zu Dihydrodaidzein [140, 141]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die bakterielle Umsetzung von Daidzein zu Equol weitaus effizienter verläuft, wobei bereits diese Reaktion im zellfreien System eingeschränkt ist. Dihydrogenistein besitzt im Vergleich zu Dihydrodaidzein eine zusätzliche Hydroxygruppe am C5-Atom. Denkbar ist, dass das Enzym DHDR in der katalytischen Tasche, welche für die Bindung des aromatischen A-Rings zuständig ist, aliphatische/lipophile Aminosäuren besitzt und es durch Einführung der Hydroxygruppe zu einer Abstoßung im katalytischen Zentrum kommt. Durch die Anwesenheit der 5-Hydroxylfunktion steigt die Elektronendichte im Ringsystem und die Carbonylaktivität wird vermindert, so dass die Tendenz zum Angriff eines Hydrid-Ions im Zuge der Reduktion gemindert wird.

Nicht bekannt ist, ob die durch Daidzein induzierten Enzyme DHDR und THDR tatsächlich die Reduktion von Dihydrogenstein zu 5-Hydroxyequol katalysieren. Da jedoch auch Genistein die Gene der Daidzein-umsetzenden Enzyme induziert und die DZNR die Doppelbindung im C-Ring beider Isoflavone reduziert, kann von einer Umsetzung Dihydrodaidzeins durch die DHDR und THDR ausgegangen werden.

#### **Daidzein wird bei physiologischen Konzentrationen schneller umgesetzt**

Die Umsetzung von Genistein erfolgte im zellfreien System bei Konzentrationen um 100  $\mu\text{M}$  schneller als die von Daidzein. Dies zeigten sowohl Experimente mit dem Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* als auch mit der in *E. coli* heterolog exprimierten Daidzein-Reduktase DZNR. Die gereinigte DZNR wies für Genistein im Vergleich zu Daidzein eine 3-fach höhere Maximalgeschwindigkeit auf und einen höheren  $K_m$ -Wert. Demnach besitzt die DZNR eine größere Affinität für Daidzein. Interessanterweise wird Daidzein bis zu einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  schneller als Genistein umgesetzt und inhibiert, im Vergleich zu Genistein, bei steigender Konzentration die DZNR. Die physiologisch relevanten Konzentrationen an Isoflavonen für den menschlichen Organismus werden in der Literatur mit 5–10  $\mu\text{M}$  angegeben [81, 106]. Auch Konzentrationen von bis zu 13  $\mu\text{M}$  wurden für den Daidzein-Metaboliten Equol im menschlichem Urin nachgewiesen [200]. Dabei wird die tatsächliche Konzentration des Vorläufers Daidzein im Dickdarm aufgrund der Exkretion und der zusätzlichen Umsetzung zu *O*-DMA vermutlich noch höher sein. Die Inhibition eines Enzyms durch erhöhte Substratkonzentrationen, auch Substratinhibition genannt, ist ein weit verbreitetes Phänomen und betrifft wahrscheinlich 20 % aller untersuchten Enzyme. Obwohl es ursprünglich als ein nicht physiologisches Phänomen gedeutet wurde, zeigen neuere Untersuchungen die biologische Relevanz der Substratinhibition für eine Vielzahl von Enzymen, wie z.B. der Tyrosinhydroxylase, Acetylcholinesterase und Phosphofruktokinase [179]. Die Phosphofruktokinase ist hierbei das wichtigste regulatorische Kontrollprotein der Glykolyse bei Säugern. Ab einer Konzentration von 0,5–3,0 mM ATP wird die Affinität des Enzyms für das zweite Substrat Fructose-6-phosphat gesenkt und somit die Phosphofruktokinase inhibiert. Der Umsatz in der Glykolyse wird verlangsamt, so dass ein überflüssiger Verbrauch von ATP verhindert wird [179]. Interessanterweise tritt Substratinhibition auch bei der aus dem anaeroben Bakterium *Enterobacter cloacae* PB2 isolierten Pentaerythritol-Tetranitrat-Reduktase auf. Dieses Enzym gehört, wie die DZNR, zur *Old Yellow Enzyme*-Familie der Flavin-Oxidoreduktasen [66, 68]. Warum die DZNR von *S. isoflavoniconvertens* nur durch Daidzein, nicht jedoch Genistein inhibiert wird und ob diese Beobachtung von physiologischer Relevanz ist, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen zur enzymkinetischen Charakterisierung der DZNR sein.



### Die Dihydrodaidzein-Racemase IfcA ist an der Bildung von (*S*)-Dihydrodaidzein beteiligt

In *S. isoflavoniconvertens* kodiert das durch Daidzein induzierte Gen *ifcA* für eine Dihydrodaidzein-Racemase. Sowohl in An- und Abwesenheit von IfcA wird Daidzein durch die Reduktasen DZNR, DHDR und THDR zu Equol umgesetzt. Während Daidzein in Abwesenheit von IfcA nahezu vollständig zu (*R*)-Dihydrodaidzein umgesetzt wird, entsteht in Anwesenheit des Proteins aus beiden Enantiomeren ein racemisches Gemisch. Die enantioselektive Umsetzung zu (*R*)-Dihydrodaidzein durch die DZNR und die Racemisierung des Enantiomers durch eine Dihydrodaidzein-Racemase wurde ebenfalls für das Equol-bildende Bakterium *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 nachgewiesen [203, 205]. Die Dihydrodaidzein-Reduktase von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 reduziert in einer diastereoselektiven Reaktion (*R*)-Dihydrodaidzein zu *cis*-Tetrahydrodaidzein und (*S*)-Dihydrodaidzein zu *trans*-Tetrahydrodaidzein [203]. Wie in *S. isoflavoniconvertens* setzt die DHDR hierbei vorrangig (*S*)-Dihydrodaidzein um. Das Endprodukt (*3S*)-Equol entsteht in *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 ausschließlich aus (*3S*)-*trans*-Tetrahydrodaidzein unter Beibehaltung der Konfiguration am C3-Atom [203]. Die Funktion der Dihydrodaidzein-Racemase ist demnach die Umwandlung des bei der Reduktion von Daidzein gebildeten (*R*)-Dihydrodaidzeins zu (*S*)-Dihydrodaidzein als hauptsächliches Substrat der DHDR. Die Bildung von (*3S*)-Equol in Abwesenheit der Dihydrodaidzein-Racemase ist vermutlich auf eine spontane, aber deutlich langsamere Racemisierung von (*R*)-Dihydrodaidzein zum (*S*)-Enantiomer zurückzuführen.

Die Dihydrodaidzein-Racemase von *S. isoflavoniconvertens* und *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 weist Sequenzübereinstimmungen zur Methylmalonyl-CoA-Epimerase verschiedener Bakterien auf. Dieses Enzym sowie weitere Proteine wie die Glyoxalase I, das Bleomycin-Resistenz-Protein und die Estradiol-Dioxygenase gehören der *Vicinal Oxygen Chelate*-Superfamilie an. Mitglieder dieser Familie katalysieren Metallionen-abhängige Reaktionen und ähneln sich in ihrer räumlichen Faltstruktur [110, 144]. Die Methylmalonyl-CoA-Epimerase ist am Abbau von ungeradzahligem Fettsäuren und verzweigt-kettigen Aminosäuren zu Succinyl-CoA beteiligt. Das Enzym katalysiert die Umsetzung von (*2R*)-Methylmalonyl-CoA zu (*2S*)-Methylmalonyl-CoA, welches als Substrat der B<sub>12</sub>-abhängigen Methylmalonyl-CoA-Mutase weiter zu Succinyl-CoA umgesetzt wird [144]. Ähnlich zur Dihydrodaidzein-Racemase von *S. isoflavoniconvertens* handelt es sich bei der Methylmalonyl-CoA-Epimerase aus dem Propionsäure-produzierenden Bakterium *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* um ein Homodimer. Dieses besitzt eine molekulare Masse von 33 kDa und besteht aus zwei identischen Untereinheiten mit je 17 kDa [121]. Als metall-abhängiges Enzym wird die Methylmalonyl-CoA-Epimerase durch den Zusatz von Metall-Chelatoren inhibiert und durch die Gabe von divalenten Kationen wie Co<sup>2+</sup>

und  $Mn^{2+}$  reaktiviert [121, 144]. Inwieweit auch die von der Dihydrodaidzein-Racemase von *S. isoflavoniconvertens* katalysierte Reaktion Metallionen-abhängig ist, bedarf weiterer Untersuchungen.

### 4.3 Vergleich der durch Daidzein induzierten Proteine mit Proteinen ähnlicher bakterieller Stoffwechselwege

Die einzelnen Schritte der Daidzein-Reduktion zu Equol weisen Ähnlichkeiten zu anderen bakteriellen Enzymreaktionen auf, wie z.B. der Reduktion von Cholesterol, der Dehydroxylierung von primären Gallensäuren und der Umsetzung von Morphinon zu Dihydromorphin [65, 128, 180, 181, 240]. Im folgenden werden einzelne, in diese Stoffwechselwege involvierte Enzyme vorgestellt und deren biochemische Eigenschaften sowie Enzymcharakteristika mit denen der durch Daidzein induzierten Proteinen von *S. isoflavoniconvertens* verglichen.

#### Enzyme der *Old Yellow Enzyme*-Familie reduzieren $\alpha/\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen

Im ersten Schritt der Daidzein-Umsetzung durch *S. isoflavoniconvertens* wird die Doppelbindung im C-Ring durch die Daidzein-Reduktase DZNR reduziert. Eine ähnliche Reaktion katalysiert die Morphinon-Reduktase von *Pseudomonas putida* M10, bei der unter oxidischen Bedingungen das Opioid Morphinon zu Hydromorphon umgesetzt wird [64, 240]. Wie die DZNR wird auch die Morphinon-Reduktase aufgrund von Sequenzhomologien zur Familie der *Old Yellow Enzymes* (OYE) gezählt [65]. OYE bilden eine Unterfamilie der Flavin-abhängigen  $\alpha/\beta$ -barrel-Oxidoreduktasen, welche FMN und NADPH (seltener NADH) als Kofaktoren nutzen und vor allem  $\alpha/\beta$ -ungesättigte Carbonylverbindungen als Substrate umsetzen [27, 178, 246]. Bekannteste Vertreter sind das OYE aus *Saccharomyces carlsbergensis* als erstes identifiziertes Flavoenzym und das Estrogen-Binde-Protein (EBP1) aus *Candida albicans* [135, 246]. Mit 70–73 kDa pro Untereinheit entsprechen die molekularen Massen der OYE-Enzyme 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase von *E. coli* und BaiH/BaiCD von *Clostridium scindens* der DZNR-Größe. Ähnlich der DZNR liegen die kodierenden Gene für die Oxidoreduktasen BaiH und BaiCD innerhalb eines 10 kb-umfassenden Genkomplexes, welche durch Gallensäuren in dem anaeroben Bakterium *C. scindens* induziert werden [98, 181]. Die 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase von *E. coli* ist in den Abbau von ungesättigten Fettsäuren involviert und katalysiert die Reduktion von Doppelbindungen. Als Eisen-Schwefel-haltiges Flavoenzym enthält es neben einem 4Fe-4S-Zentrum jeweils 1 mol FMN und 1 mol FAD pro mol einer Untereinheit und nutzt NADPH als Elektronenquelle [82]. Übereinstimmend mit den potenziellen Kofaktoren der

DZNR liegt auch die 2,4-Dienoyl-CoA-Reduktase von *E. coli* als Monomer vor. Die in drei Schritten ablaufende Reduktion der  $\alpha/\beta$ -ständigen Doppelbindung von 2,4-Dienoyl-CoA beginnt mit einem Hydridtransfer von NADH auf FAD. Im weiteren Verlauf werden die Elektronen von FADH<sub>2</sub> auf FMN durch das 4Fe-4S-Zentrum übertragen und zur Reduktion des Substrats genutzt [82]. Aufgrund der identischen Kofaktoren und der Zugehörigkeit zur *Old Yellow Enzyme*-Familie kann ein ähnlicher Mechanismus für die DZNR angenommen werden. Wie alle durch Daidzein induzierten Proteine von *S. isoflavoniconvertens* wurde auch die DZNR als C-terminales *Strep-tag*-Fusionsprotein gereinigt. Trotz der Überexpression der DZNR und der damit einhergehenden starken Gelbfärbung des *E. coli*-Zellextrakts war die Ausbeute des Flavoenzyms mit 0,4–1,2 % gering. Die HPLC-Analyse bestätigte FAD als Flavin-Kofaktor der gereinigten DZNR. Da der Nachweis des vermuteten Eisen-Schwefel-Zentrums und des zusätzlichen Flavins FMN erst mit ausreichender Menge an gereinigtem Protein möglich ist, müsste der Reinigungsprozess der DZNR mit dem His- oder *Strep-tag* optimiert werden. Auch könnte die Reinigung unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden, oder unter Verwendung von alternativen Affinitätsmarkern wie dem GST- und FLAG-*tag*.

### Die Dihydrodaidzein-Reduktase gehört der SDR-Superfamilie an

Die Umsetzung von Dihydrodaidzein zu Tetrahydrodaidzein ist eine Carbonyl-Alkohol-Oxidoreduktion und wird in *S. isoflavoniconvertens* durch die Dihydrodaidzein-Reduktase DHDR katalysiert. Diese wird zu den „klassischen“ kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR) gezählt, einer großen Familie innerhalb der NAD(P)(H)-abhängigen Oxidoreduktasen. Trotz geringer Sequenzübereinstimmung zwischen den einzelnen Mitgliedern ist vor allem die Faltungsstruktur (ein zentrales  $\beta$ -Faltblatt, flankiert von je 2-3  $\alpha$ -Helices) sowie das NAD(P)-Bindemotiv konserviert sowie ein Tyrosin- und Lysin-haltiges katalytisches Zentrum [96,99]. Enzyme der SDR-Familie bilden häufig homodimere oder homotetramere Quartärstruktur aus [99]. Auch die DHDR von *S. isoflavoniconvertens* besteht vermutlich aus vier identischen Untereinheiten. Sequenzhomologien der DHDR finden sich zur ebenfalls NADPH-abhängigen  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reduktase von verschiedenen Bakterienspezies. Dieses Enzym ist in den Verlängerungszyklus der Fettsäure-Biosynthese involviert und gehört wie DHDR den „klassischen“ SDR an. Im Fettsäure-Stoffwechsel von Bakterien katalysiert die als Homotetramer vorliegende  $\beta$ -Ketoacyl-ACP-Reduktase die Umsetzung von  $\beta$ -Ketoacyl-ACP zu  $\beta$ -Hydroxyacyl-ACP, wobei analog zur DHDR eine Carbonylgruppe zur Hydroxygruppe reduziert wird [117].

### Die Umsetzung zu Equol durch die Tetrahydrodaidzein-Reduktase könnte über einen Radikalmechanismus erfolgen

Im letzten Schritt der Reduktion von Daidzein zu Equol wird das Intermediat Tetrahydrodaidzein in einer Dehydroxylierungsreaktion zu (*S*)-Equol umgesetzt. Diese Reaktion ist bei *S. isoflavoniconvertens* vermutlich FAD-abhängig und wird durch die Tetrahydrodaidzein-Reduktase THDR katalysiert. Sequenzübereinstimmungen der THDR bestehen zur Flavin-haltigen Untereinheit der bakteriellen Succinat-Dehydrogenase und Fumarat-Reduktase. Diese NAD(P)(H)-unabhängigen Enzyme sind Heterotetramere mit einem, im Vergleich zur THDR von *S. isoflavoniconvertens*, kovalent gebundenem FAD-Kofaktor. Ein in der Sequenz von THDR vorhandenes verlängertes Dinukleotid-Bindemotiv weist zusätzlich auf die Bindung von NADPH als Kofaktor hin. Wie bereits bekannt, ist die Umsetzung von Daidzein zu Equol NADPH-abhängig und sowohl die Daidzein-Reduktase als auch die Dihydrodaidzein-Reduktase wurden als NADPH-nutzende Enzyme identifiziert [204, 205]. In der Literatur sind die Angaben zur NADPH-Abhängigkeit der THDR widersprüchlich. So wird die Reaktion von Tetrahydrodaidzein zu Equol in *Eggerthella* sp. Stamm Julong 732 als NADPH-abhängig beschrieben, während die THDR von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 katalytische Aktivität in Abwesenheit von NADPH besitzt [104, 105, 204]. Die Sequenz der THDR von *S. isoflavoniconvertens* und *Slackia* sp. Stamm NATTS enthält zusätzlich ein typisches Motiv der Glycyl-Radikal-Enzyme [30]. Dieses Motiv ist in der THDR von *Lactococcus* sp. Stamm 20-92 und den hypothetischen Genprodukten von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* nicht vollständig konserviert. Glycyl-Radikal-Enzyme werden der radikalischen *S*-Adenosylmethionin (SAM)-Superfamilie zugeordnet und sind sehr sensitiv gegenüber Sauerstoff [67, 191]. Auch für die Reduktion von Tetrahydrodaidzein wird ein radikalischer Mechanismus vorgeschlagen [105]. Eine vergleichbare radikalische Dehydroxylierungsreaktion wird von der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase der Klasse III katalysiert, welche ebenfalls den Glycyl-Radikal-Enzymen zugeordnet wird. Das aus zwei dimeren Untereinheiten bestehende Enzym reduziert die 2'-Hydroxygruppe von Ribonukleotiden in ihre jeweilige Desoxyribonukleotid-Form [55, 164]. Die Erzeugung des eigentlichen Glycyl-Radikals erfolgt durch den radikalischen Angriff des aus SAM gebildeten 5'-Deoxyadenosylradikals, dessen Bildung wiederum durch ein reduziertes 4Fe-4S-Zentrum katalysiert wird. Das essentielle 4Fe-4S-Zentrum ist dabei Teil der „aktivierenden Komponente“ (auch Aktivase), welche in der anaeroben Ribonukleotid-Reduktase durch die kleinere homodimere Untereinheit gebildet wird [55]. Da die Sequenz der THDR kein typisches Eisen-Schwefel-Zentrum-Motiv aufweist, ist unklar, inwieweit von einem ähnlichen Radikalmechanismus des Enzyms ausgegangen werden kann. Denkbar wäre die Bildung eines Enzymkomplexes mit einem Eisen-Schwefel-Protein als Aktivase, wie z.B. dem durch Daidzein induzierten Protein IfcE. Die niedrige

Bildungsrate von Equol im Zellextrakt von *S. isoflavoniconvertens* wäre so z.B. durch die mechanische Inaktivierung des aus der zytosolischen THDR und dem membranständigen Protein IfcE bestehenden Enzymkomplexes erklärbar.

### **Elektronentransfer-Flavoproteine vermitteln den Elektronenfluss zwischen Donor- und Akzeptorpaaren in unterschiedlichsten Stoffwechselwegen**

In *S. isoflavoniconvertens* liegen die Gene des Elektronentransfer-Flavoproteins (ETF) IfcBC vor den Genen der THDR und DHDR (Abbildung 24). Die benachbarte Lage von *ifcBC* zu *tdr*, sowie die Tatsache, dass die DZNR die vollständige Umsetzung von Daidzein zu Dihydrodaidzein katalysiert, deuten an, dass das ETF von *S. isoflavoniconvertens* als Elektronenüberträger bei der Umwandlung von Dihydrodaidzein zu Equol beteiligt ist. Ob IfcBC einen Komplex mit der THDR und/oder DHDR ausbildet, könnte durch die Koexpression von *ifcB-ifcC-tdr-ddr* und einer gemeinsam durchgeführten Reinigung der Proteine getestet werden. Dabei würde IfcB oder DHDR ein genetisch fusioniertes *Streptag* enthalten. Bei einer gemeinsamen Elution von IfcBC mit der THDR und/oder DHDR wäre die Bildung eines Enzymkomplexes nachgewiesen.

Elektronentransfer-Flavoproteine sind in Bakterien, Archaeen und Eukaryonten vorhanden und bilden ein Heterodimer aus einer größeren  $\alpha$ -Untereinheit und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit [86, 222]. Wie in *S. isoflavoniconvertens* ist dabei FAD nicht kovalent an das Heterodimer gebunden. Obwohl ETFs in anaeroben Bakterien als auch in Eukaryonten mit Acyl-CoA-Dehydrogenasen interagieren, unterscheiden sich deren Funktionen. In Eukaryonten übertragen ETFs die Elektronen von einer Dehydrogenase zur ETF:Ubichinon-Reduktase, einem mitochondrialen Fe-S-Membranenzym, welches die Elektronen weiter über Ubichinol zur Atmungskette transportiert. Dieser Schritt ist Teil der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren, bei der die Acyl-CoA-Dehydrogenase als Flavoenzym die Reaktion von Acyl-CoA zu (*E*)-2-Enoyl-CoA katalysiert [72]. Bakterielle ETFs werden dagegen durch NAD(P)H reduziert (NAD(P)H-Dehydrogenase-Aktivität) und transportieren die Elektronen zu zytoplasmatischen Acyl-Dehydrogenasen oder zu Ferredoxin [78]. Im Gegensatz zur bakteriellen Butyryl-CoA-Dehydrogenase von *Acidaminococcus fermentans* bildet die Butyryl-CoA-Dehydrogenase aus *Clostridium kluyveri* als auch die Caffeyl-CoA-Reduktase der acetogenen Spezies *Acetobacterium woodii* einen stabilen Komplex mit den ETFs [19, 124, 247]. Dabei sind die Gene der  $\alpha$ - und  $\beta$ -ETF-Untereinheit sowohl in *C. kluyveri* als auch in *A. woodii* genabwärts des Dehydrogenase- bzw. Reduktase-Gens angeordnet.

ETFs werden zumeist konstitutiv exprimiert, wenn sie in katabolische Prozesse wie der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren involviert sind. Darüber hinaus induzieren viele Bakterien weitere ETFs nur unter bestimmten metabolischen Bedingungen [244]. So wie die Induktion mit Daidzein in *S. isoflavoniconvertens* zur Expression von IfcBC führt, wird auch das

ETF des Caffeyl-CoA-Reduktase-Komplexes in *A. woodii* erst in Anwesenheit von Caffeat induziert [86]. Ein weiteres Beispiel ist das ETF des methylothermen Bakteriums W3A1, welches durch Trimethylamin induziert wird und ausschließlich Elektronenakzeptor der Trimethylamin-Dehydrogenase ist [37,244]. NAD(P)H-oxidierende und mit ETF verwandte Flavoproteine sind außer in Anaerobiern auch in aeroben und diazotrophen Bakterien enthalten [78]. So verfügt das Stickstoff fixierende Bakterium *Bradyrhizobium japonicum* neben EtfSL auch über das ETF FixAB [244]. Die ETF-Gene *fixAB* liegen zumeist in Form des Genkomplexes *fixABCX* vor, bei dem die Proteine FixCX Ähnlichkeiten zur humanen ETF:Ubichinon-Oxidoreduktase der Atmungskette aufweisen. Die spezifische Funktion des membrangebundenen FixABCX-Komplexes ist bisher nicht bekannt. Vermutlich katalysiert der Komplex den Elektronentransfer von NADH zur Nitrogenase und ist damit an der Stickstoff-Fixierung beteiligt [78,244]. Interessanterweise beinhalten auch die Equol-produzierenden Bakterien *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* FixABCX-ähnliche Gene. In diesen Stämmen entsprechen die Gene von FixAB dem korrespondierenden ETF IfcBC von *S. isoflavoniconvertens*. Die Gene *fixCX* von *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* sind zwischen den korrespondierenden Genen der DZNR und IfcE angeordnet und fehlen im Genomabschnitt von *S. isoflavoniconvertens* (Abbildung 24). Sequenzübereinstimmungen von FixC und FixX finden sich zu NAD(P)-abhängigen Flavin-Oxidoreduktasen und zu Ferredoxin-Proteinen.

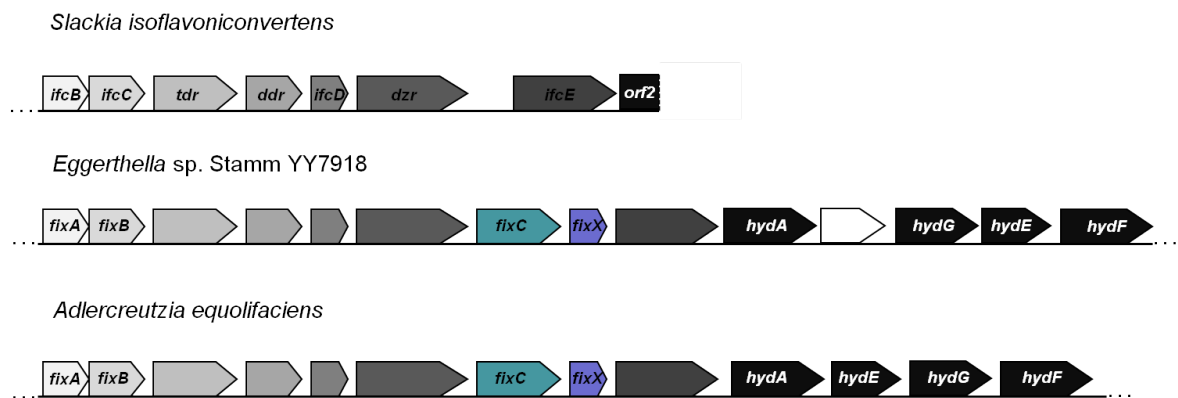
#### **Die Umsetzung von Daidzein zu Equol könnte in *S. isoflavoniconvertens* über einen chemiosmotischen Mechanismus zur Synthese von ATP führen**

Wie bereits erwähnt, sind nur wenige Bakterien bekannt, die Daidzein zu Equol reduzieren. Vor allem einige Spezies der Familie der *Coriobacteriaceae* besitzen die Gene der Daidzein-umsetzenden Enzyme. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Fähigkeit der Equol-Produktion stoffwechselphysiologisch von Vorteil ist. Zum einem könnten die Bakterien Daidzein als exogenen Elektronenakzeptor nutzen, wobei NAD(P)H reoxidiert wird und das Redoxgleichgewicht im anaeroben Stoffwechsels ausgeglichen wird. Zum anderem wäre es denkbar, dass die Produktion von Equol mit der Konservierung von Energie im Organismus einhergeht. Ein in Bezug auf Equol relevantes Beispiel der Energiegewinnung ist die Wasserstoff-abhängige Caffeat-Reduktion in dem anaeroben und acetogenen Bakterium *A. woodii*, auch bezeichnet als Caffeat-Atmung. Hierbei werden die Elektronen von einem Donor (z.B. Wasserstoff) auf den Akzeptor Caffeyl-CoA übertragen, welcher durch den ETF-Caffeyl-CoA-Reduktase-Komplex zu Hydrocaffeyl-CoA reduziert wird. Durch diese Reduktionsreaktion wird ein transmembraner elektrochemischer  $\text{Na}^+$ -Gradient generiert, welcher für die Synthese von ATP durch die  $\text{Na}^+$ -abhängige  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP-Synthase verwendet wird. Der Natrium-Gradient generierende Enzymkomplex

besitzt dabei eine Ferredoxin:NAD<sup>+</sup>-Oxidoreduktase-Aktivität und wird als Rnf (*Rhodobacter nitrogen fixation*)-Komplex bezeichnet [19, 21]. Aufgrund der im folgenden vorgestellten Gemeinsamkeiten könnte auch die Reduktion von Daidzein und Genistein an einen energiekonservierenden Schritt gekoppelt sein. Die NADH-abhängige Reduktion von Caffeyl-CoA erfolgt durch einen zytoplasmatischen Enzymkomplex bestehend aus der Caffeyl-CoA-Reduktase und einem Paar an Elektronentransfer-Flavoproteinen. Bei der Oxidation des Elektronendonors NADH werden die Elektronen über das ETF-Paar einzeln aufgeteilt und auf zwei verschiedene Elektronenakzeptoren übertragen [19]. Dieser Mechanismus wird als Elektronen-Bifurkation mit Flavinen (*Flavin-based electron bifurcation*, FBEB) bezeichnet und wurde anhand des Butyryl-CoA-Dehydrogenase-Komplexes von *C. kluyveri* zum ersten Mal beschrieben [31, 190]. Alle bisher charakterisierten FBEB-Enzymkomplexe dienen der Reduktion von Ferredoxin, wobei diese endergone Redoxreaktion an eine stark exergone Reaktion (z.B. der Reduktion von Caffeyl-CoA in *A. woodii* oder von Crotonyl-CoA in *C. kluyveri*) gekoppelt ist [19, 78]. Diese FBEB-Systeme sind lösliche Enzymsysteme, die aus mehreren Untereinheiten bestehen und mindestens einen Flavin-Kofaktor (FMN oder FAD) besitzen [31, 39, 190]. Bezüglich der Reduktion von Dihydrodaidzein zu Equol ist allerdings unklar, ob das als membranständig angenommene ETF IfcBC involviert ist und ob ein mögliches Enzymsystem aus ETF und DHDR oder THDR besteht.

Ähnlich der Wasserstoff-abhängigen Caffeat-Reduktion in *A. woodii* ist vermutlich auch die Bildung von Equol von Wasserstoff abhängig [48]. Die Oxidation von Wasserstoff setzt die Anwesenheit einer Hydrogenase voraus, dessen primärer Elektronenakzeptor zumeist Ferredoxin ist [31, 177]. In *A. woodii* katalysiert eine aus vier Untereinheiten bestehende NAD<sup>+</sup>-abhängige [FeFe]-Hydrogenase (HydABCD) die Wasserstoff-vermittelte Reduktion von Ferredoxin [189]. Interessanterweise besitzen auch Equol-produzierende Bakterien in unmittelbarer Nähe der korrespondierenden, durch Daidzein induzierbaren Gene ein potenzielles [FeFe]-Hydrogenase-Gen. In *S. isoflavoniconvertens* weist die Sequenz von Orf2 (Gen nicht vollständig sequenziert) Übereinstimmungen zur bakteriellen Hydrogenase HydA auf. Das Gen *orf2* liegt, wie auch in *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens*, genabwärts des durch Daidzein induzierten Gens *ifcE* (Abbildung 24). Drei benachbarte Gene des HydA-kodierenden Gens weisen in *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* Ähnlichkeiten zu den Genprodukten HydEFG auf, welche für die posttranslationale Modifikation und Aktivierung von HydA vermutlich essentiell sind [157]. Möglicher Elektronenakzeptor könnte ebenfalls ein Ferredoxin sein, kodiert z.B. durch *fixX* in *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* oder auch das Eisen-Schwefel-Protein IfcE.

Wie *A. woodii* besitzen auch *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* die Gene einer  $F_1F_0$ -ATP-Synthase [219,254]. Dieses Enzym nutzt zur Generierung von ATP vorrangig die Energie eines Protonengradienten. Im Fall der Caffeat-Reduktion wird die Synthese von ATP durch einen elektrochemischen  $Na^+$ -Gradienten getrieben, welcher über den Rnf-Komplex erzeugt wird [19]. Der aus mindestens sechs nicht identischen Untereinheiten bestehende Rnf-Enzymkomplex ist außer in *A. woodii* noch in einer Vielzahl von anderen Bakterien enthalten und ähnelt der  $Na^+$ -translozierenden NADH:Chinon-Oxidoreduktase Nqr [22]. Auch die den *Coriobacteriaceae* angehörende Spezies *Eggerthella lenta* besitzt die Gene *rnfABCDGE* des Rnf-Komplexes [185]. Ob auch Equol-produzierende Bakterien einen Rnf-Komplex enthalten oder z.B. den membrangebundenen FixABCX-Komplex nutzen, ist nicht bekannt. Interessanterweise weist das korrespondierende Genprodukt zu *ifcD* in der Equol-produzierenden Spezies *E. mucosicola* Sequenzübereinstimmungen zur RnfD-Untereinheit von *Halothiobacillus neapolitanus* c2 auf (Annett Braune, unpublizierte Daten). Aufgrund der Schwierigkeit, membranständige Enzyme in *E. coli* zu exprimieren, war die nähere Charakterisierung des potenziellen Membranproteins IfcD von *S. isoflavoniconvertens* bislang nicht möglich.



**Abbildung 24: Vergleich der Genorganisation genabwärts von *ifcBC/fixAB* gelegener Gene in drei Equol-produzierenden Bakterien.**

Die Bezeichnung der Gene als *fixABCX* und *hydAEFG* in *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* repräsentieren hierbei nicht die tatsächlichen Genbezeichnungen, sondern weisen auf ein Gen mit vermutlich gleicher Funktion hin. Die durch Daidzein induzierten Gene von *S. isoflavoniconvertens* sowie die korrespondierenden Gene in *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* sind in Graustufen hervorgehoben.



## 4.4 Regulation der Genexpression

### **In Bakterien werden eine Vielzahl kataboler Enzyme durch das jeweilige Substrat induziert**

Die bakterielle Enzyminduktion ist die biochemische Antwort auf sich ändernde Wachstumsbedingungen, durch die der Organismus den Zellstoffwechsel effizient steuern kann und Energieverlust durch überflüssige Reaktionen vermeidet. Dabei bewirkt die Gegenwart eines geeigneten Substrats die Biosynthese von zumeist katabolen Enzymen [136]. Fermentationsexperimente mit *S. isoflavoniconvertens* und *E. mucosicola* zeigen, dass auch die Gene der Isoflavon-umsetzenden Enzyme nicht konstitutiv exprimiert werden, sondern induziert werden müssen. Dabei erfolgt die Induktion der Enzyme nicht nur in Anwesenheit von Daidzein oder Genistein, sondern auch von Dihydrodaidzein und Dihydrogenistein [140, 141]. Die im 2D-DIGE-Gel sichtbaren Spots der sechs Daidzein-umsetzenden Proteine von *S. isoflavoniconvertens* waren in ihrer Induktionsstärke verschieden. Hierbei kann die Proteinmenge durch verschiedene Faktoren beeinflusst worden sein, z.B. durch proteinspezifische Unterschiede bei der Transkription/ Translation oder durch Proteolyse. Während der zweidimensionalen Gelelektrophorese bildete das Flavoprotein IfcE als einziges der durch Daidzein induzierten Proteine multiple Spots aus (Abbildung 6). Bei diesen Proteinformen handelt es sich wahrscheinlich um Flavin-freie Apoflavoproteine, deren Entstehung durch einen hohen pH-Wert begünstigt wurden [15].

### **Der potenzielle Transkriptionsregulator Orf1 könnte für die Expression der Daidzein-umsetzenden Enzyme verantwortlich sein**

Obwohl die Biosynthese von Proteinen auf verschiedenen Ebenen (Transkription, Translation und Posttranslation) reguliert werden kann, ist die transkriptionelle Regulation der am häufigsten vorkommende Mechanismus zur Kontrolle der Genexpression kataboler Enzyme in Bakterien [32]. In *S. isoflavoniconvertens* kodiert das vor dem durch Daidzein induzierten Genkomplex gelegene Gen *orf1* für einen potenziellen Transkriptionsregulator der LuxR-Familie. Transkriptionsfaktoren dieser Familie sind benannt nach der charakteristischen DNA-Bindedomäne des transkriptionellen Aktivators LuxR, welcher in dem Bakterium *Aliivibrio fischeri* die *Quorum sensing*-abhängige Expression von Biolumineszenz-Genen reguliert [71, 227]. LuxR-ähnliche Transkriptionsfaktoren enthalten als typische Elemente eine *N*-terminale Autoinduktor-Bindedomäne bzw. Responseregulator-Domäne und eine *C*-terminale DNA-Bindedomäne [38, 147]. Im Gegensatz zur variablen Sensordomäne ist die DNA-Bindedomäne in den verschiedensten Bakterienspezies stark konserviert [70].

Der Induktionsmechanismus zur Expression der Daidzein-umsetzenden Enzyme ist in Equol-produzierenden Bakterien bislang nicht aufgeklärt. Zumeist kontrollieren ein oder mehrere regulatorische Proteine die Genexpression von Enzymen zum Abbau von aromatischen Verbindungen. Das entsprechende Substrat oder auch ein Intermediat fungiert dabei als Effektor des Regulatorproteins [176]. In *S. isoflavoniconvertens* könnte Orf1 die Genexpression der Daidzein-umsetzenden Enzyme als direkter Aktivator/Repressor regulieren oder als Teilelement eines Zwei-Komponenten-Systems. So zeigt Orf1 Sequenz-übereinstimmungen zu LuxR-Responseregulatoren von Zwei-Komponenten-Systemen verschiedener Bakterien und besitzt, wie für Responseregulatoren üblich, eine mögliche Phosphoakzeptordomäne.

In Stickstoff fixierenden Bakterien wie *B. japonicum* induzieren die von Leguminosen produzierten Isoflavone die Nodulations(*nod*)-Gene über das Zwei-Komponenten-System NodVW. Genistein stimuliert die Autophosphorylierung der Sensorkinase NodV, welche wiederum die Phosphatgruppe auf die *N*-terminale Region des Regulatorproteins NodW überträgt. In aktivierter Form bindet NodW als Dimer an die DNA und induziert die Genexpression der *nod*-Gene [127]. Beide Gene sind Bestandteil eines Operonsystems, in dem *nodW* genabwärts von *nodV* angeordnet ist [73]. In den Equol-produzierenden Bakterien *Eggerthella* sp. Stamm YY7918 und *A. equolifaciens* ist das korrespondierende Gen zu *orf1* nicht in der Nähe einer möglichen Sensorkinase lokalisiert. Aus diesem Grund ist die Schlussfolgerung, dass Orf1 tatsächlich Teil eines Zwei-Komponenten-Systems ist, vorerst nicht möglich.

Zusätzlich zum NodVW-System induzieren Isoflavone in *B. japonicum* die Nodulation durch Bindung an den transkriptionellen Aktivator NodD [187]. Die positive Regulation der Genexpression durch Flavonoide wie Kaempferol wurde auch für den Transkriptionsregulator KaeR gezeigt, welcher wie NodD zur Familie der LysR-Regulatoren gehört und in *Lactobacillus brevis* identifiziert wurde [167]. Darüber hinaus kann die Regulation der Genexpression auch über einen Repressor statt über ein Aktivatorprotein erfolgen. In dem Pflanzenpathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* ist Genistein ein Substrat des MexAB-OprM-Efflux-Systems und bindet an das Repressorprotein PmeR. Wie Orf1 liegt auch PmeR vor den zu regulierenden Genen und wird unabhängig von der Induktion durch Isoflavone/Flavonoide exprimiert. Die Bindung von Genistein führt zur Konformationsänderung des PmeR-Operatorkomplexes und dem damit einhergehenden Beginn der Transkription durch die RNA-Polymerase an der nicht weiter von PmeR besetzten Promotorregion von *mexAB-oprM* [228].

Ob Orf1 von *S. isoflavoniconvertens* an der transkriptionellen Regulation der durch Daidzein induzierten Gene beteiligt ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Einzig die Position des Gens in unmittelbarer Nähe zum Genkomplex der Daidzein-umsetzenden Proteine lässt eine regulatorische Kontrolle durch Orf1 vermuten. Für nach-

folgende Experimente, wie z.B. Induktor-Bindestudien, kann das gereinigte *Strep*-Fusionsprotein von Orf1 verwendet werden. Diese Studien würden zeigen, ob Orf1 Daidzein oder Genistein bindet und mit einem DNA-Bereich von *S. isoflavoniconvertens* interagiert.

### **Die Gene der Daidzein-umsetzenden Enzyme werden nicht in Form eines einzelnen Operonsystems transkribiert**

Bei der Expression der durch Daidzein induzierten Gene von *S. isoflavoniconvertens* wurden mehrere Transkripte gebildet, darunter drei Haupttranskripte. Diese umfassen zum einen die Gene *ifcA-ifcB-ifcC* wie auch *tdr-ddr* und das einzelne Gen *ddr*. Die Gene von Prokaryonten sind zumeist in Form einer Operonstruktur angeordnet. Dabei enthält jedes Operon ein oder mehrere Gene, deren Expression zu einer einzelnen polycistronischen mRNA führt und durch einen gemeinsamen Promotor, Operator und Transkriptionsterminator reguliert wird. Bakterielle Enzyme eines Stoffwechselwegs sind als Gene oft in Form eines Operonsystems angeordnet und werden gemeinsam transkribiert [163, 175]. Der Abstand zwischen den einzelnen Genen eines Operons beträgt zumeist 1–20 bp. Dies wird zur computergestützten Vorhersage von Operonstrukturen genutzt [152]. Zudem überlappt das Stoppcodon eines kodierenden Gens oft das Startcodon des genabwärts liegenden Gens, so dass die Gene eng angeordnet vorliegen [56, 175]. Im durch Daidzein induzierten Genkomplex von *S. isoflavoniconvertens* beträgt der theoretisch ermittelte Abstand zwischen *ifcA* und *ifcB* 22 bp und 3 bp zwischen *ifcB* und *ifcC*. Auch überlappt das Stoppcodon von *ifcB* das potenzielle Startcodon von *ifcC*. Eine Überschneidung der zwei ETF-Gensequenzen ist auch für die kodierenden Gene von EtfSL in *Paracoccus denitrificans* und *B. japonicum* bekannt [18, 244]. Der Abstand zwischen den durch Daidzein induzierten Genen *ifcC* und *tdr* beträgt 79 bp und 140 bp zwischen *tdr* und *ddr*. Des Weiteren beträgt die Länge der intergenen Sequenz zwischen *ddr* und *ifcD* 127 bp und zwischen *ifcD* und *dzr* 58 bp. Benachbarte Gene mit einem größeren Abstand als 20 bp können einzeln oder auch zusammen transkribiert werden, so dass zumeist mehrere Transkriptionseinheiten entstehen. Die gemeinsame Expression dieser Gene ist abhängig von internen Promotoren und Transkriptionsterminatoren, welche innerhalb der intergenen Sequenz von mehr als 20 bp enthalten sein können [163]. Die Analyse der nach Daidzein-Induktion exprimierten Gene in *S. isoflavoniconvertens* ergab, dass vor allem das Gen *ddr* separat transkribiert wird. Je ein potenzieller Promotor und Transkriptionsterminator genauf- und genabwärts von *ddr* weisen zusätzlich auf eine separate Regulation des Dihydrodaidzein-Reduktase-Gens hin. Die längste intergene Sequenz innerhalb des durch Daidzein induzierten Genkomplexes umfasst 665 bp zwischen *dzr* und *ifcE*. Für den Modellorganismus *Bacillus subtilis* wurde gezeigt, dass benachbarte Gene mit einem mittleren Abstand von 368 bp verschiedenen Operonen angehören und separat transkribiert

werden [163]. Aufgrund des Genabstands im identifizierten Genkomplex von *S. isoflavoniconvertens* ist es somit unwahrscheinlich, dass *ifcE* zusammen mit den übrigen induzierten Genen in einem gemeinsamen Operonsystem angeordnet ist.

Die Analyse mittels *Northern-Blot* und RT-PCR zeigte, dass die durch Daidzein induzierten Gene nur teilweise koexprimiert werden und mehrere Transkripte entstanden sind. Diese Ergebnisse und die ermittelten Genabstände weisen darauf hin, dass die durch Daidzein induzierten Gene von *S. isoflavoniconvertens* in Form mehrerer Operonsysteme reguliert sein könnten. Es ist jedoch auch bekannt, dass viele Operone in Bakterien nicht dem Standardmodell entsprechen und die Gene eines Operons auch in größeren Abständen als 20 bp vorliegen können. Dies tritt vor allem bei stark exprimierten Operoneinheiten auf, welche aufgrund von mehreren internen Promotoren und Terminatoren alternativ transkribiert werden und so multiple Transkriptionseinheiten bilden. Die transkriptionsregulatorische Aktivität alternativer Promotoren und Terminatoren ist dabei abhängig von bestimmten Umweltreizen [163, 175]. Andere regulatorische Mechanismen wie überlesene Transkriptionsterminatoren (*read-through terminators*) und Riboswitches können ebenfalls zur Bildung alternativer Transkripte führen [77, 163, 184].

## 4.5 Abschließende Betrachtung und Ausblick

An der Umsetzung der Isoflavone Daidzein und Genistein sind in dem humanen Darmbakterium *S. isoflavoniconvertens* mehrere Enzyme beteiligt, welche in der vorliegenden Arbeit identifiziert und charakterisiert wurden. Auf Grundlage dieser neu gewonnenen Erkenntnisse kann in zukünftigen Studienprojekten der bakterielle Metabolismus der Isoflavone eingehend erforscht werden. Dies beinhaltet z.B. die detaillierte Aufklärung des Reaktionsmechanismus bei der enzymatischen Umsetzung von Isoflavonen in *S. isoflavoniconvertens* sowie die funktionelle Charakterisierung der noch unbekanntenen, durch Daidzein induzierten Proteine. Weiterhin empfiehlt es sich, die Funktion des möglichen Transkriptionsregulators Orf1 aufzuklären und damit einhergehend den Mechanismus der Enzyminduktion zu untersuchen.

Die ermittelten Gensequenzen der Daidzein-umsetzenden Enzyme von *S. isoflavoniconvertens* sowie die korrespondierenden Gene weiterer Equol-produzierender Bakterien bieten die Möglichkeit der mikrobiellen Metagenomanalyse. Ausgehend von hochkonservierten Sequenzen innerhalb der Gene der Daidzein-umsetzenden Proteine DHDR, THDR und DZNR könnten ähnliche Gene von noch unbekanntenen Equol-produzierenden Bakterien im humanen Darmmikrobiom identifiziert werden. Grundlegende molekularbiologische Methoden wie die PCR sowie die Analyse von Stuhlproben auf Equol-bildende Aktivität erlauben hierbei eine einfache Durchführung solcher Studien. Die Metagenomanalyse bietet damit auch eine zusätzliche Methodik zur Identifizierung von Equolbildnern. Deren Identifizierung erfolgte bislang durch die Quantifizierung von Equol im Urin bzw. Plasma nach Verzehr von Isoflavonen. Zum einem wäre von Interesse, ob auch Individuen, die kein Equol im Urin ausscheiden, Darmbakterien mit Genen für die Equol-Bildung besitzen. Zum anderen könnte durch Typisierung des individuellen Darmmetagenoms die Frage beantwortet werden, ob die vielen uneindeutigen Ergebnisse epidemiologischer Isoflavon-Studien im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Enterotypen der Darmmikrobiota stehen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen kann ein erhöhter Verzehr von sojahlaltigen Lebensmitteln die bakterielle Bioaktivierung von Daidzein womöglich steigern. Ausgehend von der Hypothese, dass die Equolbildung durch die intestinale Mikrobiota einen präventiven Schutz vor bestimmten Krankheiten bietet, könnte dies zu einem gesundheitsfördernden Effekt für Individuen mit Isoflavon-umsetzenden Darmbakterien führen.

## 5 Anhang

**Tabelle 7: Verwendete Primer und Primerkombinationen.**

Primer- paar	Primer	DNA- Abschnitt	Sequenz (5' → 3') <sup>a,b,c</sup>	T <sub>a</sub> (°C)	Position <sup>d</sup>
<i>Amplifizierung von Genfragmenten</i>					
1	DR4F	<i>ifcC</i>	ACSAACGCSGARGGCGARGG	63	3106 - 3125
	DR3R		GCYTCSGGGTCGTTGTTTAC		3400 - 3419
2	DR3F	<i>ifcC-ddr</i>	G TSAACAACGACCCSGARGC	65	3400 - 3419
	DR1R		CTTSGCCTTSAGYTCGTCGCGTA		5387 - 5410
3	DR4F	<i>ifcC-ddr</i>	ACSAACGCSGARGGCGARGG	62	3106 - 3125
	DR1R		CTTSGCCTTSAGYTCGTCGCGTA		5387 - 5410
<i>Inverse PCR</i>					
4	DR8F		CAGCGTTTGAAGGGCAAGAAG	55	5255 - 5275
	DR7R		TGAGAGCGAGGTTTTTCCTTCG		3182 - 3202
5	DR10sF		ACGGCGCGAACATTATTATC	50	5649 - 5668
	DR9sR		GCCAAAGGAATGCCATAGAA		4801 - 4820
6	1745sF		TGAAAGCGTGACCTGGTATG	52	2733 - 2752
	1745R		GGTGATAATTGCCATACGC		2600 - 2619
7	1745bF		GATGCGTTGGTCCGTACTC	54	2291 - 2309
	1745bR		CGATAACAACCGCTCCAC		2177 - 2195
8	DR15fbF		CCTTGACCATCGACGAGATT	52	7113 - 7132
	DR16fR		TCATAATTCGGGAAGAAGTGC		7064 - 7085
9	Eco-F		GCATGATTCGCAAAGACAAC	50	9784 - 9803
	Eco-R		GCATTGGCCCTGATTAC		9657 - 9674
10	DR24F		TCTTTCAAGGTGTCGGTCGT	53	1163 - 1182
	DR25R		AGAGCGTCACTGAGCAGAAA		1090 - 1109
<i>Subklonierung</i>					
11	1642F	<i>ddr</i>	AAGGACCTCATGGCGCGTAG	56	5091 - 5110
	1642R		GTCGACGCAGGCGCTTTAG		6028 - 6046
12	DR3F	<i>tdr-ddr</i>	G TSAACAACGACCCSGARGC	64	3400 - 3419
	1642R		GTCGACGCAGGCGCTTTAG		6028 - 6046
13	DR19F	<i>dzt</i>	CTTATTTTCCTCAAGCCTGTGC	53	6569 - 6590
	DR20R		AACCCGTTTGTTCCTTC		8775 - 8794
14	F-THD	<i>tdr</i>	AGCGGCTCTTCAATG CAGAATTCGACGTTGAATAC	56	3580 - 3600
	R-THD		AGCGGCTCTTCTCCC CATGTTTGCAATCGCGTGCC		5015 - 5034
15	F-DHD	<i>ddr</i>	AGCGGCTCTTCAATG CACAAGAGGTTAAGGCTCC	56	5177 - 5196
	R-DHD		AGCGGCTCTTCTCCC GCGGATTCGCCCTGCATA		6010 - 6028
16	F-THD	<i>tdr-ddr</i>	AGCGGCTCTTCAATG CAGAATTCGACGTTGAATAC	56	3580 - 3600
	R-DHD		AGCGGCTCTTCTCCC GCGGATTCGCCCTGCATA		6010 - 6028
17	F-DAI	<i>dzt</i>	AGCGGCTCTTCAATG CAGCAGCGAAATACCCCC	56	6698 - 6716
	R-DAI		AGCGGCTCTTCTCCC CACCATGCGCGCTACGGC		8609 - 8626
18	Astrep-F	<i>ifcA</i>	AGCGGCTCTTCAATG AAAGCTCAACTGAATCGTATTG	60	1382 - 1403
	Astrep-R		AGCGGCTCTTCTCCC CTCAGCGTCCACGTGCA		1832 - 1849
19	Bstrep-F	<i>ifcB</i>	AGCGGCTCTTCAATG ACAACGATTGCAATTTTCAAGTG	60	874 - 1896
	Bstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCC CAGCACCCCTCTGCCTT		2573 - 2590
20	Cstrep-F	<i>ifcC</i>	AGCGGCTCTTCAATG AGCAGCGTATGGGCAATTATC	60	2596 - 2616
	Cstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCC CTCAGAGCTTGAATAAATGCA		3477 - 3498

Primer- paar	Primer	DNA- Abschnitt	Sequenz (5' → 3') <sup>a,b,c</sup>	T <sub>a</sub> (°C)	Position <sup>d</sup>
<b>Subklonierung (Fortsetzung)</b>					
21	Bstrep-F	<i>ifcB-ifcC</i>	AGCGGCTCTTCAATGACAACGATTGCAATTTTCAAGTG	60	874 - 1896
	Cstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCCCTTCAGAGCTTGAATAAATGCA		3477 - 3498
22	Dstrep-F	<i>ifcD</i>	AGCGGCTCTTCAATGAAGGGTCCTCAAGGATATGC	60	6158 - 6177
	Dstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCCGGCAGCTTTCGCCGGATC		6620 - 6637
23	Gstrep-F	<i>ifcE</i>	AGCGGCTCTTCAATGCGGAAACTGTCTGTTGAGCC	60	9294 - 9313
	Gstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCCAACATATTGGACCCTTCCCT		11107 - 11126
24	PYVal-F	<i>orf1</i>	AGCGGCTCTTCAATGCGCGATTTCAAAAACGATCGC	63	258 - 278
	PYstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCCAAGCCGCGTTTTGCCGAA		1001 - 1019
25	PYLeu-F	<i>orf1</i>	AGCGGCTCTTCAATGATGTCTCGTCGAAAGAAGCTC	63	300 - 320
	PYstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCCAAGCCGCGTTTTGCCGAA		1001 - 1019
26	PYMet-F	<i>orf1</i>	AGCGGCTCTTCAATGCGTTCGCGCAGCAGCCC	63	336 - 352
	PYstrep-R		AGCGGCTCTTCTCCCAAGCCGCGTTTTGCCGAA		1001 - 1019
<b>DNA-Sonden für Northern-Blot-Analyse</b>					
26	SA-F	<i>ifcA</i>	AAGCTCAACTGAATCGTATTGC	60	1383 - 1404
	SA-R		GTCGCAAACGTCTTTCCAAT		1818 - 1837
27	SB-F	<i>ifcB</i>	CATGAAGTCGTGAAGGTTGC	60	1982 - 2001
	SB-R		ATTTTCTCAACCGGGAGCTT		2426 - 2445
28	SC-F	<i>ifcC</i>	CAAAGTCATTGCCGTGAAAG	60	2904 - 2923
	SC-R		TACAAGCGAGGCGAGATTTT		3310 - 3329
29	C-F	<i>tdr</i>	AAGATGATCCCAATGAGGTTTG	60	3950 - 3971
	C-R		GGCCAGTTTTATTGATCCACAC		4399 - 4420
30	D-F	<i>ddr</i>	CAAGTGGATCTCTCCGAAG	60	5224 - 5243
	D-R		TTGCCCTTCCTCAGATACGG		5630 - 5649
31	F-F	<i>dzr</i>	TCGATAAGCCCATCGTAACC	60	8148 - 8167
	F-R		ATACACGTCCATGTCGCTGA		8532 - 8551
32	SE-F	<i>ifcE</i>	TTAAGAAGTTCGCGGTCGAT	60	9898 - 9917
	SE-R		TCTTGGTGAGCAGTTCAACG		10310 - 10329
<b>Positionsbestimmung von Transkriptionsstarts</b>					
33	IfcY-R1	<i>orf1</i>	TTCATCGAGGGAATCAAAGC	51	829 - 848
	IfcY-F3		GGTTCTTCAAGGTGCCCTAA		764 - 783
	IfcY-R2		AAGCCAAAGCCCAAAACAG		711 - 729
34	IfcA-R1	<i>ifcA</i>	CAGGGAGCGAAAAATCATCTC	53	1709 - 1728
	IfcA-F3		AGTTCTGGCATGGCAAGTTC		1686 - 1705
	IfcA-R2		CGAGCTTCCTCAAAGTCGTC		1647 - 1628
35	IfcB-R1	<i>ifcB</i>	ATTTTCTCAACCGGGAGCTT	53	2426 - 2445
	IfcB-F3		GTTTATTCTCCTGCGGTTA		2341 - 2360
	IfcB-R2		GAGTCACGACCAACGCATC		2291 - 2309
36	IfcE-R1	<i>ifcE</i>	CCCTGATTACATGGCTTTC	51	9648 - 9667
	IfcE-F3		AGGAAGTGCTTTCGTTTCAG		9499 - 9518
	IfcE-R2		CACGCATTTTCCACAGGTTT		9439 - 9458
<b>Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse</b>					
37	IfcY-F	<i>orf1</i>	GCCGATACTATTTCGAGCAT	52	555 - 574
	PY-R		TGCCTGGAAAATGCCACTTA		1066 - 1085
38	ifcD-F	<i>ifcD</i>	CGGTTATTTTCGAGCTTCTGC	51	6297 - 6316
	ifcD-R		AATCGGCAATGAGGAAATTG		6466 - 6485
39	SE-F	<i>ifcE</i>	TTAAGAAGTTCGCGGTCGAT	60	9898 - 9917
	SE-R		TCTTGGTGAGCAGTTCAACG		10310 - 10329
40	IfcY-F	<i>orf1-ifcA</i>	GCCGATACTATTTCGAGCAT	53	555 - 574
	IfcA-R2		CGAGCTTCCTCAAAGTCGTC		1647 - 1628
41	Etf-baF	<i>ifcA-ifcB</i>	GAGATTGCCGTGAATGAGTTC	53	1748 - 1768
	1745bR		CGATAACAACCGCGTCCAC		2177 - 2195
42	IfcA-F3	<i>ifcA~ifcC</i>	AGTTCTGGCATGGCAAGTTC	53	1686 - 1705
	DR7R		TGAGAGCGAGTTTTCTCTCG		3182 - 3202

Primer- paar	Primer	DNA- Abschnitt	Sequenz (5' → 3') <sup>a,b,c</sup>	T <sub>a</sub> (°C)	Position <sup>d</sup>
<b>Reverse-Transkriptase-PCR-Analyse (Fortsetzung)</b>					
43	1745bF	<i>ifcB-ifcC</i>	GATGCGTTGGTTCGTGACTC	53	2291 - 2309
	DR7R		TGAGAGCGAGGTTTTCTTCG		3182 - 3202
44	1745bF	<i>ifcB~tdr</i>	GATGCGTTGGTTCGTGACTC	53	2291 - 2309
	C-R		GGCCAGTTTTTATTGATCCACAC		4399 - 4420
45	1745aF	<i>ifcC~tdr</i>	AAAATCTCGCCTCGCTTGTA	50	3310 - 3329
	DR9sR		GCCAAAGGAATGCCATAGAA		4801 - 4820
46	1745aF	<i>ifcC~ddr</i>	AAAATCTCGCCTCGCTTGTA	52	3310 - 3329
	DR12bR		TGGGCACACAGCAATTCCTG		5318 - 5337
47	C-F	<i>tdr~ddr</i>	AAGATGATCCCAATGAGGTTTG	53	3950 - 3971
	DR12bR		TGGGCACACAGCAATTCCTG		5318 - 5337
48	tdr-F	<i>tdr~ifcD</i>	TGCAGGTCATCACCTCTGAC	53	4868 - 4887
	DR23R		CGCAGAAGCTCGAAATAACC		6298 - 6317
49	DR8F	<i>ddr~ifcD</i>	CAGCGTTTGAAGGGCAAGAAG	53	5255 - 5275
	DR23R		CGCAGAAGCTCGAAATAACC		6298 - 6317
50	DR10sF	<i>ddr~dzt</i>	ACGGCGCGAACATTATTATC	51	5649 - 5668
	DR16fR		TCATAATTCGGGAAGAAGACTGC		7064 - 7085
51	DR19F	<i>ifcD~dzt</i>	CTTATTTTCCTCAAGCCTGTGC	53	6569 - 6590
	Sac-R		TCTCGAACACCACCACATTG		7915 - 7934
52	F-F	<i>dzt~ifcE</i>	TCGATAAGCCCATCGTAACC	53	8148 - 8167
	Eco-R		GCATTGGCCCTGATTAC		9657 - 9674
<b>Sequenzierung</b>					
	DR6F		TGGCGGCAAGGCAGTGATTCTG		4143 - 4164
	DR14F		GATTGGCGTTCAGTTCGTTACC		6256 - 6277
	DR18F		GTCAACTCCTCGGTGGAATC		8979 - 8998
	DR21F		CGTTGAACTGCTCACCAAGA		10310 - 10329

<sup>a</sup> Die Synthese der Oligonukleotidprimer erfolgte durch Eurofins MWG Operon (Ebersberg).

<sup>b</sup> Klein und kursiv dargestellte Sequenzen kennzeichnen Erkennungsregionen für das kombinatorische Klonen zur Erstellung von Klonierungsvektoren.

<sup>c</sup> Dick hervorgehobene Buchstaben kennzeichnen am 5'-Ende phosphorylierte Nukleotide zur Ligation von cDNA.

<sup>d</sup> Alle Positionen beziehen sich auf das vollständig sequenzierte *S. isoflavoniconvertens*-Fragment von 11.964 bp.



**Tabelle 8: Nachgewiesene Peptidsequenzen der sichtbar induzierten (2D-DIGE-Analyse) Daidzein-umwandelnden Proteine von *S. isoflavoniconvertens*.**

Die Identifizierung der Proteine erfolgte anhand von Übereinstimmungen der ermittelten Peptidsequenzen mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen identifizierter Gene.

Protein-Spot <sup>a</sup>	Kodierendes Gen	Induktionsfaktor	Peptidsequenz (Position der Aminosäuren) <sup>b</sup>
1	<i>ifcA</i>	142	LQTEGEGVSGIAVR (69 - 82) VDDFEeaR (83 - 90)
2	<i>ifcB</i>	210	TTIAIFK (2 - 8) EGDALVVTR (139 - 147) QDVQVDSPAVIAVAAR (154 - 169) KLPVEK (186 - 191)
3	<i>ifcC</i>	26	ALVFGSSGLagR (30 - 41) TLPEAmagtiAK (58 - 69) VDGDAATVER (111 - 120) VLSTNAEGEGGAGLQQAER (169 - 187) VVGVGLGIGAK (188 - 198) VVGTTSTQK (233 - 240) VIAAVNNDPEASIFR (266 - 280) ecTYGIVGDVQK (281 - 292) ILPAFIQALK (293 - 302)
4	<i>tdr</i>	179	nvVVIEK (32 - 38) imGYSHQR (83 - 90) ANYEVAR (91 - 97) AFVENSAETIDIYR (98 - 111) ELHIEDGR (167 - 174) VVGVAESDGEPLR (175 - 188) AVILATGGMGSSPDR (193 - 207) GVDEAYFK (389 - 396) KPQYLR (397 - 402)
5	<i>ddr</i>	83	AQEVKAPK (2 - 9) ISGAPEFGK (10 - 18) WISPEESVGQR (19 - 29) KILLTGTTK (34 - 42) TPGAAAAYADELK (65 - 77) AAGFDCDLADYEAVK (83 - 97) QLAAEGGPFGR (195 - 206) EMASGLVAAQTTQR (226 - 239)
6	<i>ifcE</i>	24	AKLSVEPR (2 - 9) FGSFVEEYER (16 - 25)

Protein-Spot <sup>a</sup>	Kodierendes Gen	Induktionsfaktor	Peptidsequenz (Position der Aminosäuren) <sup>b</sup>
6	<i>ifcE</i>	24	TLIDAPVNIR (192 - 201) saVDQLAADK (206 - 215) ATPAPAAATGK (216 - 227) YGIPAYR (267 - 273) ERLDEDVR (277 - 284) IGDNECPDFTGK (347 - 358) NVVVIGGGnvamdcar (359 - 374) AGAASVTVAYR (379 - 389) TYFEADDGLK (486 - 495) TVIIAIGAGK (515 - 524) VNIVERPAR (560 - 568)

<sup>a</sup> Die Zahlen entsprechen den nummerierten induzierten Proteinen im 2D-DIGE-Gel (Abb. 6).

<sup>b</sup> Kleinbuchstaben kennzeichnen nicht eindeutig identifizierte Aminosäuren.

**Vollständige Sequenz des genomischen DNA-Fragments von *S. isoflavoniconvertens* (11.964 bp).**

ctgcaggccagcgcgacgttcataaactctaaagcgcaaagcaccaagcgctcgctctaacagaaccacgaatcgaaggaggcc  
gtcctacggggcgccctccttgattgtgggctcgttagtgggtgcgattggcggaatcactcggataaaatctttatccg  
agtgattaaaaaatgacaccagaacagggcgataattaagcaatacaatgcaaaagtctcaaaggggacaagggcg  
tgcgttggtggccgatttcaaaaacgatcgacaaaaggggagcagttatttggatgtctcgtcgaagaactctacgatattcat  
atggcgttgcgcgacgaccaagcgttgggagcgatcctctgagggtggttggccgatgatgacagcattttgtcgaaggc  
attgccgcgctcgtgcacgaatgggatgaattcgacctggggcaaagcgacgacgctcgaaggcgtgcgcgcgcaatgcc  
cgagaaaaagcccgcggttgttatgatggcgccacattccacggctcaggcagcggcactattcgcagcattcttggca  
tgatcctaaccattgcattatggtcgtggcgtcgatggggcagagcggcttcgtgctcgatgcgctgcgcgcggcgagcgg  
tttggatcgcgcgacgaaatgacggccgataggctccgatcgtgtttgggcttggcttgcggcgatatgcctttccggg  
tcgctcggcacggttcttcaaggtgcctaataaacgatatggctggaagggcgccgattccgtggcaagcgaacgcttggat  
tccctcgatgaacgcgaacgcacgggtgcttgcggcacttgaagaggggcttccgaatgcggaatagcgcacgtctttttga  
gagcgaacgggtgaagaaatgcatcggcagcattatccaaaagctccacgtgaacaatcgcgtgcaggcggcggtgcttgc  
gcaaacgcggctttaggcaatttggcacaacgcgctcggctacctgcattcatgcgggcttaagtggcattttccaggcagta  
gtttctgctcagtgacgctctaatcttataaacgaaccttatggatccgttctatgcggaatccatttttattcttcaaggtg  
cggctgatatctcgcctggttcgaaatgcttatttttacgagccaatggctactcctcattatccccacagaacgcgccaaccag  
caacaatagcgggtgcaaacgcgcttgatttcgcttgcagtcacgctcgaagggcgagtttgagcattggcgtccataacg  
tggcgcgacgctcaaacgaaaggggattcgttatgaaagctcaactgaatcgattgccctgcgcgcggcagatgccgataagg  
ctgtcgcggacctgcacgcttctgggctgaccttctatgggctgatgacgatgagcacatgggctgcgcgctcgtctgcc  
aagaccggcgccattgaggttatggctccatgcacgatcacgacgccattggcgctaccagcgcctgcagaccgaggggtgag  
ggtgtgagcggcattgccgtgcgcttgacgactttgaggaagctcgcgcgcgatttgcgcaaacgggacttacgccgattccg  
agttctggcatggcaagttccacgagatgattttcgtccctgccccgaaaccacggcctcagattgccgtgaatgagttccc  
gacgccaatggcgcggtatccaggttgccttggacatgggcccgattggaaagacgtttgcgacgtggacgctgagtagaag  
aacggttgggatataatgacaacgattgcaattttcaagtgggcatgatccgatgacgagagggttggtgtcgacggcaac  
gtgaagtggctcgccaacaagccgctgcgggtgacgacgatcatgaagtcgtgaaggttgcgctcggcattgctggtgaaggc  
gaagtcgtgggcatgacgatggcgggtggcgataaccgcttgcggctgctcgtggcgcaaagcgacccatcgccatcgagggc  
gtcgacgcgctggcacagcccgtcagctcgcaggcgttggctgctcggcttcgtcgcaggaaggcgtggacgcggttgtta  
tcggcgatagcgcctgggagccgatggtgccgagcctgctcgcgagcatgctcggatggcgtgcttcttctgcccgatggcgc  
ccgccgcaaggcagatcgcttggctgactcgccttccggcggggtacgcaagacgtgcaggttgattctcctgcggttate  
gccgtggcggtcgcctgaaagaggagagcaagcccgtatgcgcgacgtgcttgcagctcgaagctcccggtgagaaaatc  
gctggtagcgcagagggttctgcatatggattctcagggcacgcatgctcccgaagtgctcctgcgcgcattttcgacggaa  
cgaaccccgaggcagctgtcgagcagctcgtggcgcccttgaaggcagaggggtgctgtaatgagcagcgtatgggcaattat  
caccgacgaaatgctggccgaggcagtgggggcgtggcactgcgctcgggactcccacaaagcgtcgttttcggctcctcg  
ggcttgcggccgcttgcgggcttgcgcttgaagcgtgacctggtatgatgccgataagactctcccgaggccatggcgg  
gcaccattgccaaacgtgccgagcaggaaaagcctgtcgcgatttagcatccgattcggcgacgtctcgcgctctgctcggcc  
tgttgcggttcttggggcgagccgttacgggcaaagtcattgccgtgaaagtcgacggcgacgctgcgactgtcgagcgttgc

gttcccacagcgaagcggttgacgtgcttgcggcgcctggcagcgtggtgtgcacgatgccgatggcggttgcgaggcgga  
agcctctgagccggctcgtcgtatccgaaggcgcatttgacgaggatgctcgcataaggtgctttccaccaacgctgaaggcga  
aggcggcgcggcctgcagcaagcagaacgcgtggtcggcgttgggttgggcattggcgcgaaggaaaacctcgtctcatcg  
acgagcttgcgggcatcatgggcgccgaagtcgctgcacgcttccgctgtgcgacaactatcactggttcgagcacaatcgcg  
tggtgggcacctctaccagaaaatctcgctcgttgtatgtgacttcggttctcgggcgcgccccagcacatgacgggct  
gcgcgcacgaaggtcattgcggcagtgaacaacgaccccgaggcttcgatttccgcgagtgcacctatggcatcggtggcga  
tgtcaaaaagatttccctgcatttattcaagctctgaagtaatcgcggctgcgatgggcgcagctctacgggctgtgccctca  
gcggcgcggttaggcataccaaggaggaaacaatggcagaattcgacgttgaatacgcacatctcgtcgttgcggcggcgc  
atcgggcaaatcggcagcgttattgccgcgctgcgggcaaaaatggtgcttatcgagaagatgcccgaaccggcggtt  
gtcgggttgcggcaggcagcgttcatttgaatcgcgcttcagaaggagctgggaacgccccgctgagcaataaccattt  
ccccaccaagcaagaggcctcgataaaatcatgggttacagccaccagcgcgcaactacgaagttgccgcgcatgttggga  
gaactccgcgagaccatgcacatctatcgcgacctgggcgtcgtgtataagacctgcgacatcggcgcgaagatgatccaa  
tgaggttggacgttccatttcccggggcttgggcgcgcatggcaggaggttctgctcgcacccattcagaaactcgaggt  
gacatctcaccgagacccggccaaagaactcatcatcgaagacggcgcgctcgtgggcggttggccgaatcggatggcgaa  
ccgcttcgattggcggaaggcagtgattctgggcgacggcgccatgggctcgcagcccgatcgatttcaagtacagctggt  
ttgcggcgcagcgtacaacatgaacgtgcttactcctctgcagaacgtgggcgacggtctgcacctcgcgttctcggggcgc  
cgacccaacaccattaccacctgcccgtcgtcgtcgcggcgccgcgacatgacctggattcccagctcggcggtgcggg  
cgtgaaccgggtgtgtgatcaataaaactggccatcgcttcgcggccgaatcggctcgtgaaaacctcggcgatatcggaac  
gtattacggcaagcagcctggcggttctgattggtccatcctctcccaggcagacgttgaccgctggtgagcgaaggctccgaa  
atcgccatcggcgcgagttcgtggtgtatcacaagccatgacgggccttctgcccagcttgaggcgcatttggagtcggcctgg  
tgaagaaggccgataacctcgaagagctcgtgaacagatgggcgctgccaccgacgcttcgttgaacatggctgcctata  
acgaggcgtgcgagaggcgcgtcgcgatgaggcgtacttcaagaaaccgcaataacctgcgtgcgctcgtcgcgaccgcttctatg  
gcattcttggcaactggcaccatgggttctcggcgccgcattaaagtcaacggcgatatgcaggtcatcacctctgacggaga  
cgcgattcctggcctgtatgcagtcggcctggacgccacggcctgtatggcgattcctacaacatggaaattcctggttgcgcga  
atggttctgccacacttcgggcgcgcatcggcgcgcccacgcgattgcaaacatgtaattgtccgcgcggccccgtatgccgtgc  
ggcgcggcgcctcacaactctcacaaggacctcatggcgcgtagtggcgcctgagaatatggcttcccgtgcgcgtggggcgc  
gcgggccaatgaaaggggaaactcatggcacaagaggttaaggctccgaagattccggtgctcccgaattcggcaagtggatc  
tctcccgaagagtcggtcggccagcgttgaaggcgaagaagatcttgctcacggcactacgaaggcgtgggcccacgtcgcg  
caggaattgctgtgtgccacggcgcgttcgtgtgcggttctggcgtacccccgggtgctgccgtgcttacgccgacgagctgaa  
ggcaaaagggtataaggcccggttcgattgtgatttggcgactacgaggccgtgaagaagtgggttggccagtgcgccgaa  
cttatggcgccatcgatgctcgtcattaacaacgcttcccaccgggcatggcaccgttcgaggccatggacgttgagacctggaa  
ctacggcattcgaatgagctcgcacctggtgtacaacgtgtgcaattgtgcgtggcctatctgaaggaaggcaacggcgcgaa  
attattatcacctcttccacggttggcttccagggtccaactctccgcagcgcacacgcgcccgaaggcgcatgcctggcg  
cttcccgcagctcggcgtgaaggcggccccctcgaattcgtgcaattccgtgacccccggcctggtgtggaccgaagccat  
ggcaacattccgaaggaaatggcgtcgggccttgttggcgcgaaaccacgcagcgcgacccatcgatcccacgacatcgacatac  
gcttacctgttctggcttcgatgaggccccgcagatactgccccaatatccccgttgacggcggtgctctggcgcacgcg  
ggcgtatgcaggcgaaatcgctaaagcgcctcgtcgcacgattcgcgaagcattgaaaaggcgtgctgcgcttggcggga  
gcgcgcccccttctcgttggctcgcctcgtcgttggggcgagccttggaaaggaaggatacattccatgaagggtcctcaaggatat

gcattgatcatcaatgtggccatgaacatcattttgggctgctaattacggtttgctttgacttcacgctccaggcaatgattg  
gcgttcagttcgttacccccgtttggtggccggcacggttatttcgagcttctgcgtggggtttaccgcggaacgcttgcce  
cgccatgccgtggggcatgaagctggcgggcttgcgaaggttaagccgggcttgggcatgcacgtgtgctgctcggtga  
tgctcgggctgtgcatggcgtgtgcattacgatcggcaatttcctcattgccgatttgggaacgtcgggccttgcggcgcttt  
gagcgacattgcggttggcctgcccatcatcgttgctacgcgattgttctcgtccttattttcctcaagcctgtgcaggcgttg  
cggcgaagatttcgggcttcgatccggcgaaagctgcctagcgcacatcttcgcgccactcttcaatcctgtctatgaagaagtaa  
ggagtacaacaatgcagcacgcgaaataccccatttgttctcgaagggcaaagtgggcaaggctactaccaagaaccgct  
tattcgtaatccatgggcacttacctaatgtcggcaagctgtgcgacgtgtccgatcgaacatcaagcacgctgccgaggc  
cgccgagggcgccggcattgtttctggacaattgccttattgtggacggctatcacatgggccttgcggcatacagatga  
cacctacatccccgggctttccatgattgccaggccatgcacgatcacggcgcggttgcgggcatgcagcttgcgcatcccgg  
tcgacatgggctttgcggcgccgacaacgtggttgcgcctcggcagttcttcccgaattatgattaacggggcgcgac  
ggttcgcgtcccttgaccatgcagagattcacgaaatcgaagagcagtagggccaggccggcgcgctgtgaagcaggccg  
gcttcgatattgtgaagttcatggcgcatgcgggtgcctgccacgaactttcttccgcgacgacaaccagcgaaacgacat  
ttacggcgctcgtgttcaaccgacgcgttcttgttgaagtattcgcgtcatcaaacgctacgttggccccgatttccccg  
taagcgtgaagcttgatggacgactgcgagccgacggcattcgcctggaggaatgatcgcacacctgtcgcgtgctggagc  
gtgagggcgttgcctgtgaacctggttaccgacgacgatgtgacggcgaacttctccacgagttctaccctggctgattg  
cgccgatatggccccaaggtgaaggaacaggtgcatattcccgttatggtgaccggcgccattcagtcgcccgaagccgcca  
gaagatttcgccgatggcaaggtcacttcgtgggcaccgcgcccagtgctgcccaccaggcatgggtcgagaaggctc  
gcaccggccacgaggaagatattcggcctgcacccgttgccaaatcggctgcaccgacctggcattctgggacatcatcca  
ttctgtgcgaccaaaccacgctgttccattattacgaggagctctacccaaggctgaaacgcccgaaaaacgcttgcgctcgt  
gggcgcgggccctgcgggttgcgaagctgcgctcacgctgaagaagcgcggccacaatgtggtggtgttcgagaagcgcgaaa  
tcggcgccacgatgatcgaagccggcgccgctgtgataagtgcgacatcaaccgctcattgaatactaccgcaagcagctca  
agaagcacaacatcgaggttcgaagcaggaggtcacccccaggatcgcggcggttggcttcgacgcctgcacgttgcga  
ttggcgcgagccgcgcaagctgaacgttctggtatcgataagccatcgtaaccgagggtatcgatttctgtacggctcaa  
gaaggtggaagaaaatcggtgtcgtcgtggcgccgctaccaccagggctgaaatcgccctggatttggccgagaagggaa  
tggacgttaccatcgtgaagcgcggcacgaaatcctgaacccgcccgggtgccagatggacattgagtacactattcgcctgca  
ccagctggcgctgaagctgatgactggctaccgtctcgatagcgtgaccgacacctcggccatcgccatcgaccagtagcggcaa  
accgtcgagcttccctgcgacaacgtggttatttccgcccgttctcaatcgtcctggattcggcgagaagctcgaggaaatcag  
cgacatggacgtgtatatggcggcgactgcaagaaggtcgcggaaatcctgacgcgacccatgccggctacgccgtagcgcg  
catggttaggaaaacgcctcacctcatcgcggttgggcttgcgcctgcgcccggccatttctctcgaaaaaagaagccgccc  
aatgggacggcttcttttgcctccacggagcaggcaaaagggagagagaaaaggacgccgctccaggaaggaagggaaaacaa  
acgggtttgcgttttaagcgatttgcctccgctcgagagcaggggttcgcccgtgcagtacgacgccatcgttgcgaag  
aacaggatgccgttggcgatttcagccgggtcggcagtgccggccatggggcagcagctcacggtgttgcgtgcagcgtgaaaa  
ccaatgacgagatcgattggcgattccaccgaggagttgacaatcgcggaaacgcttccgaaagccgttgagtatttggcgata  
ttggtgctgttgttgcggccagggccgcttgggttgcggcgctccgtgtgggtaaatttctcctgcacaaataccctatcggatga  
gctaattaacctatacgaacgtgggagagtcagccttcccaaggtacactttcaatgcttgagagcatagcctggcggaatgcg  
agggtctgcgggtggcgggcttgggtggggttccgcacggttatgagtcaaccacatatcaaaggggatatatggcgaa  
actgtctgttagccgcgcgcaagacgacggcaagttcggtcgtttgtcgaagagtatgagcgacgcattaaagcgcgcct

ctgggcatgtgcgcggtggcattccagcttgatttctgcgcgccggcggttgccaaacctgtggaaaatgcgtgccgtgccgt  
gaaggcatcggtgcattgaggaactacttgaggaagtgcttgcgtttcaggccgagcctggcgcgctcgacgagattcgcgc  
gcaggcgaacgtcgtgcgcgatacggccgatttgccatcggtggcatgcggcggaagtgcttcttggcggccttgacgcgt  
tcaaggctgaattcgaaagccatgtgaatcaggccaatgccgagaaggcgtcgccagacggtgccatgcgaaacgctgtg  
cccggcgcacgtgaacgtgccggcgtacgtgcgcgttgcgggcggggcgattacgccggtgccattggcatgattcgcaaag  
acaacccttccccacggcatgcgcatacgtgtgcgagcaccctgtgagaaccgctgccgccacgctcatcgatgcaccgg  
tgaatattcgtggcattaagaagttcgcggctgatcagcttgcggccgacaaggtcgcaacgcccgccctgctgctgcgacgg  
gtaagaaggtcgtatcgtggggcggcggccgagcggccttacctgcgcgtatttctgcgcgctcatgggtcatgaagtgcacg  
tgttcgagatgcgcaagcagctcggcggcatgatgcgctacggcattcccgcctatcgcttcccgcgtgagcgtcttgatgaaga  
cgtgcgcgccattatggggcgggcaacatttccgtgcattttgagtgcgcgcatcgacgccgagggcatgaagcgccttccgctc  
gaatacgacgcgggtgtacgtggccatcggtgcacagggcggcaaaacgctgaagctcgaaggcggcagctgcagggcgtgat  
gagcgccttgaactgctaccaagatcggcgataacgaatgccccgatttcaggggcaaaaacgctcgtgggtcatcgggcggcgg  
caacgtcgtatggactgcgcgcgacgagcgtgcgtgctggcggcgaagcgtaacggcggcctatcgccggccgctggaaga  
catgacggcacttcgcgctgaaatcgattccgcatgcaggaaggcgtcgagatgatgacgcttcaggcggccgaccatatega  
ggcgaagacgggcatgttacggcactttatacgcagccgagttcatcgccgggtgaagcggcggcgtcctgcgccgcaaac  
cgccgacaagccgcttgcgcgcatcgtggccgacgtgggtgcttattgccgtgggcccaggatattgaaagcggccgcttgaagaa  
gcccggcatggggccgaccgcacatttccaagccgatgacggcttgaagtctatcggtgagctgccaaacgtgttcgtggggc  
gcgattgccagggtggcccaaaaacgggtgataatcgccattggcggcggcaaggttgcgcgcgcaatatcgacgatttctcgg  
cttcgaccacaagcttgattgcggcgtggcggttccgctgctgcggcgaactggcgtacgcctgtggacgcgtgaacatcgctgg  
agcgtcccgcgctgagcgcgaaaggcatttcgatgccgtcgaggtggaaatgaccgccgaagaagcgttcagggaagcagcc  
ggtgcttgcggtgcgaccattacggctgtggagtctcgcgatgaggggaagggccaatatgtgtaaggtaccatcgacggaatcac  
cgtccaggcggccgagggctcactatcctcgatgcagcgaacttgcggcgtggacattcccacgttgcgtttatgaaggaaa  
tcaacgaaatcggtcctatgccgctatgcgtggtggaggtgaaggcgaagacgccctggccggccgctgcaaacacgtgcgtttt  
cgacggcatggcggcgcgcacgagcacgccgcgtaattgcggcgcgtgcgcgcaatgtggaaaccatttggcgaccaccg  
cagcgaatgcaccacgtgcaagcgcagcggcyacctgcgcgttcaggtcgtggcgaacggctgcaacgcgaccgatttggagcg  
cgaccccgactacaagttcgaggcgtgggacgaaacgttcccgtgcagcgcgacgccaccaagtgcattcgctgcatgcgctgc  
ggtgccgaatgcgcgaaaggtacagcaatgcgctgtgtgggaggtatctggtcccgtgcgcgcatcgtggcgtgcgcgctcggcggc  
gcgccgacattgccagcgcgaattgcgcttgcgtggccagtgcttacgcattgccccacgggtgcgcytaccgcacgcgatgac  
acgtccaaggtgcttgcggccttggccgaccctcaagtaataactgtggttcaagttgcgcctgccattcgttcggcatggggcga  
ggcgtggcgtgcctcgagaagaggcaacgcaaggccgcatggttccgcgctgcgcgcgctcggcttcgrccgctatacgac  
accgatttgcgcycaccttaccatcatggaagaggccaacgaattc

# Literaturverzeichnis

- [1] ADLERCREUTZ, H.: *Epidemiology of phytoestrogens*. Baillieres Clin Endocrinol Metab, 12:605–23, 1998.
- [2] ADLERCREUTZ, H., T. FOTSIS, M. S. KURZER, K. WAHALA, T. MAKELA und T. HASE: *Isotope dilution gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of unconjugated lignans and isoflavonoids in human feces, with preliminary results in omnivorous and vegetarian women*. Anal Biochem, 225:101–8, 1995.
- [3] ADLERCREUTZ, H., T. FOTSIS, J. LAMPE, K. WAHALA, T. MAKELA, G. BRUNOW und T. HASE: *Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 215:5–18, 1993.
- [4] AKIYAMA, T., J. ISHIDA, S. NAKAGAWA, H. OGAWARA, S. WATANABE, N. ITOH, M. SHIBUYA und Y. FUKAMI: *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases*. J Biol Chem, 262:5592–5, 1987.
- [5] ANDERSON, J. W. und H. M. BUSH: *Soy protein effects on serum lipoproteins: a quality assessment and meta-analysis of randomized, controlled studies*. J Am Coll Nutr, 30:79–91, 2011.
- [6] ANDERSON, J. W., B. M. JOHNSTONE und M. E. COOK-NEWELL: *Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids*. N Engl J Med, 333:276–82, 1995.
- [7] ARAI, Y., M. UEHARA, Y. SATO, M. KIMIRA, A. EBOSHIDA, H. ADLERCREUTZ und S. WATANABE: *Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake*. J Epidemiol, 10:127–35, 2000.
- [8] ASO, T., S. UCHIYAMA, Y. MATSUMURA, M. TAGUCHI, M. NOZAKI, K. TAKAMATSU, B. ISHIZUKA, T. KUBOTA, H. MIZUNUMA und H. OHTA: *A natural S-equol*

- supplement alleviates hot flushes and other menopausal symptoms in equol non-producing postmenopausal Japanese women.* J Womens Health (Larchmt), 21:92–100, 2012.
- [9] ATKINSON, C., S. BERMAN, O. HUMBERT und J. W. LAMPE: *In vitro incubation of human feces with daidzein and antibiotics suggests interindividual differences in the bacteria responsible for equol production.* J Nutr, 134:596–9, 2004.
- [10] ATKINSON, C., C. L. FRANKENFELD und J. W. LAMPE: *Gut bacterial metabolism of the soy isoflavone daidzein: exploring the relevance to human health.* Exp Biol Med (Maywood), 230:155–70, 2005.
- [11] AXELSON, M., D. N. KIRK, R. D. FARRANT, G. COOLEY, A. M. LAWSON und K. D. SETCHELL: *The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine.* Biochem J, 201:353–7, 1982.
- [12] AXELSON, M. und K. D. SETCHELL: *The excretion of lignans in rats – evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds.* FEBS Lett, 123:337–42, 1981.
- [13] BARNES, S.: *The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products.* Lymphat Res Biol, 8:89–98, 2010.
- [14] BARNES, S., M. KIRK und L. COWARDT: *Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry.* J Agric Food Chem, 42:2466–74, 1994.
- [15] BARON, S. F. und P. B. HYLEMON: *Expression of the bile acid-inducible NADH:flavin oxidoreductase gene of Eubacterium sp. VPI 12708 in Escherichia coli.* Biochim Biophys Acta, 1249:145–54, 1995.
- [16] BEAGLEHOLE, R.: *International trends in coronary heart disease mortality, morbidity, and risk factors.* Epidemiol Rev, 12:1–15, 1990.
- [17] BEAVERS, D. P., K. M. BEAVERS, M. MILLER, J. STAMEY und M. J. MESSINA: *Exposure to isoflavone-containing soy products and endothelial function: a Bayesian meta-analysis of randomized controlled trials.* Nutr Metab Cardiovasc Dis, 22:182–91, 2012.
- [18] BEDZYK, L. A., K. W. ESCUDERO, R. E. GILL, K. J. GRIFFIN und F. E. FRERMAN: *Cloning, sequencing, and expression of the genes encoding subunits of Paracoccus denitrificans electron transfer flavoprotein.* J Biol Chem, 268:20211–7, 1993.



- [19] BERTSCH, J., A. PARTHASARATHY, W. BUCKEL und V. MULLER: *An Electron-bifurcating Caffeyl-CoA Reductase*. J Biol Chem, 288:11304–11, 2013.
- [20] BFR: *Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko*. Aktualisierte Stellungnahme Nr. 039/2007 des Bundesinstituts für Risikobewertung vom 3. April 2007.
- [21] BIEGEL, E., S. SCHMIDT, J. M. GONZALEZ und V. MULLER: *Biochemistry, evolution and physiological function of the Rnf complex, a novel ion-motive electron transport complex in prokaryotes*. Cell Mol Life Sci, 68:613–34, 2010.
- [22] BIEGEL, E., S. SCHMIDT und V. MULLER: *Genetic, immunological and biochemical evidence for a Rnf complex in the acetogen Acetobacterium woodii*. Environ Microbiol, 11:1438–43, 2009.
- [23] BLAIR, R. M., S. E. APPT, A. A. FRANKE und T. B. CLARKSON: *Treatment with antibiotics reduces plasma equol concentration in cynomolgus monkeys (Macaca fascicularis)*. J Nutr, 133:2262–7, 2003.
- [24] BOLANOS, R., A. DEL CASTILLO und J. FRANCA: *Soy isoflavones versus placebo in the treatment of climacteric vasomotor symptoms: systematic review and meta-analysis*. Menopause, 17:660–6, 2010.
- [25] BOWEY, E., H. ADLERCREUTZ und I. ROWLAND: *Metabolism of isoflavones and lignans by the gut microflora: a study in germ-free and human flora associated rats*. Food Chem Toxicol, 41:631–6, 2003.
- [26] BRAUNE, A. und M. BLAUT: *Deglycosylation of puerarin and other aromatic C-glucosides by a newly isolated human intestinal bacterium*. Environ Microbiol, 13:482–94, 2011.
- [27] BRIGE, A., D. VAN DEN HEMEL, W. CARPENTIER, L. DE SMET und J. J. VAN BEEUMEN: *Comparative characterization and expression analysis of the four Old Yellow Enzyme homologues from Shewanella oneidensis indicate differences in physiological function*. Biochem J, 394:335–44, 2006.
- [28] BROWN, N. M. und K. D. SETCHELL: *Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones*. Lab Invest, 81:735–47, 2001.
- [29] BROWN, N. M. und K. D. SETCHELL: *Animal models impacted by phytoestrogens in commercial chow: implications for pathways influenced by hormones*. Lab Invest, 81:735–47, 2001.

- [30] BUCKEL, W. und B. T. GOLDING: *Radical enzymes in anaerobes*. Annu Rev Microbiol, 60:27–49, 2006.
- [31] BUCKEL, W. und R. K. THAUER: *Energy conservation via electron bifurcating ferredoxin reduction and proton/Na(+) translocating ferredoxin oxidation*. Biochim Biophys Acta, 1827:94–113, 2013.
- [32] CARMONA, M., M. T. ZAMARRO, B. BLAZQUEZ, G. DURANTE-RODRIGUEZ, J. F. JUAREZ, J. A. VALDERRAMA, M. J. BARRAGAN, J. L. GARCIA und E. DIAZ: *Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view*. Microbiol Mol Biol Rev, 73:71–133, 2009.
- [33] CASE, C. L., J. R. RODRIGUEZ und B. MUKHOPADHYAY: *Characterization of an NADH oxidase of the flavin-dependent disulfide reductase family from Methanocaldococcus jannaschii*. Microbiology, 155:69–79, 2009.
- [34] CASSIDY, A., B. HANLEY und R. LAMUELA-RAVENTOS: *Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health*. J Sci Food Agric, 80:1044–62, 2000.
- [35] CHANG, H. C. und D. R. DOERGE: *Dietary genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect*. Toxicol Appl Pharmacol, 168:244–52, 2000.
- [36] CHANG, Y. C. und M. G. NAIR: *Metabolism of daidzein and genistein by intestinal bacteria*. J Nat Prod, 58:1892–6, 1995.
- [37] CHEN, D. und R. P. SWENSON: *Cloning, sequence analysis, and expression of the genes encoding the two subunits of the methylotrophic bacterium W3A1 electron transfer flavoprotein*. J Biol Chem, 269:32120–30, 1994.
- [38] CHEN, J. und J. XIE: *Role and regulation of bacterial LuxR-like regulators*. J Cell Biochem, 112:2694–702, 2011.
- [39] CHOWDHURY, N. P., A. M. MOWAFY, J. K. DEMMER, V. UPADHYAY, S. KOELZER, E. JAYAMANI, J. KAHNT, M. HORNING, U. DEMMER, U. ERMILER und W. BUCKEL: *Studies on the mechanism of electron bifurcation catalyzed by electron transferring flavoprotein (Etf) and butyryl-CoA dehydrogenase (Bcd) of Acidaminococcus fermentans*. J Biol Chem, 289:5145–57, 2014.
- [40] CLAVEL, T., C. CHARRIER, A. BRAUNE, M. WENNING, M. BLAUT und D. HALLER: *Isolation of bacteria from the ileal mucosa of TNFdeltaARE mice and descrip-*

- tion of Enterorhabdus mucosicola gen. nov., sp. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, 59:1805–12, 2009.
- [41] CLERICI, C., K. D. SETCHELL, P. M. BATTEZZATI, M. PIRRO, V. GIULIANO, S. ASCIUTTI, D. CASTELLANI, E. NARDI, G. SABATINO, S. ORLANDI, M. BALDONI, O. MORELLI, E. MANNARINO und A. MORELLI: *Pasta naturally enriched with isoflavone aglycons from soy germ reduces serum lipids and improves markers of cardiovascular risk.* J Nutr, 137:2270–8, 2007.
- [42] CLINE, J. D.: *Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters.* Limnol Oceanogr, 14:454–458, 1969.
- [43] COLDHAM, N. G., C. DARBY, M. HOWS, L. J. KING, A. Q. ZHANG und M. J. SAUER: *Comparative metabolism of genistin by human and rat gut microflora: detection and identification of the end-products of metabolism.* Xenobiotica, 32:45–62, 2002.
- [44] COLDHAM, N. G., L. C. HOWELLS, A. SANTI, C. MONTESISSA, C. LANGLAIS, L. J. KING, D. D. MACPHERSON und M. J. SAUER: *Biotransformation of genistein in the rat: elucidation of metabolite structure by product ion mass fragmentation.* J Steroid Biochem Mol Biol, 70:169–84, 1999.
- [45] DAKORA, F. D. und D. A. PHILLIPS: *Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins.* Physiol Mol Plant Path, 49:1–20, 1996.
- [46] DAY, A. J., F. J. CANADA, J. C. DIAZ, P. A. KROON, R. McLAUCHLAN, C. B. FAULDS, G. W. PLUMB, M. R. MORGAN und G. WILLIAMSON: *Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase.* FEBS Lett, 468:166–70, 2000.
- [47] DAY, A. J., M. S. DUPONT, S. RIDLEY, M. RHODES, M. J. RHODES, M. R. MORGAN und G. WILLIAMSON: *Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity.* FEBS Lett, 436:71–5, 1998.
- [48] DECROOS, K., S. VANHEMME, S. CATTOIR, N. BOON und W. VERSTRAETE: *Isolation and characterisation of an equol-producing mixed microbial culture from a human faecal sample and its activity under gastrointestinal conditions.* Arch Microbiol, 183:45–55, 2005.

- [49] DIVI, R. L., H. C. CHANG und D. R. DOERGE: *Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action*. *Biochem Pharmacol*, 54:1087–96, 1997.
- [50] DIXON, R. A.: *Phytoestrogens*. *Annu Rev Plant Biol*, 55:225–61, 2004.
- [51] DOBRINDT, U., B. HOCHHUT, U. HENTSCHEL und J. HACKER: *Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms*. *Nat Rev Microbiol*, 2:414–24, 2004.
- [52] DONG, J. Y. und L. Q. QIN: *Soy isoflavones consumption and risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies*. *Breast Cancer Res Treat*, 125:315–23, 2011.
- [53] EDEN, J. A.: *Phytoestrogens for menopausal symptoms: a review*. *Maturitas*, 72:157–9, 2012.
- [54] EISENBRAND, G.: *Isoflavone als Phytoestrogene in Nahrungsergänzungsmitteln und diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke*. DFG-Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln, Kaiserslautern, 2006.
- [55] EKLUND, H. und M. FONTECAVE: *Glycyl radical enzymes: a conservative structural basis for radicals*. *Structure*, 7:R257–62, 1999.
- [56] EYRE-WALKER, A.: *The distance between Escherichia coli genes is related to gene expression levels*. *J Bacteriol*, 177:5368–9, 1995.
- [57] FISH, W. W.: *Rapid colorimetric micromethod for the quantitation of complexed iron in biological samples*. *Methods in Enzymology*, 158:357–64, 1988.
- [58] FRANKE, A. A., J. F. LAI, B. M. HALM, I. PAGANO, N. KONO, W. J. MACK und H. N. HODIS: *Equol production changes over time in postmenopausal women*. *J Nutr Biochem*, 2011.
- [59] FRANKE, A. A., J. F. LAI, I. PAGANO, Y. MORIMOTO und G. MASKARINEC: *Equol production changes over time in pre-menopausal women*. *Br J Nutr*, Seiten 1–6, 2011.
- [60] FRANKENFELD, C. L.: *O-desmethylangolensin: the importance of equol's lesser known cousin to human health*. *Adv Nutr*, 2:317–24, 2011.

- [61] FRANKENFELD, C. L., C. ATKINSON, W. K. THOMAS, A. GONZALEZ, T. JOKE-  
LA, K. WAHALA, S. M. SCHWARTZ, S. S. LI und J. W. LAMPE: *High concordance  
of daidzein-metabolizing phenotypes in individuals measured 1 to 3 years apart*. Br  
J Nutr, 94:873–6, 2005.
- [62] FRANKENFELD, C. L., C. ATKINSON, W. K. THOMAS, E. L. GOODE, A. GONZA-  
LEZ, T. JOKELA, K. WAHALA, S. M. SCHWARTZ, S. S. LI und J. W. LAMPE: *Fa-  
miliar correlations, segregation analysis, and nongenetic correlates of soy isoflavone-  
metabolizing phenotypes*. Exp Biol Med (Maywood), 229:902–13, 2004.
- [63] FRANKENFELD, C. L., A. MCTIERNAN, S. S. TWOROGER, C. ATKINSON, W. K.  
THOMAS, F. Z. STANCZYK, S. M. MARCOVINA, D. S. WEIGLE, N. S. WEISS,  
V. L. HOLT, S. M. SCHWARTZ und J. W. LAMPE: *Serum steroid hormones, sex  
hormone-binding globulin concentrations, and urinary hydroxylated estrogen meta-  
bolites in post-menopausal women in relation to daidzein-metabolizing phenotypes*.  
J Steroid Biochem Mol Biol, 88:399–408, 2004.
- [64] FRENCH, C. E. und N. C. BRUCE: *Purification and characterization of morphinone  
reductase from Pseudomonas putida M10*. Biochem J, 301 ( Pt 1):97–103, 1994.
- [65] FRENCH, C. E. und N. C. BRUCE: *Bacterial morphinone reductase is related to  
Old Yellow Enzyme*. Biochem J, 312 ( Pt 3):671–8, 1995.
- [66] FRENCH, C. E., S. NICKLIN und N. C. BRUCE: *Sequence and properties of  
pentaerythritol tetranitrate reductase from Enterobacter cloacae PB2*. J Bacteriol,  
178:6623–7, 1996.
- [67] FREY, P. A., A. D. HEGEMAN und F. J. RUZICKA: *The Radical SAM Superfamily*.  
Crit Rev Biochem Mol Biol, 43:63–88, 2008.
- [68] FRYSZKOWSKA, A., H. TOOGOOD, M. SAKUMA, J. M. GARDINER, G. M. STE-  
PHENS und N. S. SCRUTTON: *Asymmetric Reduction of Activated Alkenes by Pen-  
taerythritol Tetranitrate Reductase: Specificity and Control of Stereochemical Out-  
come by Reaction Optimisation*. Adv Synth Catal, 351:2976–2990, 2009.
- [69] FUJIMOTO, K., M. TANAKA, Y. HIRAO, Y. NAGATA, M. MORI, N. MIYANAGA,  
H. AKAZA und W. J. KIM: *Age-stratified serum levels of isoflavones and proportion  
of equol producers in Japanese and Korean healthy men*. Prostate Cancer Prostatic  
Dis, 11:252–7, 2008.
- [70] FUQUA, C., M. R. PARSEK und E. P. GREENBERG: *Regulation of gene expression  
by cell-to-cell communication: acyl-homoserine lactone quorum sensing*. Annu Rev  
Genet, 35:439–68, 2001.

- [71] FUQUA, W. C., S. C. WINANS und E. P. GREENBERG: *Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators*. J Bacteriol, 176:269–75, 1994.
- [72] GHISLA, S. und C. THORPE: *Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview*. Eur J Biochem, 271:494–508, 2004.
- [73] GOTTFERT, M., P. GROB und H. HENNECKE: *Proposed regulatory pathway encoded by the nodV and nodW genes, determinants of host specificity in Bradyrhizobium japonicum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 87:2680–4, 1990.
- [74] GU, L., S. E. HOUSE, R. L. PRIOR, N. FANG, M. J. RONIS, T. B. CLARKSON, M. E. WILSON und T. M. BADGER: *Metabolic phenotype of isoflavones differ among female rats, pigs, monkeys, and women*. J Nutr, 136:1215–21, 2006.
- [75] HALL, W. L., K. VAFEIADOU, J. HALLUND, S. BUGEL, C. KOEBNICK, M. REIMANN, M. FERRARI, F. BRANCA, D. TALBOT, T. DADD, M. NILSSON, K. DAHLMAN-WRIGHT, J. A. GUSTAFSSON, A. M. MINIHANE und C. M. WILLIAMS: *Soy-isoflavone-enriched foods and inflammatory biomarkers of cardiovascular disease risk in postmenopausal women: interactions with genotype and equol production*. Am J Clin Nutr, 82:1260–8; quiz 1365–6, 2005.
- [76] HEINONEN, S. M., K. WAHALA und H. ADLERCREUTZ: *Identification of urinary metabolites of the red clover isoflavones formononetin and biochanin A in human subjects*. J Agric Food Chem, 52:6802–9, 2004.
- [77] HENKIN, T. M.: *Riboswitch RNAs: using RNA to sense cellular metabolism*. Genes Dev, 22:3383–90, 2008.
- [78] HERRMANN, G., E. JAYAMANI, G. MAI und W. BUCKEL: *Energy conservation via electron-transferring flavoprotein in anaerobic bacteria*. J Bacteriol, 190:784–91, 2008.
- [79] HETZEL, M.: *Zum Mechanismus der 2-Hydroxyglutaryl-CoA-Dehydratase aus Clostridium symbiosum*. Doktorarbeit, 2004.
- [80] HU, M., K. KRAUSZ, J. CHEN, X. GE, J. LI, H. L. GELBOIN und F. J. GONZALEZ: *Identification of CYP1A2 as the main isoform for the phase I hydroxylated metabolism of genistein and a prodrug converting enzyme of methylated isoflavones*. Drug Metab Dispos, 31:924–31, 2003.
- [81] HUANG, Y., S. CAO, M. NAGAMANI, K. E. ANDERSON, J. J. GRADY und L. J. LU: *Decreased circulating levels of tumor necrosis factor-alpha in postmenopausal*

- women during consumption of soy-containing isoflavones. *J Clin Endocrinol Metab*, 90:3956–62, 2005.
- [82] HUBBARD, P. A., X. LIANG, H. SCHULZ und J. J. KIM: *The crystal structure and reaction mechanism of Escherichia coli 2,4-dienoyl-CoA reductase*. *J Biol Chem*, 278:37553–60, 2003.
- [83] HUNTER, T. und J. A. COOPER: *Protein-Thyrosine kinases*. *Ann Rev Biochem*, 54:897–930, 1985.
- [84] HUR, H. G., R. D. BEGER, T. M. HEINZE, JR. LAY, J. O., J. P. FREEMAN, J. DORE und F. RAFII: *Isolation of an anaerobic intestinal bacterium capable of cleaving the C-ring of the isoflavonoid daidzein*. *Arch Microbiol*, 178:8–12, 2002.
- [85] HUTCHINS, A. M., J. L. SLAVIN und J. W. LAMPE: *Urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion after consumption of fermented and unfermented soy products*. *J Am Diet Assoc*, 95:545–51, 1995.
- [86] IMKAMP, F., E. BIEGEL, E. JAYAMANI, W. BUCKEL und V. MULLER: *Dissection of the caffeate respiratory chain in the acetogen Acetobacterium woodii: identification of an Rnf-type NADH dehydrogenase as a potential coupling site*. *J Bacteriol*, 189:8145–53, 2007.
- [87] ISHIWATA, N., M. K. MELBY, S. MIZUNO und S. WATANABE: *New equol supplement for relieving menopausal symptoms: randomized, placebo-controlled trial of Japanese women*. *Menopause*, 16:141–8, 2009.
- [88] IZUMI, T., M. K. PISKULA, S. OSAWA, A. OBATA, K. TOBE, M. SAITO, S. KATAOKA, Y. KUBOTA und M. KIKUCHI: *Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans*. *J Nutr*, 130:1695–9, 2000.
- [89] IZUMI, T., M. K. PISKULA, S. OSAWA, A. OBATA, K. TOBE, M. SAITO, S. KATAOKA, Y. KUBOTA und M. KIKUCHI: *Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans*. *J Nutr*, 130:1695–9, 2000.
- [90] JACKSON, M. D., N. D. MCFARLANE-ANDERSON, G. A. SIMON, F. I. BENNETT und S. P. WALKER: *Urinary phytoestrogens and risk of prostate cancer in Jamaican men*. *Cancer Causes Control*, 21:2249–57, 2010.
- [91] JACKSON, R. L., J. S. GREIWE und R. J. SCHWEN: *Emerging evidence of the health benefits of S-equol, an estrogen receptor beta agonist*. *Nutr Rev*, 69:432–48, 2011.

- [92] JACOBS, A., U. WEGEWITZ, C. SOMMERFELD, R. GROSSKLAUS und A. LAMPEN: *Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms - A systematic review*. Mol Nutr Food Res, 53:1084–97, 2009.
- [93] JIN, J. S., M. KITAHARA, M. SAKAMOTO, M. HATTORI und Y. BENNO: *Slackia equolifaciens sp. nov., a human intestinal bacterium capable of producing equol*. Int J Syst Evol Microbiol, 60:1721–4, 2010.
- [94] JIN, J. S., T. NISHIHATA, N. KAKIUCHI und M. HATTORI: *Biotransformation of C-glucosylisoflavone puerarin to estrogenic (3S)-equol in co-culture of two human intestinal bacteria*. Biol Pharm Bull, 31:1621–5, 2008.
- [95] JOANNOU, G. E., G. E. KELLY, A. Y. REEDER, M. WARING und C. NELSON: *A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids*. J Steroid Biochem Mol Biol, 54:167–84, 1995.
- [96] JORNVALL, H., B. PERSSON, M. KROOK, S. ATRIAN, R. GONZALEZ-DUARTE, J. JEFFERY und D. GHOSH: *Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR)*. Biochemistry, 34:6003–13, 1995.
- [97] JUNIEWICZ, P. E., S. PALLANTE MORELL, A. MOSER und L. L. EWING: *Identification of phytoestrogens in the urine of male dogs*. J Steroid Biochem, 31:987–94, 1988.
- [98] KANG, D. J., J. M. RIDLON, 2ND MOORE, D. R., S. BARNES und P. B. HYLEMON: *Clostridium scindens baiCD and baiH genes encode stereo-specific 7alpha/7beta-hydroxy-3-oxo-delta4-cholenoic acid oxidoreductases*. Biochim Biophys Acta, 1781:16–25, 2008.
- [99] KAVANAGH, K. L., H. JORNVALL, B. PERSSON und U. OPPERMANN: *Medium- and short-chain dehydrogenase/reductase gene and protein families : the SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes*. Cell Mol Life Sci, 65:3895–906, 2008.
- [100] KELLY, G. E., G. E. JOANNOU, A. Y. REEDER, C. NELSON und M. A. WARING: *The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans*. Proc Soc Exp Biol Med, 208:40–3, 1995.
- [101] KENNY, A. M., K. M. MANGANO, R. H. ABOURIZK, R. S. BRUNO, D. E. ANAMANI, A. KLEPPINGER, S. J. WALSH, K. M. PRESTWOOD und J. E. KERS-TETTER: *Soy proteins and isoflavones affect bone mineral density in older women: a randomized controlled trial*. Am J Clin Nutr, 90:234–42, 2009.



- [102] KIM, M. und J. HAN: *Absolute Configuration of (-)-2-(4-Hydroxyphenyl)propionic acid: Stereochemistry of Soy Isoflavone Metabolism*. Bull. Korean Chem. Soc., 35:1883–6, 2014.
- [103] KIM, M., J. HAN und S. U. KIM: *Isoflavone Daidzein: Chemistry and bacterial metabolism*. J Appl Biol Chem, 51:253–61, 2008.
- [104] KIM, M., S. I. KIM, J. HAN, X. L. WANG, D. G. SONG und S. U. KIM: *Stereospecific biotransformation of dihydrodaidzein into (3S)-equol by the human intestinal bacterium Eggerthella strain Julong 732*. Appl Environ Microbiol, 75:3062–8, 2009.
- [105] KIM, M., E. N. MARSH, S. U. KIM und J. HAN: *Conversion of (3S,4R)-tetrahydrodaidzein to (3S)-equol by THD reductase: proposed mechanism involving a radical intermediate*. Biochemistry, 49:5582–7, 2010.
- [106] KLEIN, C. B. und A. A. KING: *Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose*. Toxicol Appl Pharmacol, 224:1–11, 2007.
- [107] KO, T. F., H. S. TSAI, S. M. LIN, C. D. LIU, S. P. LEARN und R. Y. CHIOU: *GC-MS determined distribution of urinary equol producers as affected by age, gender, and repeated ingestions of soymilk*. J Food Sci, 75:H306–10, 2010.
- [108] KORDE, L. A., A. H. WU, T. FEARS, A. M. NOMURA, D. W. WEST, L. N. KOLONEL, M. C. PIKE, R. N. HOOVER und R. G. ZIEGLER: *Childhood soy intake and breast cancer risk in Asian American women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 18:1050–9, 2009.
- [109] KREIJKAMP-KASPERS, S., L. KOK, D. E. GROBBEE, E. H. DE HAAN, A. ALEMAN, J. W. LAMPE und Y. T. VAN DER SCHOUW: *Effect of soy protein containing isoflavones on cognitive function, bone mineral density, and plasma lipids in postmenopausal women: a randomized controlled trial*. JAMA, 292:65–74, 2004.
- [110] KUHN, J., T. BOBIK, J. B. PROCTER, C. BURMEISTER, J. HOPPNER, I. WILDE, K. LUERSEN, A. E. TORDA, R. D. WALTER und E. LIEBAU: *Functional analysis of the methylmalonyl-CoA epimerase from Caenorhabditis elegans*. Febs J, 272:1465–77, 2005.
- [111] KUIPER, G. G., B. CARLSSON, K. GRANDIEN, E. ENMARK, J. HAGGBLAD, S. NILSSON und J. A. GUSTAFSSON: *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. Endocrinology, 138:863–70, 1997.

- [112] KUIPER, G. G. und J. A. GUSTAFSSON: *The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens*. FEBS Lett, 410:87–90, 1997.
- [113] KUIPER, G. G., J. G. LEMMEN, B. CARLSSON, J. C. CORTON, S. H. SAFE, P. T. VAN DER SAAG, B. VAN DER BURG und J. A. GUSTAFSSON: *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 139:4252–63, 1998.
- [114] KULLING, S. E., D. M. HONIG und M. METZLER: *Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans in vitro and in vivo*. J Agric Food Chem, 49:3024–33, 2001.
- [115] KURAHASHI, N., M. IWASAKI, M. INOUE, S. SASAZUKI und S. TSUGANE: *Plasma isoflavones and subsequent risk of prostate cancer in a nested case-control study: the Japan Public Health Center*. J Clin Oncol, 26:5923–9, 2008.
- [116] LAEMMLI, U. K.: *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 227:680–5, 1970.
- [117] LAI, C. Y. und J. E. CRONAN: *Isolation and characterization of beta-ketoacyl-acyl carrier protein reductase (fabG) mutants of Escherichia coli and Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol, 186:1869–78, 2004.
- [118] LAMPE, J. W., S. C. KARR, A. M. HUTCHINS und J. L. SLAVIN: *Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet*. Proc Soc Exp Biol Med, 217:335–9, 1998.
- [119] LAMPE, J. W., H. E. SKOR, S. LI, K. WAHALA, W. N. HOWALD und C. CHEN: *Wheat bran and soy protein feeding do not alter urinary excretion of the isoflavan equol in premenopausal women*. J Nutr, 131:740–4, 2001.
- [120] LARKIN, T., W. E. PRICE und L. ASTHEIMER: *The key importance of soy isoflavone bioavailability to understanding health benefits*. Crit Rev Food Sci Nutr, 48:538–52, 2008.
- [121] LEADLAY, P. F.: *Purification and characterization of methylmalonyl-CoA epimerase from Propionibacterium shermanii*. Biochem J, 197:413–9, 1981.
- [122] LEE, S. A., X. O. SHU, H. LI, G. YANG, H. CAI, W. WEN, B. T. JI, J. GAO, Y. T. GAO und W. ZHENG: *Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study*. Am J Clin Nutr, 89:1920–6, 2009.

- [123] LETHABY, A., J. MARJORIBANKS, F. KRONENBERG, H. ROBERTS, J. EDEN und J. BROWN: *Phytoestrogens for menopausal vasomotor symptoms*. Cochrane Database Syst Rev, 12:CD001395, 2013.
- [124] LI, F., J. HINDERBERGER, H. SEEDORF, J. ZHANG, W. BUCKEL und R. K. THAUER: *Coupled ferredoxin and crotonyl coenzyme A (CoA) reduction with NADH catalyzed by the butyryl-CoA dehydrogenase/Etf complex from Clostridium kluyveri*. J Bacteriol, 190:843–50, 2008.
- [125] LIU, B., L. QIN, A. LIU, S. UCHIYAMA, T. UENO, X. LI und P. WANG: *Prevalence of the equol-producer phenotype and its relationship with dietary isoflavone and serum lipids in healthy Chinese adults*. J Epidemiol, 20:377–84, 2010.
- [126] LIU, X. X., S. H. LI, J. Z. CHEN, K. SUN, X. J. WANG, X. G. WANG und R. T. HUI: *Effect of soy isoflavones on blood pressure: a meta-analysis of randomized controlled trials*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 22:463–70, 2012.
- [127] LOH, J., M. GARCIA und G. STACEY: *NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating nod gene expression in Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol, 179:3013–20, 1997.
- [128] LONG, M. T., A. M. HAILES, G. W. KIRBY und N. C. BRUCE: *Transformations of morphine alkaloids by Pseudomonas putida M10*. Appl Environ Microbiol, 61:3645–9, 1995.
- [129] LU, L. J., S. N. LIN, J. J. GRADY, M. NAGAMANI und K. E. ANDERSON: *Altered kinetics and extent of urinary daidzein and genistein excretion in women during chronic soya exposure*. Nutr Cancer, 26:289–302, 1996.
- [130] LUND, T. D., D. J. MUNSON, M. E. HALDY, K. D. SETCHELL, E. D. LEPHART und R. J. HANDA: *Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback*. Biol Reprod, 70:1188–95, 2004.
- [131] LUNDH, T.: *Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals*. Proc Soc Exp Biol Med, 208:33–9, 1995.
- [132] LYDEKING-OLSEN, E., J. E. BECK-JENSEN, K. D. SETCHELL und T. HOLM-JENSEN: *Soymilk or progesterone for prevention of bone loss—a 2 year randomized, placebo-controlled trial*. Eur J Nutr, 43:246–57, 2004.
- [133] MA, D. F., L. Q. QIN, P. Y. WANG und R. KATOH: *Soy isoflavone intake increases bone mineral density in the spine of menopausal women: meta-analysis of randomized controlled trials*. Clin Nutr, 27:57–64, 2008.

- [134] MACFARLANE, S. und G. T. MACFARLANE: *Regulation of short-chain fatty acid production*. Proc Nutr Soc, 62:67–72, 2003.
- [135] MADANI, N. D., P. J. MALLOY, P. RODRIGUEZ-POMBO, A. V. KRISHNAN und D. FELDMAN: *Candida albicans estrogen-binding protein gene encodes an oxidoreductase that is inhibited by estradiol*. Proc Natl Acad Sci U S A, 91:922–6, 1994.
- [136] MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO und J. PARKER: *Mikrobiologie*. Berlin : Spektrum, Akad. Verl., Seite 238, 2000.
- [137] MARRIAN, G. F. und G. A. HASLEWOOD: *Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine*. Biochem J, 26:1227–32, 1932.
- [138] MARUO, T., M. SAKAMOTO, C. ITO, T. TODA und Y. BENNO: *Adlercreutzia equolifaciens gen. nov., sp. nov., an equol-producing bacterium isolated from human faeces, and emended description of the genus Eggerthella*. Int J Syst Evol Microbiol, 58:1221–7, 2008.
- [139] MATTHIES, A.: *Die Rolle der Darmbakterien bei der Bioaktivierung von Isoflavonoiden*. Doktorarbeit, 2012.
- [140] MATTHIES, A., M. BLAUT und A. BRAUNE: *Isolation of a human intestinal bacterium capable of daidzein and genistein conversion*. Appl Environ Microbiol, 75:1740–4, 2009.
- [141] MATTHIES, A., T. CLAVEL, M. GUTSCHOW, W. ENGST, D. HALLER, M. BLAUT und A. BRAUNE: *Conversion of daidzein and genistein by an anaerobic bacterium newly isolated from the mouse intestine*. Appl Environ Microbiol, 74:4847–52, 2008.
- [142] MATTHIES, A., G. LOH, M. BLAUT und A. BRAUNE: *Daidzein and Genistein Are Converted to Equol and 5-Hydroxy-Equol by Human Intestinal Slackia isoflavoniconvertens in Gnotobiotic Rats*. J Nutr, 2011.
- [143] MAZUR, W., J. DUKE, K. WAHALA, S. RASKU und H. ADLERCREUTZ: *Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans*. J Nutr Biochem, 9:193–200, 1998.
- [144] MCCARTHY, A. A., H. M. BAKER, S. C. SHEWRY, M. L. PATCHETT und E. N. BAKER: *Crystal structure of methylmalonyl-coenzyme A epimerase from P. shermanii: a novel enzymatic function on an ancient metal binding scaffold*. Structure, 9:637–46, 2001.

- [145] MEER, J. R. VAN DER und V. SENTCHILLO: *Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria*. *Curr Opin Biotechnol*, 14:248–54, 2003.
- [146] MESSINA, M. und G. REDMOND: *Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature*. *Thyroid*, 16:249–58, 2006.
- [147] MILLER, M. B. und B. L. BASSLER: *Quorum sensing in bacteria*. *Annu Rev Microbiol*, 55:165–99, 2001.
- [148] MINAMIDA, K., K. OTA, M. NISHIMUKAI, M. TANAKA, A. ABE, T. SONE, F. TOMITA, H. HARA und K. ASANO: *Asaccharobacter celatus gen. nov., sp. nov., isolated from rat caecum*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58:1238–40, 2008.
- [149] MINAMIDA, K., M. TANAKA, A. ABE, T. SONE, F. TOMITA, H. HARA und K. ASANO: *Production of equol from daidzein by gram-positive rod-shaped bacterium isolated from rat intestine*. *J Biosci Bioeng*, 102:247–50, 2006.
- [150] MIYANAGA, N., H. AKAZA, S. HINOTSU, T. FUJIOKA, S. NAITO, M. NAMIKI, S. TAKAHASHI, Y. HIRAO, S. HORIE, T. TSUKAMOTO, M. MORI und H. TSUJI: *Prostate cancer chemoprevention study: an investigative randomized control study using purified isoflavones in men with rising prostate-specific antigen*. *Cancer Sci*, 103:125–30, 2012.
- [151] MOLTENI, A., L. BRIZIO-MOLTENI und V. PERSKY: *In vitro hormonal effects of soybean isoflavones*. *J Nutr*, 125:751S–756S, 1995.
- [152] MORENO-HAGELSIEB, G. und J. COLLADO-VIDES: *A powerful non-homology method for the prediction of operons in prokaryotes*. *Bioinformatics*, 18 Suppl 1:S329–36, 2002.
- [153] MORITA, H., H. TOH, K. OSHIMA, M. YOSHIKAWA, M. KAWANISHI, K. NAKAYA, T. SUZUKI, E. MIYAUCHI, Y. ISHII, S. TANABE, M. MURAKAMI und M. HATTORI: *Complete genome sequence and comparative analysis of the fish pathogen *Lactococcus garvieae**. *PLoS One*, 6:e23184, 2011.
- [154] MORITO, K., T. HIROSE, J. KINJO, T. HIRAKAWA, M. OKAWA, T. NOHARA, S. OGAWA, S. INOUE, M. MURAMATSU und Y. MASAMUNE: *Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta*. *Biol Pharm Bull*, 24:351–6, 2001.
- [155] MORTON, M. S., O. ARISAKA, N. MIYAKE, L. D. MORGAN und B. A. EVANS: *Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age*. *J Nutr*, 132:3168–71, 2002.

- [156] MUELLER, S. O., S. SIMON, K. CHAE, M. METZLER und K. S. KORACH: *Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells*. Toxicol Sci, 80:14–25, 2004.
- [157] MULDER, D. W., E. M. SHEPARD, J. E. MEUSER, N. JOSHI, P. W. KING, M. C. POSEWITZ, J. B. BRODERICK und J. W. PETERS: *Insights into [FeFe]-hydrogenase structure, mechanism, and maturation*. Structure, 19:1038–52, 2011.
- [158] MUTHYALA, R. S., Y. H. JU, S. SHENG, L. D. WILLIAMS, D. R. DOERGE, B. S. KATZENELLENBOGEN, W. G. HELFERICH und J. A. KATZENELLENBOGEN: *Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta*. Bioorg Med Chem, 12:1559–67, 2004.
- [159] NAGATA, C., T. MIZOUE, K. TANAKA, I. TSUJI, A. TAMAKOSHI, K. MATSUO, K. WAKAI, M. INOUE, S. TSUGANE, S. SASAZUKI, D. FOR THE RESEARCH GROUP FOR THE und J. EVALUATION OF CANCER PREVENTION STRATEGIES IN: *Soy Intake and Breast Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence Among the Japanese Population*. Jpn J Clin Oncol, 2014.
- [160] NIELSEN, I. L. und G. WILLIAMSON: *Review of the factors affecting bioavailability of soy isoflavones in humans*. Nutr Cancer, 57:1–10, 2007.
- [161] NOTTLE, M. C.: *Composition of some urinary calculi of ruminants in Western Australia*. Res Vet Sci, 21:309–17, 1976.
- [162] OCHMAN, H., A. S. GERBER und D. L. HARTL: *Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction*. Genetics, 120:621–3, 1988.
- [163] OKUDA, S., S. KAWASHIMA, K. KOBAYASHI, N. OGASAWARA, M. KANEHISA und S. GOTO: *Characterization of relationships between transcriptional units and operon structures in Bacillus subtilis and Escherichia coli*. BMC Genomics, 8:48, 2007.
- [164] OLLAGNIER, S., E. MULLIEZ, P. P. SCHMIDT, R. ELIASSON, J. GAILLARD, C. DERONZIER, T. BERGMAN, A. GRASLUND, P. REICHARD und M. FONTECAVE: *Activation of the anaerobic ribonucleotide reductase from Escherichia coli. The essential role of the iron-sulfur center for S-adenosylmethionine reduction*. J Biol Chem, 272:24216–23, 1997.

- [165] O'NEILL, H., S. G. MAYHEW und G. BUTLER: *Cloning and analysis of the genes for a novel electron-transferring flavoprotein from Megasphaera elsdenii. Expression and characterization of the recombinant protein.* J Biol Chem, 273:21015–24, 1998.
- [166] ORTMANN, O. und C. LATTRICH: *Therapie von Beschwerden in den Wechseljahren.* Dtsch Arztebl, 109:316–24, 2012.
- [167] PANDE, S. G., F. A. PAGLIAI, C. L. GARDNER, A. WRENCH, R. NARVEL, C. F. GONZALEZ und G. L. LORCA: *Lactobacillus brevis responds to flavonoids through KaeR, a LysR-type of transcriptional regulator.* Mol Microbiol, 81:1623–39, 2011.
- [168] PARK, H. Y., M. KIM und J. HAN: *Stereospecific microbial production of isoflavanones from isoflavones and isoflavone glucosides.* Appl Microbiol Biotechnol, 91:1173–81, 2011.
- [169] PARK, S. Y., L. R. WILKENS, A. A. FRANKE, L. LE MARCHAND, K. K. KAKAZU, M. T. GOODMAN, S. P. MURPHY, B. E. HENDERSON und L. N. KOLONEL: *Urinary phytoestrogen excretion and prostate cancer risk: a nested case-control study in the Multiethnic Cohort.* Br J Cancer, 101:185–91, 2009.
- [170] PATISAUL, H. B.: *Phytoestrogen action in the adult and developing brain.* J Neuroendocrinol, 17:57–64, 2005.
- [171] PILSAKOVA, L., I. RIECANSKY und F. JAGLA: *The physiological actions of isoflavone phytoestrogens.* Physiol Res, 59:651–64, 2010.
- [172] POTTER, S. M., J. A. BAUM, H. TENG, R. J. STILLMAN, N. F. SHAY und JR. ERDMAN, J. W.: *Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women.* Am J Clin Nutr, 68:1375S–1379S, 1998.
- [173] POULSEN, R. C. und M. C. KRUGER: *Soy phytoestrogens: impact on postmenopausal bone loss and mechanisms of action.* Nutr Rev, 66:359–74, 2008.
- [174] PRASAIN, J. K., K. JONES, N. BRISSIE, R. MOORE, J. M. WYSS und S. BARNES: *Identification of puerarin and its metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J Agric Food Chem, 52:3708–12, 2004.
- [175] PRICE, M. N., A. P. ARKIN und E. J. ALM: *The life-cycle of operons.* PLoS Genet, 2:e96, 2006.
- [176] PRUNEDA-PAZ, J. L., M. LINARES, J. E. CABRERA und S. GENTI-RAIMONDI: *TeiR, a LuxR-type transcription factor required for testosterone degradation in Comamonas testosteroni.* J Bacteriol, 186:1430–7, 2004.

- [177] RAGSDALE, S. W. und L. G. LJUNGDAHL: *Hydrogenase from Acetobacterium woodii*. Arch Microbiol, 139:361–5, 1984.
- [178] RAINE, A. R., N. S. SCRUTTON und F. S. MATHEWS: *On the evolution of alternate core packing in eightfold beta/alpha-barrels*. Protein Sci, 3:1889–92, 1994.
- [179] REED, M. C., A. LIEB und H. F. NIJHOUT: *The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions*. Bioessays, 32:422–9, 2010.
- [180] REN, D., L. LI, A. W. SCHWABACHER, J. W. YOUNG und D. C. BEITZ: *Mechanism of cholesterol reduction to coprostanol by Eubacterium coprostanoligenes ATCC 51222*. Steroids, 61:33–40, 1996.
- [181] RIDLON, J. M., D. J. KANG und P. B. HYLEMON: *Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria*. J Lipid Res, 47:241–59, 2006.
- [182] ROLFE, B. G.: *Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation*. Biofactors, 1:3–10, 1988.
- [183] ROWLAND, I. R., H. WISEMAN, T. A. SANDERS, H. ADLERCREUTZ und E. A. BOWEY: *Interindividual variation in metabolism of soy isoflavones and lignans: influence of habitual diet on equol production by the gut microflora*. Nutr Cancer, 36:27–32, 2000.
- [184] SANTANGELO, T. J. und I. ARTSIMOVITCH: *Termination and antitermination: RNA polymerase runs a stop sign*. Nat Rev Microbiol, 9:319–29, 2011.
- [185] SAUNDERS, E., R. PUKALL, B. ABT, A. LAPIDUS, T. GLAVINA DEL RIO, A. COPPELAND, H. TICE, J. F. CHENG, S. LUCAS, F. CHEN, M. NOLAN, D. BRUCE, L. GOODWIN, S. PITLUCK, N. IVANOVA, K. MAVROMATIS, G. OVCHINNIKOVA, A. PATI, A. CHEN, K. PALANIAPPAN, M. LAND, L. HAUSER, Y. J. CHANG, C. D. JEFFRIES, P. CHAIN, L. MEINCKE, D. SIMS, T. BRETTIN, J. C. DETTER, M. GOKER, J. BRISTOW, J. A. EISEN, V. MARKOWITZ, P. HUGENHOLTZ, N. C. KYRPIDES, H. P. KLENK und C. HAN: *Complete genome sequence of Eggerthella lenta type strain (IPP VPI 0255)*. Stand Genomic Sci, 1:174–82, 2009.
- [186] SCALBERT, A. und G. WILLIAMSON: *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. J Nutr, 130:2073S–85S, 2000.
- [187] SCHLAMMAN, H. R., R. J. OKKER und B. J. LUGTENBERG: *Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia*. J Bacteriol, 174:5177–82, 1992.



- [188] SCHOEFER, L., R. MOHAN, A. BRAUNE, M. BIRRINGER und M. BLAUT: *Anaerobic C-ring cleavage of genistein and daidzein by Eubacterium ramulus*. FEMS Microbiol Lett, 208:197–202, 2002.
- [189] SCHUCHMANN, K. und V. MULLER: *A bacterial electron-bifurcating hydrogenase*. J Biol Chem, 287:31165–71, 2012.
- [190] SCHUCHMANN, K. und V. MULLER: *Autotrophy at the thermodynamic limit of life: a model for energy conservation in acetogenic bacteria*. Nat Rev Microbiol, 12:809–21, 2014.
- [191] SELMER, T., A. J. PIERIK und J. HEIDER: *New glycol radical enzymes catalysing key metabolic steps in anaerobic bacteria*. Biol Chem, 386:981–8, 2005.
- [192] SETCHELL, K. D.: *Soy isoflavones—benefits and risks from nature’s selective estrogen receptor modulators (SERMs)*. J Am Coll Nutr, 20:354S–362S; discussion 381S–383S, 2001.
- [193] SETCHELL, K. D., N. M. BROWN, P. DESAI, L. ZIMMER-NECHEMIAS, B. E. WOLFE, W. T. BRASHEAR, A. S. KIRSCHNER, A. CASSIDY und J. E. HEUBI: *Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements*. J Nutr, 131:1362S–75S, 2001.
- [194] SETCHELL, K. D., N. M. BROWN und E. LYDEKING-OLSEN: *The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones*. J Nutr, 132:3577–84, 2002.
- [195] SETCHELL, K. D., N. M. BROWN, L. ZIMMER-NECHEMIAS, W. T. BRASHEAR, B. E. WOLFE, A. S. KIRSCHNER und J. E. HEUBI: *Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability*. Am J Clin Nutr, 76:447–53, 2002.
- [196] SETCHELL, K. D. und A. CASSIDY: *Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health*. J Nutr, 129:758S–767S, 1999.
- [197] SETCHELL, K. D. und C. CLERICI: *Equol: history, chemistry, and formation*. J Nutr, 140:1355S–62S, 2010.
- [198] SETCHELL, K. D. und C. CLERICI: *Equol: pharmacokinetics and biological actions*. J Nutr, 140:1363S–8S, 2010.
- [199] SETCHELL, K. D., C. CLERICI, E. D. LEPHART, S. J. COLE, C. HEENAN, D. CASTELLANI, B. E. WOLFE, L. NECHEMIAS-ZIMMER, N. M. BROWN, T. D.

- LUND, R. J. HANDA und J. E. HEUBI: *S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora*. Am J Clin Nutr, 81:1072–9, 2005.
- [200] SETCHELL, K. D. und S. J. COLE: *Method of defining equol-producer status and its frequency among vegetarians*. J Nutr, 136:2188–93, 2006.
- [201] SETCHELL, K. D., M. S. FAUGHNAN, T. AVADES, L. ZIMMER-NECHEMIAS, N. M. BROWN, B. E. WOLFE, W. T. BRASHEAR, P. DESAI, M. F. OLDFIELD, N. P. BOTTING und A. CASSIDY: *Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of  $^{13}C$ -labeled tracers in premenopausal women*. Am J Clin Nutr, 77:411–9, 2003.
- [202] SHELNUTT, S. R., C. O. CIMINO, P. A. WIGGINS, M. J. RONIS und T. M. BADGER: *Pharmacokinetics of the glucuronide and sulfate conjugates of genistein and daidzein in men and women after consumption of a soy beverage*. Am J Clin Nutr, 76:588–94, 2002.
- [203] SHIMADA, Y., M. TAKAHASHI, N. MIYAZAWA, Y. ABIRU, S. UCHIYAMA und H. HISHIGAKI: *Identification of a novel dihydrodaidzein racemase essential for biosynthesis of equol from daidzein in Lactococcus sp. strain 20-92*. Appl Environ Microbiol, 78:4902–7, 2012.
- [204] SHIMADA, Y., M. TAKAHASHI, N. MIYAZAWA, T. OHTANI, Y. ABIRU, S. UCHIYAMA und H. HISHIGAKI: *Identification of two novel reductases involved in equol biosynthesis in lactococcus strain 20-92*. J Mol Microbiol Biotechnol, 21:160–72, 2012.
- [205] SHIMADA, Y., S. YASUDA, M. TAKAHASHI, T. HAYASHI, N. MIYAZAWA, I. SATO, Y. ABIRU, S. UCHIYAMA und H. HISHIGAKI: *Cloning and expression of a novel NADP(H)-dependent daidzein reductase, an enzyme involved in the metabolism of daidzein, from equol-producing Lactococcus strain 20-92*. Appl Environ Microbiol, 76:5892–901, 2010.
- [206] SHU, X. O., F. JIN, Q. DAI, W. WEN, J. D. POTTER, L. H. KUSHI, Z. RUAN, Y. T. GAO und W. ZHENG: *Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 10:483–8, 2001.
- [207] SHUTT, D. A.: *The effects of plant oestrogens on animal reproduction*. Endeavour, 35:110–3, 1976.

- [208] SIMONNE, A. H., M. SMITH, D. B. WEAVER, T. VAIL, S. BARNES und C. I. WEI: *Retention and changes of soy isoflavones and carotenoids in immature soybean seeds (Edamame) during processing*. J Agric Food Chem, 48:6061–9, 2000.
- [209] SOMEKAWA, Y., M. CHIGUCHI, T. ISHIBASHI und T. ASO: *Soy intake related to menopausal symptoms, serum lipids, and bone mineral density in postmenopausal Japanese women*. Obstet Gynecol, 97:109–15, 2001.
- [210] SPAINK, H. P.: *The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the ins and outs of symbiogenesis*. Annu Rev Phytopathol, 33:345–68, 1995.
- [211] STORMSHAK, F. und C. V. BISHOP: *Board-invited review: Estrogen and progesterone signaling: genomic and nongenomic actions in domestic ruminants*. J Anim Sci, 86:299–315, 2008.
- [212] STOUGAARD, J.: *Regulators and regulation of legume root nodule development*. Plant Physiol, 124:531–40, 2000.
- [213] SUBRAMANIAN, S., G. STACEY und O. YU: *Distinct, crucial roles of flavonoids during legume nodulation*. Trends Plant Sci, 12:282–5, 2007.
- [214] TAKU, K., M. K. MELBY, M. S. KURZER, S. MIZUNO, S. WATANABE und Y. ISHIMI: *Effects of soy isoflavone supplements on bone turnover markers in menopausal women: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Bone, 47:413–23, 2010.
- [215] TEMPFER, C. B., E. K. BENTZ, S. LEODOLTER, G. TSCHERNE, F. REUSS, H. S. CROSS und J. C. HUBER: *Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature*. Fertil Steril, 87:1243–9, 2007.
- [216] TEUSCHER, E., M. MELZIG und U. LINDEQUIST: *Biogene Arzneimittel : Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 6., neu bearb. Aufl., 2004.
- [217] THAWORNKUNO, C., M. TANAKA, T. SONE und K. ASANO: *Biotransformation of daidzein to equol by crude enzyme from Asaccharobacter celatus AHU1763 required an anaerobic environment*. Biosci Biotechnol Biochem, 73:1435–1438, 2009.
- [218] THORP, A. A., P. R. HOWE, T. A. MORI, A. M. COATES, J. D. BUCKLEY, J. HODGSON, J. MANSOUR und B. J. MEYER: *Soy food consumption does not lower LDL cholesterol in either equol or nonequol producers*. Am J Clin Nutr, 88:298–304, 2008.

- [219] TOH, H., K. OSHIMA, T. SUZUKI, M. HATTORI und H. MORITA: *Complete Genome Sequence of the Equol-Producing Bacterium Adlercreutzia equolifaciens DSM 19450T*. Genome Announc, 1, 2013.
- [220] TOOGOOD, H. S., D. LEYS und N. S. SCRUTTON: *Dynamics driving function: new insights from electron transferring flavoproteins and partner complexes*. Febs J, 274:5481–504, 2007.
- [221] TRAVIS, R. C., E. A. SPENCER, N. E. ALLEN, P. N. APPLEBY, A. W. RODDAM, K. OVERVAD, N. F. JOHNSEN, A. OLSEN, R. KAAKS, J. LINSEISEN, H. BOEING, U. NOTHLINGS, H. B. BUENO-DE MESQUITA, M. M. ROS, C. SACERDOTE, D. PALLI, R. TUMINO, F. BERRINO, A. TRICHOPOULOU, V. DILIS, D. TRICHOPOULOS, M. D. CHIRLAQUE, E. ARDANAZ, N. LARRANAGA, C. GONZALEZ, L. R. SUAREZ, M. J. SANCHEZ, S. BINGHAM, K. T. KHAW, G. HALLMANS, P. STATIN, S. RINALDI, N. SLIMANI, M. JENAB, E. RIBOLI und T. J. KEY: *Plasma phyto-oestrogens and prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Br J Cancer, 100:1817–23, 2009.
- [222] TSAI, M. H. und JR. SAIER, M. H.: *Phylogenetic characterization of the ubiquitous electron transfer flavoprotein families ETF-alpha and ETF-beta*. Res Microbiol, 146:397–404, 1995.
- [223] TSUJI, H., K. MORIYAMA, K. NOMOTO und H. AKAZA: *Identification of an enzyme system for daidzein-to-equol conversion in Slackia sp. strain NATTS*. Appl Environ Microbiol, 2012.
- [224] TSUJI, H., K. MORIYAMA, K. NOMOTO, N. MIYANAGA und H. AKAZA: *Isolation and characterization of the equol-producing bacterium Slackia sp. strain NATTS*. Arch Microbiol, 192:279–87, 2010.
- [225] UESUGI, S., S. WATANABE, N. ISHIWATA, M. UEHARA und K. OUCHI: *Effects of isoflavone supplements on bone metabolic markers and climacteric symptoms in Japanese women*. Biofactors, 22:221–8, 2004.
- [226] UNTERGASSER, A., I. CUTCUTACHE, T. KORESSAAR, J. YE, B. C. FAIRCLOTH, M. REMM und S. G. ROZEN: *Primer3-new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 40:e115, 2012.
- [227] URBANCZYK, H., J. C. AST, M. J. HIGGINS, J. CARSON und P. V. DUNLAP: *Reclassification of Vibrio fischeri, Vibrio logei, Vibrio salmonicida and Vibrio wodanis as Aliivibrio fischeri gen. nov., comb. nov., Aliivibrio logei comb. nov., Aliivibrio*

- salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 57:2823–9, 2007.
- [228] VARGAS, P., A. FELIPE, C. MICHAN und M. T. GALLEGOS: *Induction of Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *MexAB-OprM* multidrug efflux pump by flavonoids is mediated by the repressor *PmeR*. Mol Plant Microbe Interact, 24:1207–19, 2011.
- [229] VATANPARAST, H. und P. D. CHILIBECK: *Does the effect of soy phytoestrogens on bone in postmenopausal women depend on the equol-producing phenotype?* Nutr Rev, 65:294–9, 2007.
- [230] VEITCH, N. C.: *Isoflavonoids of the leguminosae*. Nat Prod Rep, 26:776–802, 2009.
- [231] VOGEL-SCHEEL, J., C. ALPERT, W. ENGST, G. LOH und M. BLAUT: *Requirement of purine and pyrimidine synthesis for colonization of the mouse intestine by Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol, 76:5181–7, 2010.
- [232] VOSKUIL, M. I. und G. H. CHAMBLISS: *The -16 region of Bacillus subtilis and other gram-positive bacterial promoters*. Nucleic Acids Res, 26:3584–90, 1998.
- [233] WADA, K., K. NAKAMURA, Y. TAMAI, M. TSUJI, T. KAWACHI, A. HORI, N. TAKEYAMA, S. TANABASHI, S. MATSUSHITA, N. TOKIMITSU und C. NAGATA: *Soy isoflavone intake and breast cancer risk in Japan: from the Takayama study*. Int J Cancer, 133:952–60, 2013.
- [234] WAKAI, K., I. EGAMI, K. KATO, T. KAWAMURA, A. TAMAKOSHI, Y. LIN, T. NAKAYAMA, M. WADA und Y. OHNO: *Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese*. Nutr Cancer, 33:139–45, 1999.
- [235] WALGREN, R. A., J. T. LIN, R. K. KINNE und T. WALLE: *Cellular uptake of dietary flavonoid quercetin 4'-beta-glucoside by sodium-dependent glucose transporter SGLT1*. J Pharmacol Exp Ther, 294:837–43, 2000.
- [236] WANG, C. und M. S. KURZER: *Effects of phytoestrogens on DNA synthesis in MCF-7 cells in the presence of estradiol or growth factors*. Nutr Cancer, 31:90–100, 1998.
- [237] WANG, C., J. LEE, Y. DENG, F. TAO und L. H. ZHANG: *ARF-TSS: an alternative method for identification of transcription start site in bacteria*. Biotechniques, 0:1–3, 2012.

- [238] WANG, H. und P. MURPHY: *Isoflavone composition of american and japanese soybeans in Iowa: Effects of variety, crop year, and location*. J Agric Food Chem, 42:1674–77, 1994.
- [239] WANG, X. L., H. G. HUR, J. H. LEE, K. T. KIM und S. I. KIM: *Enantioselective synthesis of S-equol from dihydrodaidzein by a newly isolated anaerobic human intestinal bacterium*. Appl Environ Microbiol, 71:214–9, 2005.
- [240] WANG, X. L., H. J. KIM, S. I. KANG, S. I. KIM und H. G. HUR: *Production of phytoestrogen S-equol from daidzein in mixed culture of two anaerobic bacteria*. Arch Microbiol, 187:155–60, 2007.
- [241] WANG, X. L., K. H. SHIN, H. G. HUR und S. I. KIM: *Enhanced biosynthesis of dihydrodaidzein and dihydrogenistein by a newly isolated bovine rumen anaerobic bacterium*. J Biotechnol, 115:261–9, 2005.
- [242] WATANABE, S., M. YAMAGUCHI, T. SOBUE, T. TAKAHASHI, T. MIURA, Y. ARAI, W. MAZUR, K. WAHALA und H. ADLERCREUTZ: *Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybean powder (kinako)*. J Nutr, 128:1710–5, 1998.
- [243] WATSON, C. S., R. A. ALYEA, Y. J. JENG und M. Y. KOCHUKOV: *Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues*. Mol Cell Endocrinol, 274:1–7, 2007.
- [244] WEIDENHAUPT, M., P. ROSSI, C. BECK, H. M. FISCHER und H. HENNECKE: *Bradyrhizobium japonicum possesses two discrete sets of electron transfer flavoprotein genes: fixA, fixB and etfS, etfL*. Arch Microbiol, 165:169–78, 1996.
- [245] WHITFIELD, C. D. und S. G. MAYHEW: *Purification and properties of electron-transferring flavoprotein from Peptostreptococcus elsdenii*. J Biol Chem, 249:2801–10, 1974.
- [246] WILLIAMS, R. E. und N. C. BRUCE: *'New uses for an Old Enzyme'—the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes*. Microbiology, 148:1607–14, 2002.
- [247] WOHLFARTH, G. und W. BUCKEL: *A sodium ion gradient as energy source for Peptostreptococcus asaccharolyticus*. Arch Microbiol, 142:128–35, 1985.
- [248] WU, A. H., M. C. YU, C. C. TSENG und M. C. PIKE: *Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk*. Br J Cancer, 98:9–14, 2008.

- [249] WU, J., J. OKA, M. HIGUCHI, I. TABATA, T. TODA, M. FUJIOKA, N. FUKU, T. TERAMOTO, T. OKUHIRA, T. UENO, S. UCHIYAMA, K. URATA, K. YAMADA und Y. ISHIMI: *Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial*. *Metabolism*, 55:423–33, 2006.
- [250] XIE, Q., M. L. CHEN, Y. QIN, Q. Y. ZHANG, H. X. XU, Y. ZHOU, M. T. MI und J. D. ZHU: *Isoflavone consumption and risk of breast cancer: a dose-response meta-analysis of observational studies*. *Asia Pac J Clin Nutr*, 22:118–27, 2013.
- [251] XU, X., K. S. HARRIS, H. J. WANG, P. A. MURPHY und S. HENDRICH: *Bio-availability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women*. *J Nutr*, 125:2307–15, 1995.
- [252] XU, X., H. J. WANG, P. A. MURPHY, L. COOK und S. HENDRICH: *Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women*. *J Nutr*, 124:825–32, 1994.
- [253] YAN, L. und E. L. SPITZNAGEL: *Soy consumption and prostate cancer risk in men: a revisit of a meta-analysis*. *Am J Clin Nutr*, 89:1155–63, 2009.
- [254] YOKOYAMA, S., K. OSHIMA, I. NOMURA, M. HATTORI und T. SUZUKI: *Complete genomic sequence of the equol-producing bacterium Eggerthella sp. strain YY7918, isolated from adult human intestine*. *J Bacteriol*, 193:5570–1, 2011.
- [255] YOKOYAMA, S. und T. SUZUKI: *Isolation and characterization of a novel equol-producing bacterium from human feces*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 72:2660–6, 2008.
- [256] YU, O., W. JUNG, J. SHI, R. A. CROES, G. M. FADER, B. MCGONIGLE und J. T. ODELL: *Production of the isoflavones genistein and daidzein in non-legume dicot and monocot tissues*. *Plant Physiol*, 124:781–94, 2000.
- [257] ZHAN, S. und S. C. HO: *Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile*. *Am J Clin Nutr*, 81:397–408, 2005.
- [258] ZHANG, X., X. O. SHU, H. LI, G. YANG, Q. LI, Y. T. GAO und W. ZHENG: *Prospective cohort study of soy food consumption and risk of bone fracture among postmenopausal women*. *Arch Intern Med*, 165:1890–5, 2005.

# Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen Betreuern Herrn Prof. Dr. Michael Blaut und Frau Dr. Annett Braune für die Bereitstellung des sehr interessanten Themas und die Ermöglichung eines eigenverantwortlichen und selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens. Ich bedanke mich für das stetige Interesse am Fortgang dieser Arbeit sowie für die aufgebraachte Geduld und die Vermittlung der Freude am wissenschaftlichen Arbeiten. Dies alles hat maßgeblich zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Wolfram Engst für die Bereitstellung der massenspektrometrischen Daten danken. Anke Gühler, Diana Schulz und Sabine Schmidt danke ich für die unersetzliche Hilfe im Labor und der lieben Unterstützung vor allem zu den Anfangszeiten im Labor.

Einen ganz besonderer Dank für ihre Freundschaft und Motivation gilt meinen GAMIMädels Julia Budnowski, Fanny Kamprad, Anni Woting und Kathleen Slezak. Mit euch habe ich die schönsten Momente im Labor und in meiner Zeit in Potsdam geteilt. Neben unseren vielen fachlichen Diskussionen bleiben vor allem die gemeinsamen Aktivitäten in Erinnerung. Ihr wart Radfahrbegleitung, Joggingkumpanen, Pausenbezwinger, Kantinegefährten, Unisportkameraden, Laborschwatzunterhalter und Kummerkasten. Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den herzlichen Umgang danke ich allen GAMISTen, die mich während der Doktorandenzeit begleitet haben. Weiter danke ich den Bachelorstudentinnen Nikoletta Kaiser, Tina Müller und Beke Küsener für ihre Mitarbeit am Forschungsprojekt sowie den Praktikanten Heiko Benzin, Franziska Jannasch, Annika Zucker, Susan Bigesse und Florence Fischer.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Für ihre vielen aufmunterten Worte, Motivation und die Unterstützung danke ich Sven Merten, Uwe Schröder, Irene Schröder, Birgit Merten und Klaus Merten.



# Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass diese Arbeit bisher von mir weder an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel und Hilfen benutzt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen habe.