

INHALTSVERZEICHNIS

Abbildungsverzeichnis

Tabellenverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. EINLEITUNG ..... 1

1.1 Isoflavone: Vorkommen, Biosynthese und Gehalte..... 1

1.2 Metabolismus und Bioverfügbarkeit der Isoflavone im menschlichen Körper..... 4

1.3 Biologische Aktivität der Isoflavone ..... 5

1.4 Bakterieller Metabolismus von Daidzein und Genistein im Darm ..... 9

1.5 Equol – ein bedeutender Isoflavonmetabolit..... 12

1.6 Zielstellung ..... 15

2. MATERIAL UND METHODEN ..... 16

2.1 Verwendete Bakterienstämme ..... 16

2.2 Allgemeine Fermentationsmethode ..... 16

2.3 Fermentation von Daidzein mit humanen Fäzessuspensionen..... 16

2.4 Bestimmung der Anzahl der Equol-bildenden Bakterien in den humanen Fäzes ..... 17

2.5 Fermentationen mit der Equol-bildenden Anreicherungskultur..... 17

2.5.1 Fermentation von Daidzein bei unterschiedlichen Konzentrationen von Wasserstoff in der Gasphase .....17

2.5.2 Fermentation von Daidzein in Anwesenheit von Arginin ..... 18

2.5.3 Fermentation von Daidzein und DHD in Anwesenheit von Antibiotika ..... 18

2.5.4 Verdünnung und Vereinzelungsausstriche der Equol-bildenden Anreicherungskultur ..... 19

2.5.5 Isolierung eines Equol-bildenden Bakteriums aus der Equol-bildenden Anreicherungskultur ..... 20

2.6 Phenotypische Charakterisierung des isolierten Equol-bildenden Darmbakteriums..... 20

2.6.1 Gram-Färbung ..... 20

2.6.2 Sporenfärbung ..... 20

2.6.3 KOH-Test ..... 21

2.6.4 Elektronenmikroskopie..... 21

2.6.5 Biochemische Tests ..... 21

2.7 Umsetzung von Isoflavonoiden durch bakterielle Reinkulturen..... 22

2.7.1 Fermentation von Isoflavonen während der Wachstumsphase..... 22

2.7.2 Isoflavonoidfermentation in der stationären Phase..... 22

2.7.3 Fermentation von Equol in Gegenwart von Sauerstoff..... 22

2.8 Molekularbiologische Methoden ..... 23

2.8.1 DNA-Isolierung ..... 23

2.8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ..... 23

2.8.3 Sequenzierung und Analyse der bakteriellen 16S rRNA-Gene ..... 23

2.8.4 DNA-DNA-Hybridisierung und Bestimmung des GC-Gehaltes ..... 24

2.8.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ..... 24

2.9 Proteinbiochemische Methoden ..... 25

2.9.1 Herstellung von bakteriellen Rohextrakten ..... 25

2.9.2 Die Umsetzung von Isoflavonen durch bakterielle Rohextrakte ..... 26

2.9.3 Herstellung der Proteinextrakte für 2D-DIGE-Analyse ..... 26

2.9.4 Proteinbestimmung nach Lowry mit ganzen Zellen ..... 27

2.9.5 Proteinbestimmung nach Bradford ..... 27

2.9.6 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ..... 27

2.9.7 Zweidimensionale differentielle Gelelektrophorese (2D-DIGE) ..... 28

2.10 Chemisch-analytische Methoden ..... 29

2.10.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) ..... 29

2.10.2 Festphasenextraktion ..... 30

2.10.3 Ultraleistungsflüssigkeitschromatographie/Tandem-Massenspektrometrie (UPLC/MS-MS) ..... 30

2.10.4 Kernresonanzspektroskopie (NMR) ..... 31

2.11 Tierversuche ..... 31

2.11.1 Bestimmung von gesamten Daidzein und Genistein im Futter ..... 31

2.11.2 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch SIHUMIx-Konsortium ..... 31

2.11.3 Inkubation von *S. isoflavoniconvertens* mit Altromin-Futter ..... 31

2.11.4 Tierhaltung ..... 32

2.11.5 Monoassoziation von keimfreien Ratten mit *S. isoflavoniconvertens* (SIMA-Ratten) ..... 32

2.11.6 Co-Assoziation von SIHUMIx-Ratten mit *S. isoflavoniconvertens* (SIA-Ratten) ..... 33

2.11.7 Umsetzung von Daidzein und Genistein in den SIMA- bzw. keimfreien Ratten ..... 33

2.11.8 Umsetzung von Daidzein und Genistein in den SIA- und Kontrollratten ..... 33

2.11.9 Probenaufbereitung ..... 34

2.11.10 Bestimmung der Isoflavone und ihrer Metaboliten in Plasma, Urin, Darminhalten und Fäzes ..... 34

2.11.11 Bestimmung der Wiederfindung der Isoflavonoide in Fäzes, Urin und Plasma ..... 35

2.11.12 Bestimmung von IGF-I in Plasma ..... 35

2.11.13 Datenanalyse und Statistik ..... 35

2.13 Lösungen, Puffer und Medien ..... 36

3. ERGEBNISSE ..... 43

3.1 Isolierung und Charakterisierung eines humanen Equol-bildenden Darmbakteriums ..... 43

3.1.1 Umsetzung von Daidzein durch humane Fäzessuspensionen und der Anteil von Equol-bildenden Bakterien in humanen Fäzes ..... 43

3.1.2 Stabilität der Equol-bildenden Anreicherungskultur ..... 44

3.1.3 Einfluss von Arginin auf die Equol-bildende Aktivität der Anreicherungskultur ..... 45

3.1.4 Einfluss von Wasserstoff auf die Equol-bildende Aktivität der Anreicherungskultur..... 46

3.1.5 Einfluss von Antibiotika auf die Equol-bildende Aktivität der Anreicherungskultur..... 47

3.1.6 Isolierung eines Equol-bildenden Bakteriums aus der Anreicherungskultur..... 49

3.1.7 Charakterisierung des isolierten Equol-bildenden Bakteriums..... 50

3.2 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch bakterielle Reinkulturen ..... 55

3.2.1 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch *Slackia isoflavoniconvertens*..... 55

3.2.2 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch *Enterorhabdus mucosicola*..... 57

3.2.3 Identifizierung des Endproduktes der Umsetzung von Genistein..... 59

3.2.4 Die Umsetzung von Equol in Gegenwart von Sauerstoff durch *S. isoflavoniconvertens* und *E. mucosicola*..... 61

3.3 Induktion der Isoflavon-umsetzenden Enzyme ..... 62

3.4 Umsetzung von Isoflavonen und Equol im zellfreien System ..... 65

3.4.1 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch den Rohextrakt von *E. mucosicola*..... 65

3.4.2 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch den Rohextrakt von *S. isoflavoniconvertens* ..... 66

3.4.3 Die Sauerstoffempfindlichkeit der an der Umsetzung von Isoflavonen beteiligten Enzymen ..... 67

3.5 Nachweis der *in vivo*-Metabolisierung von Isoflavonen durch *S. isoflavoniconvertens* in gnotobiotischen Tiermodellen ..... 68

3.5.1 Umsetzung von Daidzein und Genistein aus dem Futter durch *S. isoflavoniconvertens in vitro*..... 68

3.5.2 Etablierung eines gnotobiotischen Modells durch Monoassoziation..... 68

3.5.3 Metabolismus der Isoflavone in keimfreien und SIMA-Ratten..... 69

3.5.4 Metabolisierung von Isoflavonen durch *S. isoflavoniconvertens in vivo* innerhalb eines bakteriellen Konsortiums..... 70

3.5.4.1 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch das SIHUMIX-Konsortium *in vitro* ..... 71

3.5.4.2 Besiedlung der SIHUMIX-Ratten durch *S. isoflavoniconvertens*..... 71

3.5.4.3 Isoflavone und deren Metaboliten in den Fäzes und Darminhalten ..... 73

3.5.4.4 Isoflavone und deren Metaboliten im Urin und Blutplasma ..... 77

3.5.4.5 Anteile an freien Isoflavonen und freien bakteriellen Isoflavonmetaboliten ..... 79

3.5.4.6 IGF-I-Konzentrationen im Plasma der SIA- und Kontrollratten..... 80

4 DISKUSSION ..... 82

4.1 Das humane Equol-bildende Darmbakterium *Slackia isoflavoniconvertens*..... 82

4.2 Bakterielle Umsetzung von Daidzein und Genistein ..... 85

4.3 Induktion der Isoflavon-umsetzenden Enzyme..... 87

4.4 Aktivität der Isoflavon-umsetzenden Enzyme im zellfreien System ..... 88

4.5 Umsetzung von Daidzein und Genistein durch *S. isoflavoniconvertens in vivo* ..... 90

4.5.1 Einfluss der Monoassoziation auf die Equol-bildende Aktivität von *S. isoflavoniconvertens in vivo*. 91

4.5.2 Equol-bildende Aktivität von *S. isoflavoniconvertens in vivo* im Rahmen der Co-Assoziation mit vereinfachter humaner Mikrobiota ..... 91

4.5.3 Zusammenhang zwischen Equol und IGF-I-Konzentrationen..... 96

4.6    Abschließende Betrachtungen und Ausblick ..... 96

5    ANHANG ..... 98

6    LITERATURVERZEICHNIS ..... 102