



Svenja Bunzel (Autor)
**Identifizierung von bakteriellen
Sekundärmetaboliten durch Genome Mining und
mikrobielle Probennahme**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8733>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG.....	1
1.1	Bodenbakterien als Lieferanten für neue Wirkstoffe	1
1.1.1	Bedarf an neuen Antibiotika	1
1.1.2	Mikroorganismen aus dem Boden als Quelle neuer Naturstoffe	1
1.1.3	Die Gattung <i>Streptomyces</i> als Antibiotikalieferant.....	2
1.1.3.1	Streptomyceten	2
1.1.3.2	Aktivierungs- und Regulationsmechanismen der Sekundärmetabolite in Streptomyceten	4
1.1.3.3	<i>Streptomyces leeuwenhoekii</i> und seine Sekundärmetabolite	7
1.1.3.4	<i>Streptomyces fragilis</i> und seine Sekundärmetabolite	9
1.2	Nicht-ribosomale Peptide und ihre Biosynthese.....	11
1.2.1	Strukturelle Vielfalt der nicht-ribosomalen Peptide.....	11
1.2.2	Domänen der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen.....	12
1.2.3	Einteilung der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen	15
1.3	Identifizierung bioaktiver Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen	17
1.3.1	Aktivitätsbasiertes Screening.....	17
1.3.2	Genomanalyse und Identifizierung biosynthetischer Gencluster	17
1.4	Ziele der Arbeit	20
2.	MATERIAL	21
2.1	Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	21
2.2	Organismen und biologisches Material	22
2.2.1	<i>Escherichia coli</i>	22
2.2.2	Organismen zum Nachweis der Bioaktivität.....	22
2.2.3	Streptomyceten	23
2.2.4	<i>Aneurinibacillus migulanus</i>	23
2.3	Vektoren.....	24
2.4	Oligonukleotide	25
2.5	Kulturmedien und Lösungen.....	28
3.	METHODEN	30
3.1	Molekularbiologische Methoden	30
3.1.1	Isolierung genomischer DNA aus Bodenbakterien	30
3.1.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30
3.1.3	Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von DNA aus dem Gel.....	31
3.1.4	Konstruktion von Expressions- und klassischen knock-out-Plasmiden	31
3.1.5	Konstruktion von CRISPR/Cas9-Plasmiden	33
3.1.5.1	sgRNA <i>Annealing</i>	33
3.1.5.2	Golden Gate	33
3.1.5.3	Gibson Assembly	34

3.1.6	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.1.7	Transformation von <i>E. coli</i> -Zellen	34
3.1.8	Isolierung von Plasmid-DNA.....	35
3.1.9	Transformation von <i>Streptomyces</i> -Arten	35
3.1.9.1	Herstellung einer Sporensuspension	35
3.1.9.2	Herstellung von Protoplasten	36
3.1.9.3	Vorbereiten der Plasmid-DNA.....	36
3.1.9.4	Transformation von <i>S. leeuwenhoekii</i>	36
3.1.10	<i>Replica Plating</i> und Kolonie-PCR mit <i>Streptomyces</i> -Arten	37
3.1.11	Sequenzierung.....	37
3.2	Biochemische Methoden	38
3.2.1	Überexpression von Adenylierungsdomänen	38
3.2.2	Zellaufschluss und Aufreinigung rekombinanter Proteine über Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC).....	38
3.2.3	Pufferaustausch bei rekombinanten Proteinen.....	39
3.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
3.2.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	39
3.2.6	Adenylierungsdomänen-Aktivitätsassay.....	40
3.3	Mikrobiologische Methoden	43
3.3.1	Isolierung von Stämmen aus dem Boden	43
3.3.1.1	Sammlung von Bodenproben und Kultivierung	43
3.3.1.2	Klassifizierung der isolierten Bakterien.....	43
3.3.2	Elizitierung von <i>Streptomyces</i> -Arten.....	43
3.3.3	¹⁴ C-Fütterung von <i>S. fragilis</i>	44
3.3.4	Extraktion von flüssigen Bodenbakterienkulturen.....	44
3.3.4.1	Extraktion aus einer <i>S. leeuwenhoekii</i> -Suspension	44
3.3.4.2	Extraktion von elizitierten <i>Streptomyces</i> -Suspensionen.....	45
3.3.4.3	Extraktion einer <i>S. fragilis</i> - ¹⁴ C-Fütterungskultur	45
3.3.4.4	Extraktion von isolierten Bodenbakterien	45
3.3.5	Extraktion von Emerskulturen von Bodenbakterien.....	46
3.3.6	Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	46
3.4	Bestimmung der Bioaktivität	47
3.4.1	Agardiffusionstest nach Kirby-Bauer.....	47
3.4.2	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität	47
3.5	Analytische Methoden.....	48
3.5.1	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	48
3.5.2	Dünnschichtchromatographie (DC) radioaktiver Proben.....	49
3.5.3	Extraktion aus einer Kieselgel-Dünnschicht	49
3.5.4	Flüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS).....	50
3.6	Bioinformatische Methoden	52
3.6.1	Software und Online Tools.....	52
3.6.2	Identifizierung interessanter Gencluster aus Streptomyceten.....	52

4.	ERGEBNISSE	55
4.1	Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus Bodenbakterien.....	55
4.1.1	Isolierung neuer Bodenbakterien	55
4.1.2	Antibiotische Wirkung von Extrakten aus den isolierten Bodenbakterien.....	59
4.2	Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>.....	63
4.2.1	Bioinformatische Identifizierung eines interessanten Genclusters.....	63
4.2.2	Aktivitätsbasierte Isolierung	66
4.2.3	Screening nach Erzeugung einer knock-out-Mutante	71
4.2.4	Erstellung einer knock-in- und knock-out-Mutante mittels CRISPR/Cas9	74
4.2.5	Elizitierung der Sekundärmetabolitproduktion in <i>S. leeuwenhoekii</i>	76
4.2.6	Bestimmung der Substratspezifität der Adenylierungsdomäne der NRPS RS4605 und RS4610	78
4.2.6.1	Substratspezifität der A-Domäne PheA der Gramicidin S-Synthetase aus <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	78
4.2.6.2	Substratspezifität der Adenylierungsdomänen der NRPS RS4605	79
4.2.6.3	Substratspezifität der Adenylierungsdomänen der NRPS RS4610	81
4.3	Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus <i>Streptomyces fragilis</i>	83
4.3.1	Bioinformatische Identifizierung eines interessanten Genclusters.....	83
4.3.2	Bestimmung der Substratspezifität der Adenylierungsdomänen der NRPS ctg9_32 und ctg9_33	86
4.3.2.1	Substratspezifität der Adenylierungsdomänen der NRPS ctg9_32	86
4.3.2.2	Substratspezifität der Adenylierungsdomänen der NRPS ctg9_33	88
4.3.3	Identifizierung eines NRPS durch ¹⁴ C-Fütterung identifizierter Bausteine.....	91
4.3.4	Elizitierung der Sekundärmetabolitproduktion von <i>S. fragilis</i>	94
4.3.5	Evaluierung der Bioaktivität.....	95
4.3.5.1	Bestimmung der antimikrobiellen Aktivität.....	95
4.3.5.2	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität	96
5.	DISKUSSION	98
5.1	Isolierung neuer Naturstoffe aus Bodenbakterien	98
5.1.1	Naturstoffe von Bakterien aus der Rhizosphäre von Pflanzen	98
5.1.2	Naturstoffe von genomsequenzierten Bodenbakterien.....	99
5.1.3	Aktivierung eines biosynthetischen Genclusters.....	101
5.2	Nutzung der Sequenzinformation zur Charakterisierung und Manipulation eines biosynthetischen Genclusters	104
5.2.1	Charakterisierung eines biosynthetischen Genclusters.....	104
5.2.2	Manipulation eines biosynthetischen Genclusters.....	109
5.3	Ausblick.....	111
6.	ZUSAMMENFASSUNG.....	113
7.	LITERATURVERZEICHNIS	115
8.	ANHANG	131
8.1	Sequenzierungsergebnisse der isolierten Bodenbakterien.....	131

8.2	Vektorkarten	152
8.3	Proteinsequenzen der Adenylierungsdomänen	153
8.3.1	<i>S. leeuwenhoekii</i>	153
8.3.2	<i>S. fragilis</i>	154
8.4	Biologische Replikat der Bestimmung der Substratspezifität der Adenylierungsdomänen	157
8.4.1	PheA der Gramicidin S-Synthetase aus <i>Aneurinibacillus migulanus</i>	157
8.4.2	NRPS RS4605 und RS4610 aus <i>S. leeuwenhoekii</i>	158
8.4.3	NRPS ctg9_32 und ctg9_33 aus <i>S. fragilis</i>	160
8.5	Nachweis der homologen Rekombination in <i>S. leeuwenhoekii</i>	162
8.6	Elizitierung der Sekundärmetabolitproduktion von Streptomyceten	163
8.6.1	<i>S. leeuwenhoekii</i>	163
8.6.2	<i>S. fragilis</i>	164