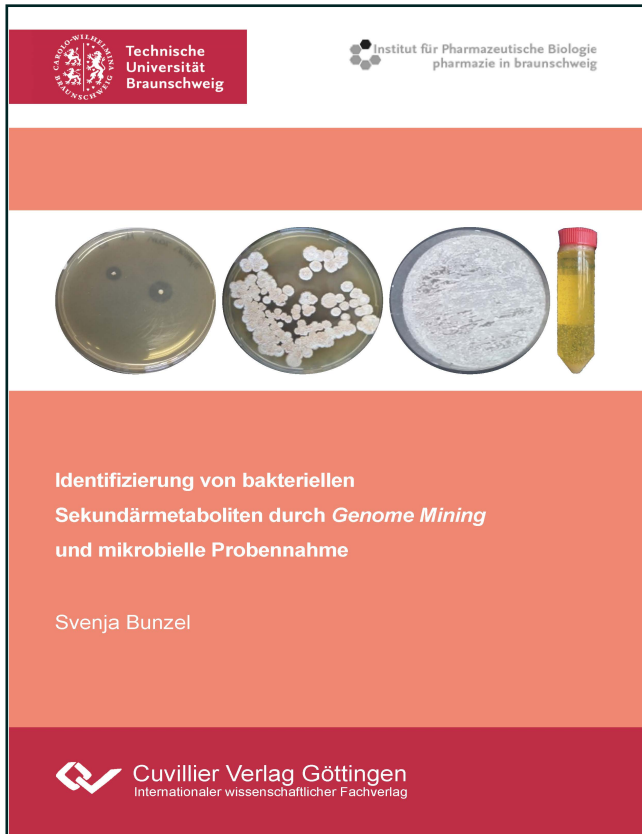




Svenja Bunzel (Autor)
**Identifizierung von bakteriellen
Sekundärmetaboliten durch Genome Mining und
mikrobielle Probennahme**



<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 |