



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](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

---

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Bodenbakterien als Lieferanten für neue Wirkstoffe .....</b>	<b>1</b>
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
<b>1.2</b>	<b>Nicht-ribosomale Peptide und ihre Biosynthese.....</b>	<b>11</b>
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
<b>1.3</b>	<b>Identifizierung bioaktiver Sekundärmetabolite aus Mikroorganismen .....</b>	<b>17</b>
1.3.1	Aktivitätsbasiertes Screening.....	17
1.3.2	Genomanalyse und Identifizierung biosynthetischer Gencluster .....	17
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>20</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Enzyme, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....</b>	<b>21</b>
<b>2.2</b>	<b>Organismen und biologisches Material .....</b>	<b>22</b>
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
<b>2.3</b>	<b>Vektoren.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4</b>	<b>Oligonukleotide .....</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Kulturmedien und Lösungen.....</b>	<b>28</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>30</b>
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
<b>3.2</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>38</b>
3.2.1	Überexpression von Adenylierungsdomänen .....	38
3.2.2	Zellaufschluss und Aufreinigung rekombinanter Proteine über Metallchelat-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
<b>3.3</b>	<b>Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>43</b>
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	<sup>14</sup> 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> - <sup>14</sup> 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
<b>3.4</b>	<b>Bestimmung der Bioaktivität .....</b>	<b>47</b>
3.4.1	Agardiffusionstest nach Kirby-Bauer.....	47
3.4.2	Bestimmung der zytotoxischen Aktivität .....	47
<b>3.5</b>	<b>Analytische Methoden.....</b>	<b>48</b>
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
<b>3.6</b>	<b>Bioinformatische Methoden .....</b>	<b>52</b>
3.6.1	Software und Online Tools.....	52
3.6.2	Identifizierung interessanter Gencluster aus Streptomyceten.....	52

<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus Bodenbakterien.....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Isolierung neuer Bodenbakterien .....	55
4.1.2	Antibiotische Wirkung von Extrakten aus den isolierten Bodenbakterien.....	59
<b>4.2</b>	<b>Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus <i>Streptomyces leeuwenhoekii</i>.....</b>	<b>63</b>
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
<b>4.3</b>	<b>Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus <i>Streptomyces fragilis</i> .....</b>	<b>83</b>
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 <sup>14</sup> 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
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>98</b>
<b>5.1</b>	<b>Isolierung neuer Naturstoffe aus Bodenbakterien .....</b>	<b>98</b>
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
<b>5.2</b>	<b>Nutzung der Sequenzinformation zur Charakterisierung und Manipulation eines biosynthetischen Genclusters .....</b>	<b>104</b>
5.2.1	Charakterisierung eines biosynthetischen Genclusters.....	104
5.2.2	Manipulation eines biosynthetischen Genclusters.....	109
<b>5.3</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>111</b>
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>115</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>131</b>
<b>8.1</b>	<b>Sequenzierungsergebnisse der isolierten Bodenbakterien.....</b>	<b>131</b>

<b>8.2</b>	<b>Vektorkarten</b> .....	<b>152</b>
<b>8.3</b>	<b>Proteinsequenzen der Adenylierungsdomänen</b> .....	<b>153</b>
8.3.1	<i>S. leeuwenhoekii</i> .....	153
8.3.2	<i>S. fragilis</i> .....	154
<b>8.4</b>	<b>Biologische Replikat der Bestimmung der Substratspezifität der Adenylierungsdomänen</b> .....	<b>157</b>
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
<b>8.5</b>	<b>Nachweis der homologen Rekombination in <i>S. leeuwenhoekii</i></b> .....	<b>162</b>
<b>8.6</b>	<b>Elizitierung der Sekundärmetabolitproduktion von Streptomyceten</b> .....	<b>163</b>
8.6.1	<i>S. leeuwenhoekii</i> .....	163
8.6.2	<i>S. fragilis</i> .....	164