

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	XIII
-----------------------	------

Tabellenverzeichnis	XVII
---------------------	------

Abkürzungsverzeichnnis	XIX
------------------------	-----

1 Zusammenfassung	1
-------------------	---

2 Einleitung	3
--------------	---

2.1 Die Gattung <i>Streptomyces</i>	3
-------------------------------------	---

2.2 Antibiotika	4
-----------------	---

2.3 Das Streptogramin-Antibiotikum Pristinamycin	6
--	---

2.3.1 Struktur und Wirkungsweise von Pristinamycin	6
--	---

2.3.2 Das Pristinamycin-Supercluster	7
--------------------------------------	---

2.3.3 Biosynthese von Pristinamycin I	8
---------------------------------------	---

2.4 L-Phenylglycin-Biosynthese in <i>S. pristinaespiralis</i>	10
---	----

2.5 Aminotransferasen	13
-----------------------	----

2.5.1 Klassifizierung von Aminotransferasen	13
---	----

2.5.2 Reaktionsmechanismus von Aminotransferasen	13
--	----

2.6 Das Enantiomer D-Phenylglycin	15
-----------------------------------	----

2.7 Ziel dieser Arbeit	17
------------------------	----

3 Materialien und Methoden	19
----------------------------	----

3.1 Bakterienstämme	19
---------------------	----

3.2 Vektoren, Plasmide und Cosmide	19
------------------------------------	----

3.3 Oligonukleotide	22
---------------------	----

3.4 Kits, Enzyme, Chemikalien und andere Materialien	25
--	----

3.5 Lösungen zur Selektion und Expressionsinduktion	28
---	----

3.6 Puffer und Lösungen für verschiedene Methoden	28
---	----

3.7 Nährmedien	32
----------------	----

3.8 Kultivierung von Bakterien	35
--------------------------------	----

3.8.1 Anzucht und Kultivierung von <i>E. coli</i>	35
---	----

3.8.2 Anzucht und Kultivierung von Streptomyceten	35
---	----

3.9 DNA-Präparation	35
---------------------	----

3.9.1	Isolierung genomischer DNA aus Streptomyceten-----	35
3.9.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Minipräparation)-----	36
3.9.3	Extraktion von DNA aus dem Agarosegel-----	37
3.9.4	Eckhardt-Lyse-----	37
3.10	Agarose-DNA-Gelelektrophorese-----	38
3.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-----	38
3.12	DNA-Modifizierung-----	39
3.12.1	Restriktion-----	39
3.12.2	Ligation-----	40
3.13	DNA-Transfer bei Bakterien-----	40
3.13.1	Transformation von <i>E. coli</i> mittels der CaCl ₂ -Methode-----	40
3.13.1.1	Herstellung kompetenter Zellen-----	40
3.13.1.2	Transformation-----	40
3.13.2	Protoplastentransformation von <i>Streptomyces</i> -----	41
3.13.2.1	Herstellung von Protoplasten-----	41
3.13.2.2	Polyethylenglycol (PEG) –induzierte Transformation-----	41
3.14	Blau-Weiß-Methode zur Selektion-----	42
3.15	Überexpression der Pgl-Enzyme in <i>E. coli</i> -----	42
3.16	Zellaufschluss mit der French Press-----	42
3.17	Native Aufreinigung von His-getagten Fusionsproteinen mit Nickel-NTA Säulen-----	43
3.18	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)-----	43
3.19	Immunoblotting-Experimente (Western Blot)-----	44
3.19.1	Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran-----	44
3.19.2	Immunofärbung (Nachweisreaktion) – Bindung des konjugierten Antikörpers-----	44
3.19.3	Visualisierung-----	45
3.20	Enzymassay mit der Aminotransferase PglE-----	45
3.20.1	Test der PglE-Reaktion hin zu L-Phg-----	45
3.20.2	Test der PglE-Rückreaktion-----	46
3.21	Untersuchungen der <i>S. pristinaespiralis</i> <i>pgl::apra</i> -Mutanten auf akkumulierende Zwischenprodukte des L-Phg-Biosyntheseweges mittels der HPLC-MS/MS-----	46
3.21.1	Anzucht und Aufbereitung der <i>pgl::apra</i> -Stämme für die HPLC-MS/MS-----	46
3.21.2	HPLC-MS/MS-Analyse zur Detektion von Phenylglycin, Phenylglyoxylyat, Hydroxyphenylpyruvat, Phenylalanin und Tyrosin-----	47
3.22	Transkriptionsanalysen mittels RT-PCR-----	49

3.22.1	Anzucht von <i>S. pristinaespiralis</i> Pr11 -----	49
3.22.2	Anzucht und Induktion des Überexpressionstamms <i>E. coli</i> Rosetta pRSETB/ <i>pgl</i> _L -----	50
3.22.3	RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (QIAGEN)-----	50
3.22.4	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) -----	51
3.23	Nachweis heterologer Phenylglycinproduktion mittels der GC-MS-----	52
3.23.1	Heterologe Expression der <i>pgl</i> -Operone in <i>E. coli</i> -----	52
3.23.2	Heterologe Expression der <i>pgl</i> -Operone in <i>S. lividans</i> -----	52
3.23.3	Aufkonzentrierung der Aminosäuren -----	53
3.23.4	Probenaufbereitung für die GC-MS-----	53
3.23.5	GC-MS-----	55
3.24	Verwendete Software und Internetdienste-----	56
4	Ergebnisse-----	57
4.1	Biochemische Analyse des L-Phenylglycin-Biosyntheseweges in <i>S. pristinaespiralis</i> -----	57
4.1.1	Plasmidkonstruktion und heterologe Expression der <i>Pgl</i> - Enzyme in <i>E. coli</i> unter Verwendung nativer <i>pgl</i> -Gene-----	57
4.1.1.1	Klonierung der nativen <i>pgl</i> -Gene in den Expressionsvektor pYT1 -----	57
4.1.1.2	Heterologe Expression der pYT/ <i>hispgl</i> -Plasmide in <i>E. coli</i> Rosetta -----	60
4.1.2	Plasmidkonstruktion und heterologe Expression der <i>Pgl</i> - Enzyme in <i>E. coli</i> unter Verwendung synthetischer <i>pgl</i> -Gene -----	62
4.1.2.1	Klonierung der synthetischen <i>pgl</i> -Gene in den Expressionsvektor pYT1 -----	62
4.1.2.2	Heterologe Expression der pYT/ <i>synth.hispgl</i> -Plasmide in <i>E. coli</i> Rosetta -----	64
4.1.3	Untersuchungen der <i>S. pristinaespiralis pgl::apra</i> -Mutanten auf die Akkumulation von Phg-Biosynthese-Intermediaten -----	67
4.1.4	Untersuchungen zur <i>PglE</i> -katalysierten Reaktion-----	70
4.1.4.1	Nachweis von L-Phg als Produkt der <i>PglE</i> -Reaktion -----	71
4.1.4.2	Nachweis von Hydroxy- bzw. Phenylpyruvat als Nebenprodukt der <i>PglE</i> -Reaktion-----	76
4.1.4.3	Untersuchung der <i>PglE</i> -Rückreaktion-----	78
4.2	Untersuchungen zur heterologen D- und L-Phenylglycin- produktion -----	82
4.2.1	Untersuchungen zur heterologen Expression der <i>pgl</i> -Operone in <i>E. coli</i> -----	83

4.2.1.1	Heterologe Expression der <i>pgl</i> -Operone in <i>E. coli</i> DH5a -----	83
4.2.1.2	Heterologe Expression des synthetischen <i>pgl_D</i> -Operons in <i>E. coli</i> -----	84
4.2.2	Heterologe Expression des <i>pgl_L</i> - und <i>pgl_D</i> -Operons in <i>S. lividans</i> -----	87
4.3	Transkriptionsanalysen des <i>pgl_L</i> -Operons -----	87
4.3.1	Transkriptionsanalyse des <i>pgl_L</i> -Operons in <i>S. pristinaespiralis</i> -----	87
4.3.2	Transkriptionsanalyse des <i>pgl_L</i> -Operons in <i>E. coli</i> -----	90
5	Diskussion -----	93
5.1	Die L-Phenylglycin-Biosynthese -----	93
5.1.1	Biochemische Analyse des L-Phg-Biosyntheseweges in <i>S. pristinaespiralis</i> -----	94
5.1.2	Die Aminotransferase PglE -----	97
5.1.3	Erweitertes Modell des L-Phenylglycin-Biosyntheseweges -----	100
5.2	Produktion von L- und D-Phenylglycin -----	102
5.3	Verifizierung der Operonstruktur von <i>pgl_L</i> in <i>S. pristinaespiralis</i> -----	106
	Literaturverzeichnis -----	109
	Anhang -----	115

Biosyntheseweg eines natürlichen Phenylglycins
Biochemische Analyse und Perspektiven einer
nachhaltigen Produktion

Osipenkov, N.

2016, XIX, 121 S. 45 Abb., Softcover

ISBN: 978-3-658-11864-8