

Inhaltsangabe

I. Einführung

1 Einteilung und Klassifizierung Sauerstoff-verbrauchender Enzyme.....	1
2. Der Reaktionstyp als Charakteristikum für die Einteilung der Dioxygenasen... ..	2
3. Eine weitere Gruppe von Dioxygenasen wird durch die Abhängigkeit von einem Cosubstrat mit einer 2-Oxogruppe charakterisiert.....	3
3.1 Reaktionsmechanismus einer 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase mit Hydroxylase-Aktivität.....	6
3.2 Bifunktionale Dioxygenasen mit Hydroxylase- und Epoxidase- Aktivität.....	8
3.3 Cyclasen und Desaturasen als 2-Oxoglutarat-abhängige Dioxygenasen .	8
3.4 Verwendung alternativer Cosubstrate mit einer 2-Oxogruppe.....	9
4. In der Biosynthese der β -Lactam-Antibiotika katalysieren Dioxygenasen verschiedene Syntheseschritte.....	10
4.1 Enzyme der ersten gemeinsamen Stufe der β -Lactam-Biosynthese aller Produzenten.....	11
4.2 Die Biosynthese der Penicilline durch <i>Penicillium chrysogenum</i> und <i>Aspergillus nidulans</i>	13
4.3 Biosynthese der Cephalosporine und Cephamycine.....	15
4.4 Die Cephalosporin C-Biosynthese bei <i>Acremonium chrysogenum</i>	17
4.5 Biosyntheseschritte der prokaryotischen Produzenten zum Endprodukt Cephamycin C.....	18
5. Ausblick.....	20

II. Problemstellung

1. Ziele der industriell genutzten Biotechnologie.....	22
2 Problemstellung.....	23

III. Material und Methoden

1. Material	
1.1 Stämme.....	25
1.2 Plasmide.....	25
1.3 Oligonukleotide.....	27
1.4 Nährmedien.....	28
1.5 Häufig verwendete Puffer.....	29
1.6 Chemikalien.....	29
1.7 Enzyme.....	30

2. Methoden	
2.1 Kulturbedingungen.....	30
2.2 Transformation.....	30
2.3 Isolierung von Nukleinsäuren.....	30
2.4 Gelelektrophorese.....	31
2.5 Radioaktive Markierung von DNA.....	31
2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	31
2.7 Elution von DNA aus Agarosegelen und Reinigung von DNA-Fragmenten.....	31
2.8 DNA-Sequenzierung.....	32
2.9 Oligonukleotidsynthese.....	32
2.10 <i>In vitro</i> -Mutagenese und Klonierung der DNA-Fragmente.....	32
2.11 Synthese und Reinigung rekombinanter Proteine.....	34
2.11.1 Synthese der rekombinanten Proteine.....	34
2.11.2 Isolation des nativen Proteins.....	34
2.11.3 Renaturierung und Dialyse von Proteinen in Einschlußkörpern.....	34
2.11.4 Aufreinigung der Histidin-Fusionsproteine.....	35
2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	35
2.13 Western-Blot und Immunodetektion	35
2.14 Funktionsanalyse der Expandase/Hydroxylase in einem enzymatischen Test	35
2.15 Quantitativer Nachweis von β -Lactam-Verbindungen.....	36
2.16 Modellierung von 3-D-Proteinstrukturen.....	37
2.17 Auswertung von Nukleotidsequenzen und allgemeine Software.....	38
2.18 Sicherheitsbestimmungen.....	38

IV. Ergebnisse

1. Synthese und Aufreinigung der Expandase/Hydroxylase aus <i>A. chrysogenum</i>	39
1.1 Konstruktion des Expressionsvektors und des Synthesystems	39
1.2 Synthese und Reinigung des Fusionsproteins.....	40
2. Funktionsanalyse der Expandase/Hydroxylase mit Enzymmessungen.....	43
2.1 Enzymaktivitätsvergleich des nativen und renaturierten Wildtyp-Proteins.....	43
2.2 Bestimmung des pH- und Temperatur-Profils der Expandase/Hydroxylase.....	45
3. Homologievergleich der Primärstruktur der Expandase/Hydroxylase mit Primärstrukturen verwandter Proteine und weiteren Dioxygenasen.	47
4. 3-D-Strukturmodellierung zur Charakterisierung der Expandase/Hydroxylase.....	50
4.1 Vergleich der Primär- und Sekundärstrukturen der DAOCS aus <i>S. claviger</i> mit der Expandase/Hydroxylase aus <i>A. chrysogenum</i> ..	50
4.2 Strukturmodellierung der Expandase/Hydroxylase aus <i>A. chrysogenum</i>	51
4.3 Qualitätskontrolle der modellierten Struktur der Expandase/Hydroxylase.....	53
4.4 Gesamtbeurteilung der Modellstruktur der Expandase/Hydroxylase....	55

5 Lokalisierung von „Reaktionshöhlen“	56
6 Analyse funktions- und strukturrelevanter Aminosäurereste durch <i>in vitro</i> -Mutagenese und Bestimmung der Aktivitäten der modifizierten Proteine	60
6.1 Einfluß der Mutationen auf die Expression bei der Synthese und Aufreinigung	60
6.2 Auswirkungen von Modifikationen in konservierten und funktionsrelevanten Bereichen des putativen Aktivitätszentrums der Expandase/Hydroxylase	62
V. Diskussion	
1 Die funktionale Synthese der Expandase/Hydroxylase ist mit dem prokaryotischen Expressionssystem <i>Escherichia coli</i> möglich.....	65
2 Die Expandase/Hydroxylase hat nur eine Eisen-Koordinierungsstelle und eine Bindestelle für 2-Oxoglutarat.....	67
2.1 Die Eisen-Koordinierungsstelle besteht aus zwei Histidinresten und einem Asparaginsäurerest.....	67
2.2 Im konservierten Sequenzbereich befindet sich die einzige Bindestelle für 2-Oxoglutarat.....	69
2.3 Die Tertiärstruktur der Expandase/Hydroxylase weist mit dem „jelly-roll“-Motiv Ähnlichkeiten zur IPNS und zur DAOCS auf.....	70
2.4 Die Aktivitätszentren der IPNS, der DAOCS und der modellierten Expandase/Hydroxylase weisen eine große Strukturähnlichkeit auf.....	71
2.5 Eine absolute Trennung der beiden Teilreaktionen ist in einem bifunktionalen Reaktionszentrum nicht möglich.....	73
3 Möglicher Reaktionsmechanismus der bifunktionalen Expandase/Hydroxylase.....	78
3.1 Vergleich der katalysierten Reaktionstypen innerhalb der β -Lactam-Biosynthese.....	79
4 Ziele der modernen Stamm- und Prozeßentwicklung.....	82
3.1 Kenntnisse der molekularen Charakterisierung der Expandase/Hydroxylase könnten für die industrielle Stamm- und Prozeßentwicklung verwendet werden	82
4.2 Verfahrenstechnische Aspekte der industriellen Prozeßentwicklung.....	84
VI. Zusammenfassung	
VII. Summary	
VIII. Literatur	
IX. Anhang	