

Investigation into the biosynthesis and structural biology of the glycan component of pseudomurein of thermophilic methanogens; with emphasis on epimerases

präsentiert
von

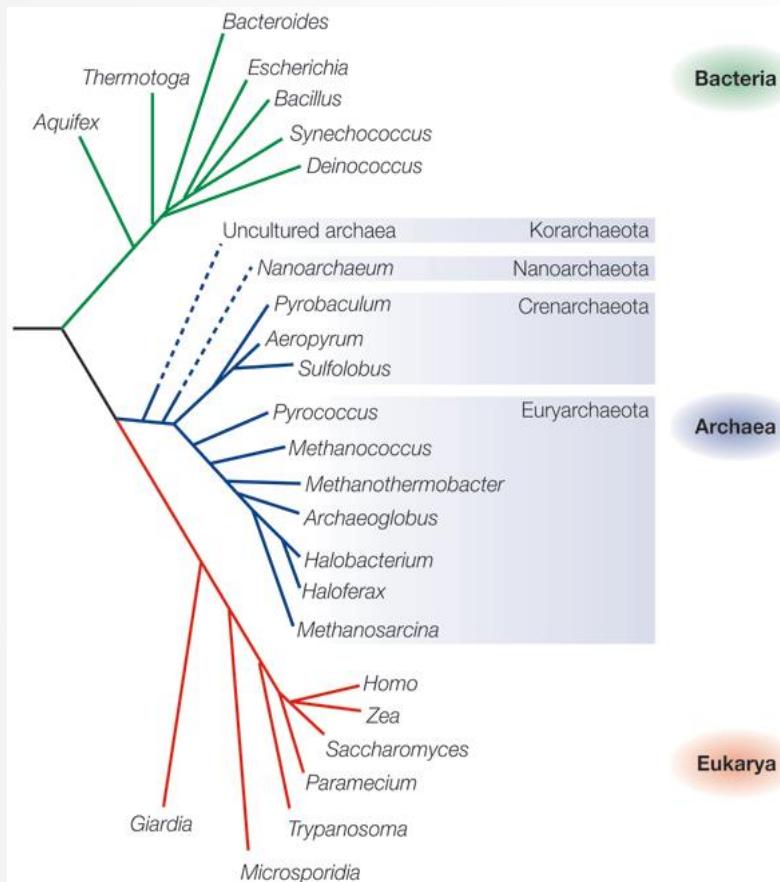
Denise Schäfer

- AgResearch Limited, Grasslands Research Centre, Palmerston North
- Laboratory of Rumen Microbiology
- Betreuung: Dr. Ron Ronimus und Dr. Linley Schofield



Anlass der Arbeit

- Archaea und Bakteria : gemeinsamer Vorfahr; ja oder nein?



Nature Reviews | Genetics

Phylogenetic tree of life (Allers and Mevarech 2005)

- Kyoto Protokoll:

- Neuseeland besitzt eine große Agrarwirtschaft (Schafe und Kühe)

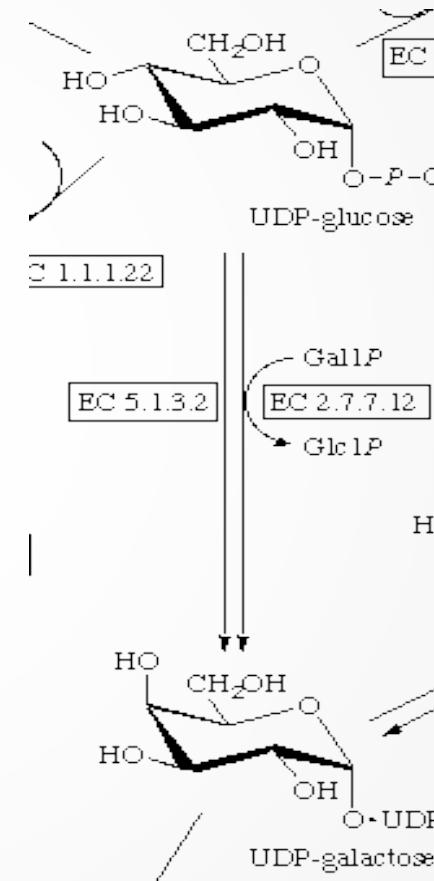
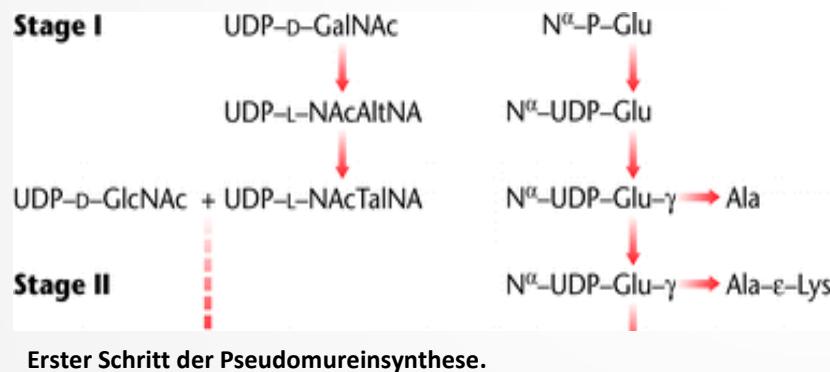
- Reduktion des Treibhausgases Methan

- Forschung:

- Inhibitoren zur Reduzierung der Methanproduktion

Anlass der Arbeit

- Identifikation der Epimerasen, hinsichtlich ihrer Rolle in der Pseudomureinsynthese
- Erster Schritt der Synthese:
Epimerisation und Oxidation von UDP-N-acetylgalactosamin zu N-acetyltaulosaminuronsäure



UDP-glucose 4-epimerase.

Angewandte Methoden

1. Mikroorganismen



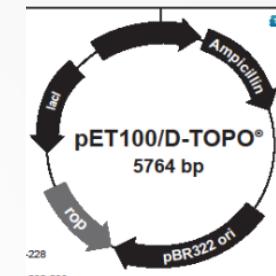
<http://www.biologie.uni-regensburg.de/Mikrobio/Thomm/Arbeitsgruppen/wirth.htm&docid=EGWnAfNQm3zeSM&imgur>

2. PCR



http://hydrology1.nmsu.edu/teaching/soil698/Student_Reports/bcrthermcybler/pcr_files/image002.jpg

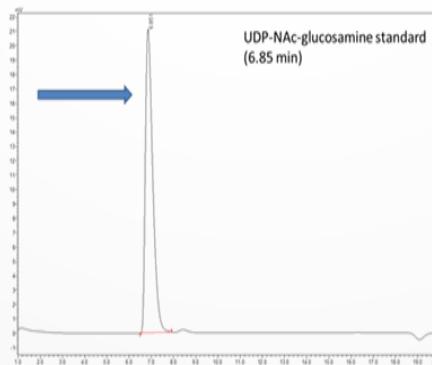
3. TOPO cloning



6. Analyse



5. Enzymeassays/HPLC

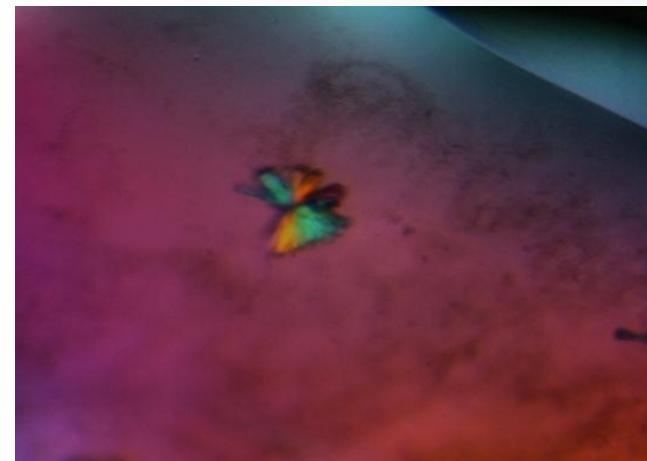
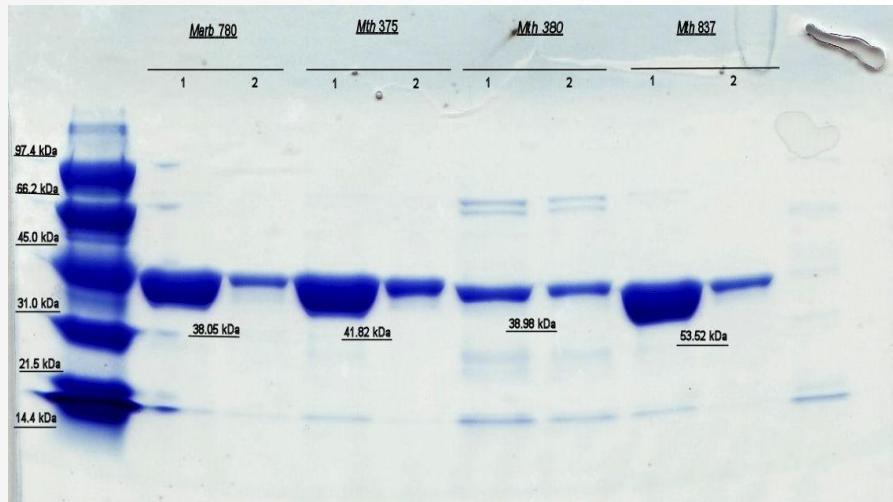


4. Kristallographie



Ergebnisse

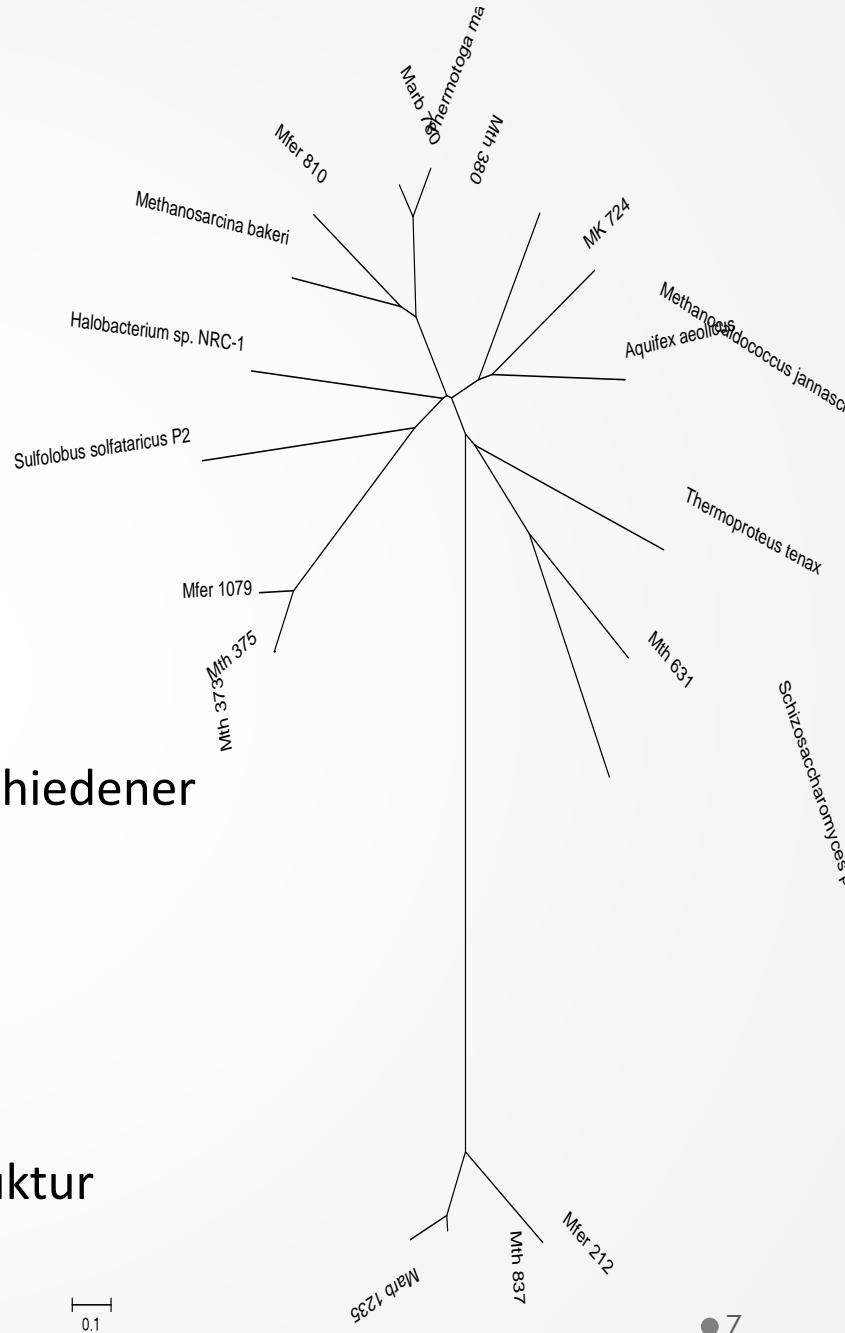
- Erfolgreiche Klonierung des pET 100D vectors in 8 von 9 Proben
- Expression für alle 8 Proben, jedoch nur 4 mit löslichem Protein
→ Optimierung der Transformation



- Kristallographie (sitting drop und hanging drop)
→ Optimierung der erhaltenen Kristalle mittels Konditionsänderungen
- minimale Detektion von Aktivität bei den Enzymeassays; HPLC weist höhere Aktivität auf

Endergebnisse

- Konstruktion des phylogenetic tree
 - Neighbour Joining of MEGA 4 (Tamura, Dudley et al. 2007)
 - Identifikation von 3 Enzymgruppen und deren vermeintliche Funktion
- Aussagen über die Verwandtschaft verschiedener Mikroorganismen
- Aussagen über den ersten Schritt der Pseudomureinsynthese
- Bestimmung der Kristalle und deren Struktur



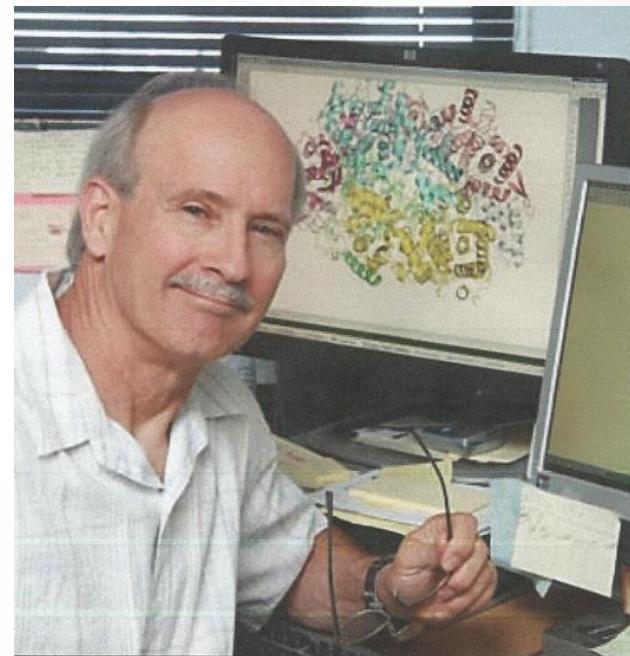
Erfahrungen und Ratschläge

- gute Vorbereitung durch Praktika und Vorlesungen
- Selbständiges und eigenverantwortliches Arbeiten
- Offenheit, Interesse und Neugierde
- Neue Freundschaften
- Frühzeitige Organisation des Auslandsaufenthaltes
- Sehr gute Betreuung

Vielen Dank!



Homesupervisor:
Prof. Dr. rer. nat. B. Siebers



Hostsupervisor:
Dr. Ron Ronimus