

BestMasters

Gesche Berkhan

Biosynthetische Bildung des Ambruticin Ostfragments

In-vitro-Studien

 Springer Spektrum

BestMasters

Mit „BestMasters“ zeichnet Springer die besten Masterarbeiten aus, die an renommierten Hochschulen in Deutschland, Österreich und der Schweiz entstanden sind. Die mit Höchstnote ausgezeichneten Arbeiten wurden durch Gutachter zur Veröffentlichung empfohlen und behandeln aktuelle Themen aus unterschiedlichen Fachgebieten der Naturwissenschaften, Psychologie, Technik und Wirtschaftswissenschaften.

Die Reihe wendet sich an Praktiker und Wissenschaftler gleichermaßen und soll insbesondere auch Nachwuchswissenschaftlern Orientierung geben.

Gesche Berkhan

Biosynthetische Bildung des Ambruticin Ostfragments

In-vitro-Studien

Gesche Berkhan
Hannover, Deutschland

BestMasters

ISBN 978-3-658-09407-2

ISBN 978-3-658-09408-9 (eBook)

DOI 10.1007/978-3-658-09408-9

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Springer Spektrum

© Springer Fachmedien Wiesbaden 2015

Das Werk einschließlich aller seiner Teile ist urheberrechtlich geschützt. Jede Verwertung, die nicht ausdrücklich vom Urheberrechtsgesetz zugelassen ist, bedarf der vorherigen Zustimmung des Verlags. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Bearbeitungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung und Verarbeitung in elektronischen Systemen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Der Verlag, die Autoren und die Herausgeber gehen davon aus, dass die Angaben und Informationen in diesem Werk zum Zeitpunkt der Veröffentlichung vollständig und korrekt sind. Weder der Verlag noch die Autoren oder die Herausgeber übernehmen, ausdrücklich oder implizit, Gewähr für den Inhalt des Werkes, etwaige Fehler oder Äußerungen.

Gedruckt auf säurefreiem und chlorfrei gebleichtem Papier

Springer Fachmedien Wiesbaden ist Teil der Fachverlagsgruppe Springer Science+Business Media (www.springer.com)

Danksagung

Zunächst möchte ich Herrn Dr. Frank Hahn für das interessante und fächerübergreifende Thema, sowie die stets gute und enge Betreuung bei der Durchführung dieser Masterarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Mike Boysen danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei den Arbeitskreisen Hahn und Kirschning möchte ich mich für die nette Aufnahme, die stete Hilfsbereitschaft und die unterhaltsamen Kaffeepausen bedanken. Ein spezieller Dank geht an meine Laborkollegen Steffen Friedrich, Nadine Kandziora, Franziska Hemmerling und Katja Hermene. Durch euch wurde der Laboralltag nie langweilig.

Gerrit Jürjens möchte ich für die große Hilfsbereitschaft bei all meinen Synthese- und Theoriefragen danken.

Für das Korrekturlesen dieser Arbeit danke ich Steffen Friedrich, Franziska Hemmerling, Gerrit Jürjens und Dr. Sascha Ceylan.

Ein großer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern, die mich während meines gesamten Studiums unterstützt haben und ohne die so ein sorgenfreies Studium nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank gilt Sascha für die große Unterstützung während dieser Arbeit und für den stetigen Rückhalt.

Gesche Berkhan

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Myxobakterien	1
1.2	Polyketidsynthasen	3
1.3	Ambruticine	7
1.3.1	Postulierter Biosyntheseweg der Ambruticine	10
1.4	Dehydratasen in Polyketid-Biosynthesewegen	13
1.5	Methyltransferasen in Polyketid-Biosynthesewegen	15
1.6	Pyransynthasen in Polyketid-Biosynthesewegen	17
2	Zielsetzung	21
3	Ergebnisse und Diskussion	23
3.1	Synthese der Testsubstrate	23
3.1.1	Retrosynthese	23
3.1.2	Synthese des Aldehyds 54	24
3.1.3	Synthese des Testsubstrats 53	30
3.1.4	Synthese des vereinfachten Testsubstrates 81	33
3.2	Biologische Arbeiten	37
3.2.1	Klonierung von ambDH3, amb6 und ambM in verschiedene Expressionsvektoren	37
3.2.2	Heterologe Expression verschiedener Fusionsproteine von AmbDH3, Amb6 und AmbM	42
3.2.3	Reinigung und Isolierung des N-terminalen His ₆ -Fusionsproteins AmbDH3	49
3.2.4	Enzymatische Umsetzung des N-terminalen His ₆ -Fusionsproteins AmbDH3	51
4	Zusammenfassung und Ausblick	57
4.1	Zusammenfassung	57
4.2	Ausblick	58
5	Biologische Methoden	61
5.1	Geräte	61
5.2	Allgemeine Hinweise	62
5.3	Bakterienstämme	62

5.4 Desoxyribonukleinsäuren	62
5.4.1 Synthetische Gene	62
5.4.2 Vektoren und rekombinante Plasmide	62
5.4.3 Oligonukleotide	63
5.5 Medien, Puffer und Nährböden	63
5.5.1 Medien und Nährböden	64
5.5.2 Puffer und Lösungen	64
5.6 Molekularbiologische Methoden	67
5.6.1 Herstellung chemisch kompetenter E. coli Zellen	67
5.6.2 Chemische Transformation von Bakterienzellen	68
5.6.3 Isolierung von Plasmid-DNA durch alkalische Lyse	68
5.6.4 Konzentrationsbestimmung von DNA	68
5.6.5 Auftrennung von DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	69
5.6.6 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und anschließende Reinigung	69
5.6.7 Ligation von DNA-Fragmenten	69
5.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)	70
5.7.1 Amplifikation der synthetischen Gene amb6, ambDH3 und ambM	70
5.7.2 Kolonie-PCR	71
5.8 Proteinbiochemische Methoden	72
5.8.1 Heterologe Proteinexpression in E. coli BL21(DE3)-Zellen	72
5.8.2 Herstellung von Ganzzellextrakten	72
5.8.3 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration nach BRADFORD	72
5.8.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	73
5.9 Proteinreinigung	73
5.9.1 Native Nickel-Affinitätschromatographie	73
5.9.2 Aufkonzentrierung	74
5.9.3 Entsalzung	74
5.10 Enzymassays	74
6 Chemische Methoden	75
6.1 Allgemeine Hinweise	75
6.2 Analytische Methoden	75
6.3 Synthese des Testsubstrats 53	76

6.4 Synthese des vereinfachten Substrates 81	83
7 Anhang	87
7.1 Plasmidkarten	87
7.2 Gensequenzen	89
7.3 Spektrenanhang	92

Abkürzungsverzeichnis

$[\alpha]_D^{20}$	Drehwert
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
ACP	<i>Acyl-Carrier-Protein</i>
Äq.	Äquivalente
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AT	Acyltransferase
BSA	Bovine serum albumin
bp	<i>base pair</i>
CoA	Coenzym A
ddH ₂ O	didestilliertes Wasser
DBU	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
DC	Dünnschichtchromatographie
DIC	<i>N,N'</i> -Diisopropylcarbodiimid
DH	Dehydratase
DHP	Dihydropyran
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektrospray-Ionisation
ER	Enoylreduktase
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Ethylacetat
g	Gramm
h	Stunde
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRMS	<i>High-Resolution Mass Spectrometry</i>
Hz	Hertz

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
J	Kopplungskonstante
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
KR	β -Ketoreduktase
KS	β -Ketoacylsynthase
L	Liter
LB	Luria Bertani
M	Molmasse/mol
m	Masse
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mM	Millimolar
MS	Massenspektrometrie
min	Minute
mol	Mol
MT	Methyltransferase
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	Petrolether
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
ppm	<i>parts per million</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel</i> <i>Electrophoresis</i>
s	Sekunde
SNAC	<i>N</i> -Acetylcysteamin
T	Temperatur
TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
TE	Thioesterase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
<i>tert</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tetrahydropyran

Tos	Tosylat
TosCl	Tosylchlorid
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	Mikromol pro Sekunde
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
V	Volt
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen