

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
3.1.2 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 His₆-Fusionsproteins AmbDH3	49
3.2.4 Enzymatische Umsetzung des N-terminalen His₆-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 <i>E. coli</i> 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 Auf trennung 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 <i>E. coli</i> 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