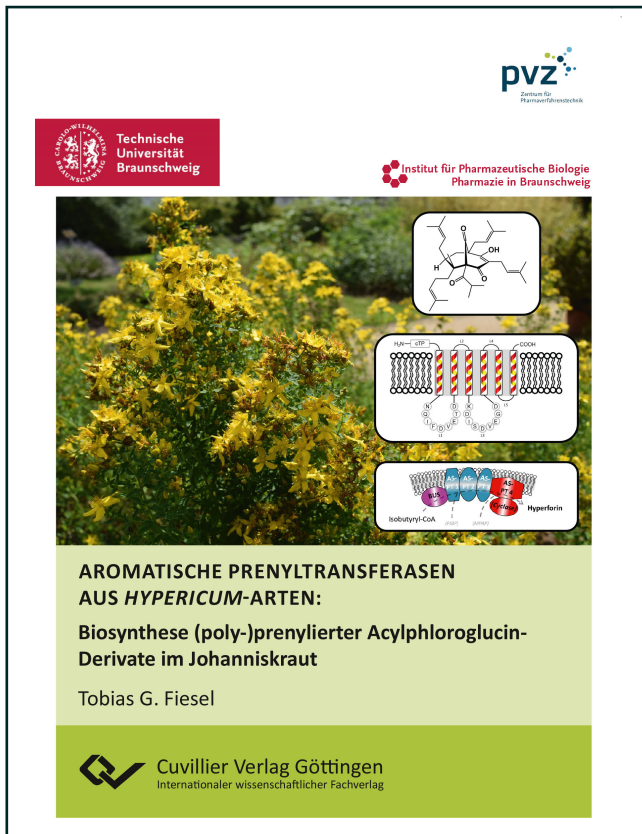




Tobias Fiesel (Autor)

Aromatische Prenyltransferasen aus *Hypericum*-Arten

Biosynthese (poly-)prenylierter Acylphloroglucin-Derivate im Johanniskraut



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7449>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



INHALTSVERZEICHNIS

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Danksagung	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung und Grundlagen	1
1.1. Pflanzliche Phloroglucin-Derivate	1
1.2. Polycyclische polyprenylierte Acylphloroglucine	3
1.2.1. Bioaktivität und wissenschaftliches Interesse	4
1.2.2. Hyperforin	7
1.2.3. Biosynthese polycyclischer polyprenylierter Acylphloroglucine	10
1.3. Prenylierende Enzyme	12
1.4. Johanniskräuter – <i>Hypericum</i>	15
1.4.1. Echtes Johanniskraut – <i>Hypericum perforatum</i> L.	16
1.4.1.1. Botanik	17
1.4.1.2. Inhaltsstoffe (Sekundärstoffe)	18
1.4.1.3. Therapeutische Verwendung von Johanniskraut	20
1.4.2. Großkelchiges Johanniskraut – <i>Hypericum calycinum</i> L.	21
2 Zielsetzung	22
3 Materialien	23
3.1. Geräte und Hilfsmittel	23
3.2. Chemikalien, (Bio-)Reagenzien und Enzyme	25
3.3. Reagenzsysteme	26
3.4. Puffer und Lösungen	26
3.5. Pflanzen (-zellkultur)	28
3.6. Klonierungs- und Expressionsorganismen	28
3.7. (Zell-)Kulturmedien	29
3.8. DNA: Oligonukleotide und Plasmide	30
3.9. Verwendete Software und Online-Tools	34
4 Methoden	35
4.1. Kultivierung und Elicitor-Behandlung von Zellsuspensionskulturen	35
4.2. Chemische Synthesen	35
4.2.1. Synthese von Dimethylallyldiphosphat	35
4.2.2. Synthese von Phlorisobutyrophenon	36
4.2.3. Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	37
4.3. Molekularbiologische Untersuchung von Prenyltransferase-Genen	39
4.3.1. Transkriptom-Analysen	39
4.3.2. Extraktion von Gesamt-RNA	41
4.3.2.1. RNA-Extraktion mit kommerziellen Kits	41
4.3.2.2. RNA-Extraktion mit TRIzol®-Reagenz	41
4.3.2.3. RNA-Extraktion mittels Lithiumchlorid-Fällung	42
4.3.3. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	42
4.3.4. cDNA-Synthese durch reverse Transkription	43
4.3.4.1. Reverse Transkription	43
4.3.4.2. Reverse Transkription für RACE-geeignete cDNA	43



4.3.5.	Polymerase-Kettenreaktion	44
4.3.5.1.	<i>Standard-PCR</i>	45
4.3.5.2.	<i>Proofread-PCR</i>	45
4.3.5.3.	<i>Touchdown-PCR</i>	46
4.3.5.4.	<i>Verlängerung von cDNA-Fragmenten: RACE-PCR</i>	47
4.3.6.	Agarose-Gelelektrophorese	47
4.3.6.1.	<i>DNA-Gelelektrophorese</i>	47
4.3.6.2.	<i>RNA-Gelelektrophorese</i>	48
4.3.6.3.	<i>Isolierung von DNA aus Agarose-Trenngelen</i>	48
4.3.7.	Ligations-Vorbereitungen und Ligation von DNA	48
4.3.7.1.	<i>T/A-Klonierung</i>	48
4.3.7.2.	<i>Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA</i>	48
4.3.7.3.	<i>Dephosphorylierung von DNA</i>	49
4.3.7.4.	<i>Ligation von DNA</i>	49
4.3.8.	Transformation (Bakterien und Hefe)	51
4.3.8.1.	<i>Präparation chemisch kompetenter Bakterien</i>	51
4.3.8.2.	<i>Transformation chemisch kompetenter Bakterien</i>	51
4.3.8.3.	<i>Präparation kompetenter Hefezellen</i>	52
4.3.8.4.	<i>Transformation kompetenter Hefezellen</i>	52
4.3.9.	Anzucht und Lagerung als Dauerkulturen	52
4.3.9.1.	<i>Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von E. coli</i>	52
4.3.9.2.	<i>Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von S. cerevisiae</i>	53
4.3.10.	Extraktion von Plasmid-DNA	53
4.3.10.1.	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	53
4.3.10.2.	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae</i>	54
4.3.11.	DNA-Sequenzierung und Auswertung	54
4.3.12.	Phylogenie	54
4.4.	Proteinexpression	54
4.4.1.	Proteinexpression in Hefezellen	55
4.4.1.1.	<i>Kultivierung von genetisch modifizierten Hefezellen</i>	55
4.4.1.2.	<i>Induktion von Hefezellen</i>	55
4.4.2.	Proteinexpression im Insektenzell-Baculovirus-System	55
4.4.2.1.	<i>Kultivierung von Sf9-Zellen</i>	55
4.4.2.2.	<i>Herstellung von rekombinanten Bacmiden</i>	56
4.4.2.3.	<i>Herstellung von rekombinanten Baculoviren</i>	56
4.4.2.4.	<i>Infektion von Insektenzellen</i>	57
4.5.	Biochemische Methoden	57
4.5.1.	Proteinextraktion aus Hefezellen	57
4.5.2.	Proteinextraktion aus Insektenzellen	57
4.5.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	58
4.5.4.	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen	58
4.5.5.	<i>In vitro</i> -Aktivitätsuntersuchungen	59
4.5.5.1.	<i>Charakterisierung der Prenyltransferase HcPT aus H. calycinum-Zellsuspensionskulturen</i>	61
4.5.5.2.	<i>Enzymatische Synthese von 1,3,6,7-TH8PX für die NMR-Spektroskopie</i>	61
4.6.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	62
4.7.	Analytik mittels Flüssigchromatographie	63
4.7.1.	Verwendete Fließmittel-Systeme	63
4.7.2.	Semipräparative Isolierung von 1,3,6,7-TH8PX	63
4.8.	Analytik mittels Massenspektrometrie	64
4.9.	Analytik mittels Kernspinresonanzspektroskopie	64

5	Ergebnisse	65
5.1.	Chemische Synthesen	65
5.1.1.	Synthese von Dimethylallyldiphosphat	65
5.1.2.	Synthese von Phlorisobutyrophenon	66
5.1.3.	Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	68
5.2.	(Bioinformatische) Vorab-Charakterisierung von Prenyltransferase-Genen	71
5.2.1.	Überlassene Prenyltransferase-Sequenzen aus vorherigen Arbeiten	71
5.2.2.	Prenyltransferase-Sequenzen aus vier analysierten <i>H. perforatum</i> -Transkriptomen	72
5.2.3.	Pflanzliche aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen: Aufbau und Eigenschaften	73
5.2.3.1.	<i>Generelle Proteinstruktur der AS-PTs aus Johanniskraut</i>	73
5.2.3.2.	<i>Vorhergesagte Struktur-Charakteristika von AS-PTs aus Johanniskraut</i>	76
5.2.3.3.	<i>Subzelluläre Lokalisierung von HcPT-2</i>	79
5.2.3.4.	<i>Phylogenetische Untersuchung von AS-PTs aus Johanniskraut</i>	80
5.3.	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial	82
5.4.	Klonierung von Prenyltransferase-Genen	84
5.4.1.	Prenyltransferase HcPT	85
5.4.2.	Prenyltransferase HcPT-1	85
5.4.3.	Prenyltransferase HcPT-2 und Varianten	86
5.4.3.1.	<i>Klonierung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen</i>	86
5.4.3.2.	<i>Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen</i>	87
5.4.3.3.	<i>Fluoreszenzmarkierung von HcPT-2 und HcPT-2_oT</i>	88
5.4.4.	Prenyltransferase HpPT-1 und eine Variante	89
5.4.4.1.	<i>Entwurf degenerierter Primer anhand konservierter PT-Motive</i>	89
5.4.4.2.	<i>Klonierung der Volllänge-PT HpPT-1 für Expressionsuntersuchungen</i>	90
5.4.4.3.	<i>Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen</i>	92
5.4.5.	Prenyltransferase HpPT-2	92
5.4.6.	Prenyltransferase HpPT-3	93
5.4.7.	Prenyltransferase HpPT-4	94
5.4.8.	Prenyltransferase HpPT-5	95
5.4.9.	Prenyltransferase HpPT-6	96
5.4.10.	Prenyltransferase HpPT-7	97
5.4.11.	Prenyltransferase HpPT-8	98
5.4.12.	Prenyltransferase HpPT-9	98
5.5.	Expressionsanalyse von Prenyltransferasen	99
5.5.1.	Prenyltransferase-Expressionssysteme	99
5.5.2.	Versuche der Expressionskontrolle durch denaturierende Protein-Gelelektrophorese	100
5.6.	Qualitativer Nachweis rekombinanter Prenyltransferase-Aktivität	101
5.6.1.	Ausbleibende Aktivität in Hefezellen	101
5.6.2.	Prenyltransferase-Aktivität in Insektenzellen	101
5.6.3.	Aktive HcPT aus Sf9-Zellen	103
5.6.3.1.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes als 1,3,6,7-TH8PX</i>	103
5.6.3.2.	<i>Charakterisierung der rekombinanten HcPT</i>	106
5.6.3.3.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes „P2“ als Patulon</i>	109
5.6.3.4.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,7-THX</i>	112
5.6.3.5.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,5,6-THX</i>	113
5.6.4.	Aktive HcPT-1 aus Sf9-Zellen	114
5.6.5.	Aktive HcPT-2 aus Sf9-Zellen	114
5.6.6.	Aktive HpPT-1 aus Sf9-Zellen	117
5.6.7.	Aktive HpPT-2 und HpPT-6 aus Sf9-Zellen	117



5.6.7.1.	Aktivitätsnachweis von HpPT-2 mit PIBP und Strukturanalyse des Produktes „P2“	118
5.6.7.2.	Aktivitätsnachweis von HpPT-6 mit dem monogerynylierten Produkt von HpPT-2	121
5.6.8.	Aktive HpPT-5 aus Sf9-Zellen	123
5.6.9.	Aktive HpPT-8 aus Sf9-Zellen	124
6	Diskussion	126
6.1.	Aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen	126
6.2.	Heterologe Expression membranassoziierter Prenyltransferasen	130
6.3.	Aktivität aromatischer Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen aus Johanniskraut-Arten	135
6.3.1.	Die Hyperforin-Biosynthese	135
6.3.2.	Xanthon-spezifische Prenyltransferasen	141
7	Zusammenfassung und Ausblick	150
8	Verzeichnisse / Auflistungen	152
8.1.	Abkürzungen	152
8.2.	Abbildungen	156
8.3.	Formeln	157
8.4.	Tabellen	158
9	Literatur	159
10	Anhang	177
10.1.	DC-Dokumentation	177
10.1.1.	Cellulose-DC-Fertigplatten der Synthese von DMAPP	177
10.1.2.	Kieselgel-DC-Fertigplatten der Aufreinigung von 1,3,6,7-THX	177
10.2.	Prenyltransferase-Sequenzen	178
10.3.	Alignment aller AS-PT-Sequenzen aus Johanniskraut und publizierter pflanzlicher AS-PTs	179
10.4.	Zusätzliche Analytik-Daten	180
10.4.1.	HPLC-Untersuchung von Elicitor-behandelten <i>H. calycinum</i> -Zellsuspensionskulturen	180
10.4.2.	MS-Untersuchung der Referenzsubstanz Patulon aus <i>H. calycinum</i> -Zellsuspensionskulturen	181
10.4.3.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HcPT-1	182
10.4.4.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-1	182
10.4.5.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-5	183
10.4.6.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-8	184