



Eline Biedermann (Autor)  
**Untersuchungen zur Charakterisierung von Prenyltransferasen aus *Hypericum*-Arten nach Expression in *Nicotiana benthamiana***



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7653>

Copyright:

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

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



# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Bedeutung und Nutzung von sekundären Pflanzenstoffen.....	1
1.2. Gewinnung von Wirkstoffen aus Arzneipflanzen.....	1
1.3. Homologe und heterologe in vitro-Systeme zur Produktion von pflanzlichen Wirkstoffen.....	3
1.4. Johanniskraut als moderne Arzneipflanze.....	6
1.4.1. Inhaltsstoffe und Bedeutung im Arzneischatz.....	6
1.4.2. Ansätze zur Gewinnung von Hyperforin.....	7
1.4.3. Biosynthese von Hyperforin.....	8
1.5. Prenylierende Enzyme in Pflanzen.....	9
1.6. Ziel der Arbeit.....	14
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1. Lösungen, Medien und Puffer.....	15
2.1.2. Substrate für Enzymaktivitätstests.....	19
2.1.2.1. Prenylakzeptoren und -donoren.....	19
2.1.2.2. Vergleichssubstanzen für prenylierte Verbindungen.....	19
2.2. Organismen.....	20
2.2.1. Bakterien.....	20
2.2.2. Pflanzenmaterial.....	20
2.2.2.1. <i>Hypericum perforatum</i> .....	20
2.2.2.2. Zellsuspensionskultur von <i>Hypericum calycinum</i> .....	20
2.2.2.3. <i>Nicotiana benthamiana</i> .....	20
2.3. Vektoren und cDNAs.....	21
2.4. Oligonukleotide.....	22
2.5. Mikrobiologische Methoden.....	25
2.5.1. Erzeugung kompetenter <i>E. coli</i> .....	25
2.5.2. Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....	25
2.5.3. Erzeugung elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> .....	25
2.5.4. Transformation elektrokompenter <i>A. tumefaciens</i> .....	26
2.5.5. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse).....	26
2.5.6. Isolation von Gesamt-DNA aus <i>A. tumefaciens</i> .....	26
2.5.7. Bestimmung der DNA Konzentration.....	27
2.5.8. Kryokonservierung von Bakterien.....	27
2.6. Molekularbiologische Methoden.....	27
2.6.1. Isolation von RNA.....	27
2.6.1.1. RNA-Isolationskits.....	27
2.6.1.2. Lithiumchlorid-Methode.....	27
2.6.2. Analyse der RNA.....	28
2.6.3. DNase-Verdau.....	28
2.6.4. Reverse Transkription.....	28



2.6.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.6.6.	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR).....	30
2.6.6.1.	Durchführung der qPCR .....	30
2.6.6.2.	Auswertung der qPCR .....	31
2.6.7.	Klonierungstechniken.....	32
2.6.7.1.	USER-Technik .....	32
2.6.7.2.	Klonierung in pGEM-T-easy Vektor.....	32
2.6.7.3.	Blau-Weiß-Selektion .....	32
2.6.8.	Restriktionsverdau .....	33
2.6.9.	Agarosegelelektrophorese .....	33
2.6.10.	Aufreinigung von Produkten aus dem Agarosegel .....	33
2.6.11.	Sequenzierung.....	33
2.7.	Biochemische Methoden.....	34
2.7.1.	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i> .....	34
2.7.2.	Chloroplasten-Isolation .....	34
2.7.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	34
2.7.4.	Nachweis der Prenyltransferase-Aktivität <i>in vitro</i> .....	35
2.7.5.	Nachweis der Prenyltransferase-Aktivität <i>in planta</i> .....	35
2.8.	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie.....	36
2.9.	Analytische Methoden.....	36
2.9.1.	Gehaltsbestimmung von Hyperforin.....	36
2.9.2.	Massenspektrometrie.....	36
2.9.3.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	37
2.10.	Bioinformatische Methoden.....	38
3.	<b>Ergebnisse</b> .....	39
3.1.	Identifizierung von cDNAs von Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten.....	39
3.1.1.	Klonierung und Sequenzbestätigung der Prenyltransferasen .....	39
3.1.2.	Datenbankinformationen und Strukturvorhersagen zu den identifizierten Prenyltransferasen .....	40
3.1.3.	Erstellung von Expressionskonstrukten .....	44
3.2.	Subzelluläre Lokalisation der Prenyltransferasen nach Expression in <i>N. benthamiana</i> .....	45
3.2.1.	Subzelluläre Lokalisation des YFP (Kontrolle).....	45
3.2.2.	Subzelluläre Lokalisation von HcPT-1 in Fusion mit YFP.....	46
3.2.3.	Subzelluläre Lokalisation von HcPT-2 in Fusion mit YFP.....	47
3.2.4.	Subzelluläre Lokalisation von HcPT-3 in Fusion mit YFP.....	48
3.2.5.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-1A und HpPT-1B in Fusion mit YFP.....	49
3.2.6.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-2 in Fusion mit YFP .....	51
3.2.7.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-3 in Fusion mit YFP .....	52
3.2.8.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-4 in Fusion mit YFP .....	53
3.2.9.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-5 in Fusion mit YFP .....	54
3.2.10.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-6 in Fusion mit YFP .....	55
3.2.11.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-7 in Fusion mit YFP .....	56
3.2.12.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-8A und HpPT-8B in Fusion mit YFP .....	57
3.2.13.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-9A und HpPT-9B in Fusion mit YFP .....	59
3.3.	Prenyltransferase-Aktivität nach Expression von cDNAs aus <i>Hypericum</i> -Arten in <i>N. benthamiana</i> .....	61
3.3.1.	Auswahl eines geeigneten Protokolls zur Aufarbeitung von transformierten Blättern von <i>N. benthamiana</i> für <i>in vitro</i> -Enzymaktivitätstests .....	61
3.3.2.	Funktionelle Expression der Prenyltransferasen in <i>N. benthamiana</i> .....	61



3.3.3.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-1 .....	62
3.3.3.1.	HcPT-1 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	62
3.3.3.2.	HcPT-1 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	63
3.3.3.3.	HcPT-1 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	64
3.3.4.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-2 .....	65
3.3.4.1.	HcPT-2 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	65
3.3.4.2.	HcPT-2 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	66
3.3.4.3.	HcPT-2 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	67
3.3.5.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-3 .....	69
3.3.5.1.	HcPT-3 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	69
3.3.5.2.	HcPT-3 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	70
3.3.5.3.	HcPT-3 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	71
3.3.5.4.	HcPT-3 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und GPP .....	73
3.3.6.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-1A und HpPT-1B .....	74
3.3.6.1.	HpPT-1A und HpPT-1B mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	74
3.3.6.2.	HpPT-1A und HpPT-1B mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	75
3.3.6.3.	HpPT-1A und HpPT-1B mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	76
3.3.7.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-2 .....	77
3.3.7.1.	HpPT-2 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	77
3.3.7.2.	HpPT-2 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	78
3.3.7.3.	HpPT-2 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	79
3.3.7.4.	HpPT-2 mit Phlorisobutyrophenon und GPP .....	80
3.3.8.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-3 .....	82
3.3.8.1.	HpPT-3 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	82
3.3.8.2.	HpPT-3 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	83
3.3.8.3.	HpPT-3 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	84
3.3.9.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-4 .....	85
3.3.9.1.	HpPT-4 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	85
3.3.9.2.	HpPT-4 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	86
3.3.9.3.	HpPT-4 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	87
3.3.10.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-5 .....	88
3.3.10.1.	HpPT-5 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	88
3.3.10.2.	HpPT-5 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	89
3.3.10.3.	HpPT-5 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	90
3.3.11.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-6 .....	91
3.3.11.1.	HpPT-6 mit Phlorisobutyrophenon mit DMAPP .....	91
3.3.11.2.	HpPT-6 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	92
3.3.11.3.	HpPT-6 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	93
3.3.11.4.	HpPT-6 mit Phlorisobutyrophenon und GPP .....	94
3.3.12.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-7 .....	95
3.3.12.1.	HpPT-7 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	95
3.3.12.2.	HpPT-7 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	96
3.3.12.3.	HpPT-7 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	97
3.3.13.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-8A und HpPT-8B .....	98
3.3.13.1.	HpPT-8A und HpPT-8B mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	98
3.3.13.2.	HpPT-8A und HpPT-8B mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	99
3.3.13.3.	HpPT-8A und HpPT-8B mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	100
3.3.14.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-9A und HpPT-9B .....	101
3.3.14.1.	HpPT-9A und HpPT-9B mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP .....	101
3.3.14.2.	HpPT-9A und HpPT-9B mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP .....	102
3.3.14.3.	HpPT-9A und HpPT-9B mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP .....	103



3.3.15.	<i>in vitro</i> -Produktbildung bei Kombination von Prenyltransferasen .....	104
3.3.15.1.	Umsetzung von Phlorisobutyrophenon mit DMAPP und GPP durch HpPT-2 und HpPT-6.....	104
3.3.15.2.	Kombination von HcPT-1, HcPT-2, HcPT-3 aus <i>H. calycinum</i> .....	106
3.3.15.3.	Kombination der neun Prenyltransferasen aus <i>H. perforatum</i> .....	109
3.3.16.	Aktivität von Prenyltransferasen <i>in planta</i> .....	112
3.4.	Expressionsanalyse von Prenyltransferasen .....	113
3.4.1.	Genexpression in Zellsuspensionskulturen von <i>H. calycinum</i> .....	113
3.4.2.	Genexpression in <i>H. perforatum</i> .....	115
3.5.	Hyperforingehalt in <i>H. perforatum</i> .....	118
4.	<b>Diskussion</b> .....	119
4.1.	<i>Hypericum</i> -Arten verfügen über eine Vielzahl an Prenyltransferase-Genen .....	119
4.2.	Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten sind an der äußeren Chloroplastenmembran lokalisiert. ....	120
4.3.	Zehn Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten katalysieren die Prenylierung oder Geranylierung von Phlorisobutyrophenon- oder Xanthonderivaten .....	122
4.4.	Erfolgt die Biosynthese von Hyperforin durch einen Enzymkomplex? .....	129
4.5.	Perspektiven.....	131
5.	<b>Zusammenfassung</b> .....	133
	Literaturverzeichnis .....	135
	Anhang .....	147
A1.	Vektorkarten .....	147
A2.	Sequenzalignments.....	148
A3.	Nachweis der Expressionskonstrukte in <i>A. tumefaciens</i> .....	152
A4.	Betrachtung mehrerer Ebenen von Chloroplasten zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Prenyltransferasen.....	153
A5.	Kokalisation zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Prenyltransferasen .....	153
A6.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-3 bei Vorliegen eines Strep-Tag- oder YFP- Fusionsproteins .....	157
A7.	Code des Statistikpaketes R für den Boxplot zur Darstellung des Vergleiches der CT-Werte der Referenzgene 18S-RNA, Aktin, Histon und Tubulin. ....	159
A8.	Erzeugung stabiler Überexpressionslinien in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	160