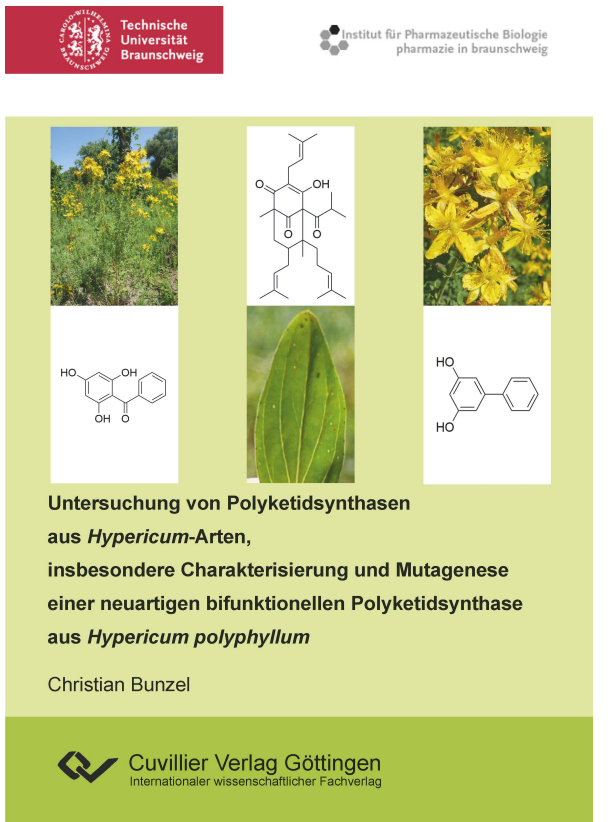




Christian Bunzel (Autor)

Untersuchung von Polyketidsynthesen aus *Hypericum*-Arten, insbesondere Charakterisierung und Mutagenese einer neuartigen bifunktionellen Polyketidsynthase aus *Hypericum polyphyllum*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8399>

Copyright:

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

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

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Johanniskräuter – <i>Hypericum</i>.....	1
1.1.1 Echtes Johanniskraut – <i>Hypericum perforatum</i> L.	1
1.1.2 Polster-Johanniskraut – <i>Hypericum polyphyllum</i>	6
1.2 Polyketidsynthesen	8
1.2.1 Typ I Polyketidsynthesen.....	9
1.2.2 Typ II Polyketidsynthesen.....	9
1.2.3 Typ III Polyketidsynthesen.....	10
1.2.4 Chalkonsynthese-artige Typ III Polyketidsynthesen.....	12
1.2.4.1 Struktur und Mechanismus der Chalkonsynthase	12
1.2.4.2 Benzophenonsynthesen.....	15
1.2.4.3 Polyprenylierte Benzophenone und polyprenylierte Xanthone.....	16
1.2.5 Stilbensynthese-artige Typ III Polyketidsynthesen.....	19
1.2.5.1 Struktur und Mechanismus der Stilbensynthese.....	19
1.2.5.2 Biphenylsynthesen.....	20
1.2.6 Methylierte Polyketide	21
1.3 Ziele der Arbeit.....	23
2. Material	24
2.1 Oligonukleotide	24
2.2 Organismen	28
2.3 Vektoren	28
2.4 Kulturmedien.....	29
2.5 Substrate	29
2.6 Referenzsubstanzen	30
2.7 Nachweisreagenz für die Dünnschichtchromatographie.....	30
2.8 Verwendete Software.....	31
3. Methoden.....	32
3.1 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.1.1 RNA-Isolation	32
3.1.2 RNA- und DNA-Analyse	32

3.1.3	Reverse Transkription	32
3.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
3.1.4.1	Standard-PCR.....	33
3.1.4.2	<i>Touchdown</i> -PCR.....	34
3.1.4.3	Verlängerung von cDNA-Fragmenten: RACE-PCR.....	36
3.1.5	Ortsgerichtete Mutagenese	36
3.1.6	Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) zur Genexpressionsanalyse	37
3.1.6.1	Durchführung	37
3.1.6.2	Primereffizienz	38
3.1.6.3	Genexpression.....	38
3.1.7	Agarose-Gelelektrophorese.....	38
3.1.8	Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen	39
3.1.9	Restriktionsverdau.....	40
3.1.10	Dephosphorylierung linearisierter Expressionsplasmide.....	40
3.1.11	Ligation	41
3.1.12	Sequenzierung	41
3.1.13	Phylogenetische Analyse	41
3.2	Mikrobiologische Methoden	42
3.2.1	Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	42
3.2.2	Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	42
3.2.3	Plasmidisolation durch alkalische Lyse aus <i>E. coli</i>	42
3.2.4	Kryokonservierung von <i>E. coli</i>	43
3.3	Biochemische Methoden	44
3.3.1	Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> und Zellernte	44
3.3.2	Zellaufschluss und Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC).....	44
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
3.3.4	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	47
3.3.5	Nachweis der Typ III Polyketid-Synthase-Aktivität <i>in vitro</i>	47
3.3.5.1	Aktivitätsnachweis mittels Proteinrohextrakt aus <i>E. coli</i>	48
3.3.5.2	Aktivitätsnachweis mittels Proteinrohextrakt aus Pflanzen	48
3.3.5.3	Aktivitätsnachweis mittels aufgereinigten Proteins	49
3.3.5.4	Funktionelle Charakterisierung der bifunktionellen Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i>	49
3.3.5.5	Enzymatische Synthese von Produkten unter Verwendung von Methylmalonyl-Coenzym A als Extender.....	51
3.3.6	Extraktion von Biphenylen aus <i>H. polyphyllum</i>	51

3.4 Chemische Synthesen	52
3.4.1 Malonyl-Coenzym A	52
3.4.2 Diketidyl-NAC (S-(2-Acetamidoethyl)4-methyl-3-oxopentanthioat)	53
3.4.3 Triketidyl-NAC (S-(2-acetamidoethyl)2,6-dimethyl-3,5-dioxoheptanthioat).....	54
3.5 Analytische Methoden	57
3.5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	57
3.5.2 Semipräparative Isolierung von enzymatischen Produkten unter Verwendung von Methylmalonyl-CoA als Extender	58
3.5.3 Massenspektrometrie (MS)	59
3.5.4 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS)	61
3.5.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS).....	62
3.5.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR).....	63
4. Ergebnisse	64
4.1 Chemische Synthesen	64
4.1.1 Synthese von Malonyl-CoA	64
4.1.2 Synthese des Diketidyl-NAC (S-(2-Acetamidoethyl)4-methyl-3-oxopentanthioat)	65
4.1.3 Synthese des Triketidyl-NAC (S-(2-Acetamidoethyl)2,6-dimethyl-3,5-dioxoheptanthioat)	69
4.2 Polyketidsynthesen aus <i>H. polyphyllum</i>	74
4.2.1 Klonierung der Polyketidsynthase-cDNAs	74
4.2.2 Qualitativer <i>in vitro</i> Aktivitätsnachweis rekombinanter Polyketidsynthesen	76
4.2.2.1 Aktivität der PKS006	76
4.2.2.2 Aktivität der bifunktionellen Polyketidsynthase	80
4.2.2.3 Aktivität weiterer Polyketidsynthesen	82
4.2.3 Massenspektrometrische Aufklärung der enzymatischen Produkte unter Verwendung von Methylmalonyl-CoA als Extendersubstrat.....	84
4.2.4 Aktivitätsnachweis von Polyketidsynthesen mit Methylmalonyl-CoA mittels Proteinrohextrakt aus Pflanzen	88
4.3 Bifunktionelle Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i>	89
4.3.1 Funktionelle Charakterisierung	89
4.3.2 Genexpressionsanalyse	98
4.3.3 Detektion von Biphenylen aus <i>H. polyphyllum</i> -Extrakten	98

4.3.4 Ortsgerichtete Mutagenese	100
4.3.4.1 Auswahl aussichtsreicher Aminosäuren zur Mutation.....	100
4.3.4.2 Einzelmutationen	100
4.3.4.3 Doppelmutationen	104
4.3.4.4 Dreifachmutationen.....	106
4.3.5 Bestimmung der kinetischen Parameter der Doppelmutante S129T/V211M	107
4.4 Genexpressionsanalysen von Typ III Polyketidsynthasen aus <i>H. perforatum</i>	109
4.4.1 Bioinformatische Vorabauswahl	109
4.4.2 Genexpressionsanalyse	110
5. Diskussion	112
5.1 Hypothese zur Biosynthese von Hyperpolyphyllirin in <i>H. polyphyllum</i>.....	112
5.2 Bifunktionelle Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i>.....	115
5.2.1 Einordnung der bifunktionellen Polyketidsynthase als Benzoyl-CoA- spezifische Typ III Polyketidsynthase	115
5.2.2 Mutagenesen zur Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen für die verschiedenen Kondensationsmechanismen im aktiven Zentrum.....	117
5.2.3 Funktionelle Charakterisierung der bifunktionellen Polyketidsynthase.....	119
5.2.3.1 Einfluss verschiedener Kationen und Anionen auf die Aktivität	119
5.2.3.2 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Aktivität und das Produktverhältnis von 2,4,6-Trihydroxybenzophenon und 3,5-Di- hydroxybiphenyl.....	120
5.2.3.3 Substratspezifität	121
5.2.3.4 Kinetische Parameter der bifunktionellen Polyketidsynthase sowie ihrer S129T/V211M Doppelmutante	122
5.3 Genexpression von Typ III Polyketidsynthasen aus <i>H. perforatum</i>	123
5.4 Ausblick.....	125
6. Zusammenfassung.....	127
7. Literatur	129

8. Anhang	142
8.1 Polyketidsynthese-Sequenzen.....	142
8.1.1 Polyketidsynthese-Sequenzen für die Genexpressionsanalyse in <i>H. perforatum</i>	142
8.1.2 Polyketidsynthese-Sequenzen aus <i>H. polyphyllum</i>	144
8.1.3 Proteinsequenzen des phylogenetischen Verwandtschaftsbaums.....	149
8.2 Alignment der Proteinsequenzen von BF-PKS mit HaBPS, HsBPS, MdBIS3 und SaBIS.....	155
8.3 Zusätzliche Analytik-Daten.....	156
8.3.1 HPLC-Untersuchung der bifunktionellen Polyketidsynthese mit Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA.....	156
8.3.2 HPLC-Untersuchung der PKS006 und der bifunktionellen Polyketidsynthese aus <i>H. polyphyllum</i> mit den Extendersubstraten Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA und der Kombination aus Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA.....	157
8.3.2.1 HPLC-Untersuchung der PKS006.....	157
8.3.2.2 HPLC-Untersuchungen der bifunktionellen Polyketidsynthese.....	160
8.3.3 Gaschromatogramm des Alkan-Gemisches	163