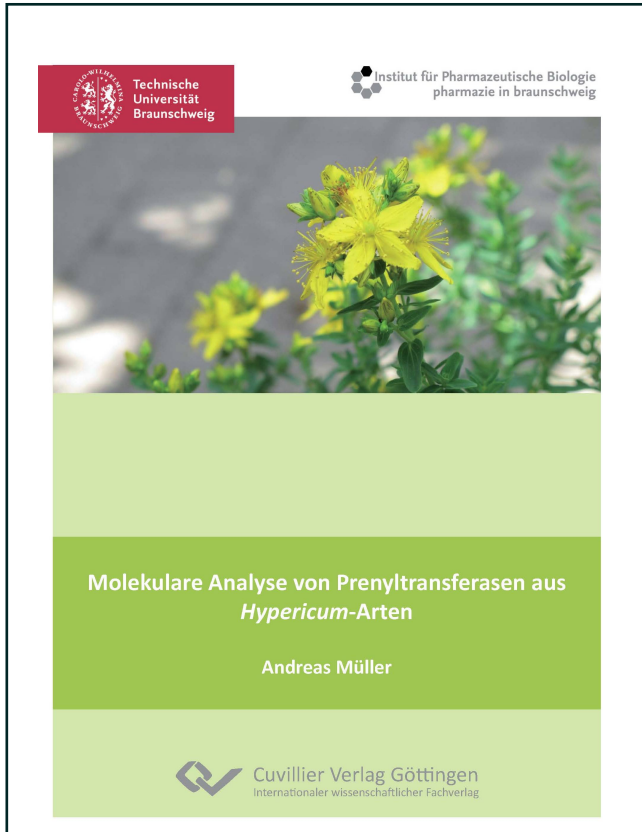




Andreas Müller (Autor)  
**Molekulare Analyse von Prenyltransferasen aus  
Hypericum-Arten**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/6355>

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

I	Einleitung.....	1
1	Johanniskraut .....	1
2	Depression .....	2
3	Johanniskraut ( <i>Hypericum</i> ).....	3
3.1	<i>Hypericum perforatum</i> L.....	4
3.2	<i>Hypericum calycinum</i> L.....	4
4	Inhaltsstoffe.....	5
4.1	Inhaltsstoffe von <i>Hypericum perforatum</i> L. ....	5
4.1.1	Flavonoide .....	5
4.1.2	Naphthodianthrone .....	7
4.1.3	Prenylierte Phloroglucinolderivate .....	9
4.1.4	Xanthone .....	11
4.1.5	Weitere Inhaltsstoffe .....	13
4.2	Inhaltsstoffe von <i>Hypericum calycinum</i> L.....	13
5	Hyperforin.....	13
5.1	Die Pharmakologie von Hyperforin .....	13
5.1.1	Antibakterielle Eigenschaften .....	14
5.1.2	Antitumorale Eigenschaften .....	14
5.1.3	Antientzündliche Eigenschaften.....	14
5.1.4	Antiproliferative Eigenschaften .....	14
5.1.5	Antidepressive Wirksamkeit .....	15
5.2	Biosynthese von Hyperforin .....	17
6	Ziel der Arbeit .....	18
II	Material .....	20
1	Biologisches Material .....	20
1.1	Pflanzenmaterial.....	20
1.2	Zellkulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	20
1.3	Bakterien und Hefen .....	21
1.3.1	Bakterienstämme .....	21
1.3.2	Hefestämme.....	21
1.4	Plasmide .....	21
1.5	Bacterial Artificial Chromosome (BAC).....	21



1.6	Enzyme .....	22
2	Kits für die Molekularbiologie .....	23
3	Nukleinsäuren und Nukleotide.....	23
3.1	Oligonukleotide .....	23
3.1.1	Degenerierte Oligonukleotide.....	24
3.1.2	Spezifische Oligonukleotide .....	25
3.1.3	Diverse Oligonukleotide.....	26
4	Chemikalien und Reagenzien .....	28
4.1	Auflistung der Chemikalien und Reagenzien.....	28
4.2	Weitere Chemikalien .....	30
4.3	Größenstandards.....	30
5	Kulturmedien, Lösungen und Puffer .....	31
5.1	Kulturmedien.....	31
5.2	Lösungen und Puffer .....	33
5.3	Lösungen und Puffer für die Synthese .....	37
6	Geräte.....	38
7	Software und Onlinetools.....	40
III	Methoden.....	41
1	Zellkulturen.....	41
1.1	Elicitor-Behandlung der Zellsuspensionskulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	41
2	Extraktionen .....	41
2.1	Extraktion eines prenylierten Xanthons nach Zodi (2011).....	41
2.2	Extraktion eines prenylierten Xanthons aus <i>Hypericum calycinum</i> zur Identifikation .....	42
2.2.1	Isolation des Rohextraktes.....	42
2.2.2	Herstellung des Trockenextraktes und Isolation des prenylierten Xanthons.....	42
2.2.3	Aufreinigung des prenylierten Xanthons durch semipräparative HPLC .....	43
3	Synthesemethoden .....	43
3.1	Synthese von Dimethylallylpyrophosphat.....	43
3.1.1	Vorbereitung der Aufreinigung von Dimethylallylpyrophosphat .....	44
3.1.2	Aufreinigung von Dimethylallylpyrophosphat nach der Synthese.....	44
3.1.3	Untersuchung auf DMAPP .....	45
4	Molekularbiologische Methoden .....	46



4.1	RNA-Extraktion .....	46
4.1.1	RNA-Extraktion aus Zellsuspensionskulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	46
4.1.2	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial von <i>Hypericum perforatum</i> .....	46
4.2	DNA-Extraktion aus <i>Hypericum perforatum</i> .....	47
4.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	48
4.4	Reverse Transkription.....	48
4.4.1	Reverse Transkription für das Entdecken neuer Fragmente und die 3'-RACE.....	49
4.4.2	Reverse Transkription für die 5'-Race .....	49
4.4.3	Tailing der cDNA mittels terminaler Desoxynukleotid Transferase (TdT).....	51
4.5	Polymerase Chain Reaction (PCR) .....	51
4.5.1	PCR mit Polymerasen, die 3'-5'-Exonukleaseaktivität aufweisen .....	53
4.5.2	RT-PCR.....	54
4.5.3	Nested PCR.....	54
4.5.4	Touch-down-PCR.....	54
4.5.5	PCR mit Zusätzen.....	55
4.5.6	RACE .....	55
4.5.7	TATA-Box-Primer nach Guo et al. (2011) .....	56
4.6	DNA-Gelelektrophorese .....	57
4.7	Semiquantitative RT-PCR der in <i>Hypericum calycinum</i> gefundenen Orfs.....	58
4.8	Semiquantitative RT-PCR des in <i>Hypericum perforatum</i> gefundenen Orfs .....	58
4.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....	58
4.10	Restriktionsverdau von DNA mittels Restriktionsendonukleasen .....	58
4.10.1	Dephosphorilierung von durch Restriktion verdauten Vektoren .....	59
4.11	Ligation .....	60
4.11.1	Klonierung in den Vektor pGEM <sup>®</sup> -T Easy.....	60
4.11.2	Klonierung in pRSET-B.....	61
4.11.3	Klonierung in pESC-URA.....	61
4.12	Transformation.....	62
4.12.1	Vorbereitung kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> .....	62
4.12.2	Transformation kompetenter Zellen von <i>E. coli</i> .....	62
4.12.3	Vorbereitung kompetenter Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	63
4.12.4	Transformation kompetenter Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	63
4.13	Herstellung von Dauerkulturen .....	64
4.13.1	Dauerkulturen von <i>Escherichia coli</i> .....	64



4.13.2	Dauerkulturen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	64
4.14	Gewinnung von Plasmid-DNA .....	64
4.14.1	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	64
4.14.2	Gewinnung von Plasmid-DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	65
4.15	Herstellung eines T-Überhangvektors.....	65
4.16	Sequenzierung.....	67
4.16.1	Sequenzierung mit dem ABI PRISM 377 .....	67
4.17	Auswertung von Sequenzendaten .....	69
4.18	Konstruktion einer subtraktiven cDNA-Bank aus <i>Hypericum calycinum</i> - Zellsuspensionskulturen.....	69
4.18.1	Screening einer subtraktiven cDNA-Datenbank aus Zellsuspensions-kulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	70
4.19	Untersuchung eines Transkriptoms von <i>Hypericum perforatum</i> (MPGR) .....	70
4.20	Messung der optischen Dichte zur Konzentrationsbestimmung von Mikroorganismen .....	71
4.21	Proteinexpression.....	71
4.21.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i> .....	71
4.21.2	Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nach Pompon et al. (1996) .....	72
4.22	Konstruktion eines Phylogenetischen Baums .....	74
4.22.1	Maximum Parsimony .....	74
4.22.2	Neighbour Joining .....	75
4.22.3	Maximum Likelihood.....	75
4.22.4	Modellwahl und Evaluation des Baumes.....	76
5	Biochemische Methoden.....	76
5.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford (1976).....	76
5.2	Denaturierende SDS-Gelelektrophorese von Proteinen .....	77
5.2.1	Denaturierende SDS-Page-Gelelektrophorese von Proteinen aus <i>E. coli</i> .....	77
5.2.2	Denaturierende SDS-Page-Gelelektrophorese von Proteinen aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	78
5.3	Enzymuntersuchungen.....	78
5.4	Fütterungsversuche an Zellkulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	79
6	Analytische Methoden .....	80
6.1	High performance liquid chromatography (HPLC) .....	80



6.2	Isolation von Sekundärstoffen für eine erste massenspektrometrische Untersuchung .....	80
6.3	Instrumentierung.....	80
6.3.1	Chromatographie im analytischen Maßstab.....	80
6.3.2	Chromatographie im semipräparativen Maßstab .....	80
6.4	Verwendete Fließmittel-Gradienten .....	81
6.4.1	Isolation eines prenylierten Xanthons aus <i>Hypericum calycinum</i> .....	81
6.4.2	HPLC-Analysen der Aktivitätsassays sowie der Extraktionen .....	81
6.5	Massenspektrometrie .....	81
6.5.1	Massenspektrometrische Messung eines prenylierten Xanthons aus <i>Hypericum calycinum</i> .....	82
6.5.2	Massenspektrometrische Messung von synthetisiertem DMAPP.....	82
6.5.3	Hochauflösende Massenspektrometrie.....	82
6.6	NMR.....	83
IV	Ergebnisse.....	84
1	Identifikation eines prenylierten Xanthons aus Zellkulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	84
1.1	Aufreinigung des prenylierten Xanthons .....	84
1.2	NMR-Untersuchung des prenylierten Xanthons .....	86
2	Synthese von Dimethylallylpyrophosphat.....	87
3	Molekularbiologische Untersuchungen .....	89
3.1	RNA-Extraktion .....	89
3.1.1	RNA-Extraktion aus Zellsuspensionskulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	89
3.1.2	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial von <i>Hypericum perforatum</i> .....	89
3.2	Vervollständigen des bekannten Fragments aus <i>Hypericum perforatum</i> .....	90
3.2.1	Vervollständigen des bekannten Fragments aus <i>Hypericum perforatum</i> mit RACE-Techniken.....	90
3.2.2	Vervollständigen des bekannten Fragments aus <i>Hypericum perforatum</i> durch Analyse eines BAC-Klons .....	91
3.3	Untersuchung einer subtraktiven cDNA-Bank aus <i>Hypericum calycinum</i> .....	91
3.3.1	Untersuchung von Contig 88.....	92
3.3.2	Untersuchung von Contig 290.....	92
3.3.3	Untersuchung von Contig 339.....	93
3.4	Untersuchung eines Transkriptoms von <i>Hypericum perforatum</i> .....	94
3.4.1	Identifikation neuer Prenyltransferase-cDNAs .....	94



3.4.2	Abgleich des Transkriptom mit den Fragmenten A, B und C.....	95
3.4.3	Untersuchung von HpPT-470 .....	95
3.5	Bioinformatische Untersuchung der gefundenen offenen Leserahmen .....	95
3.6	Semiquantitative Expressionsanalyse mittels RT-PCR .....	97
3.6.1	Untersuchung der <i>Hypericum calycinum</i> -Gene .....	97
3.6.2	Untersuchung des <i>Hypericum perforatum</i> -Gens .....	100
3.7	Erstellen von degenerierten Primern anhand der gefundenen Sequenzen aus <i>Hypericum calycinum</i> .....	102
3.8	Erstellen eines phylogenetischen Baums .....	104
3.9	Expression der HcPT-3-cDNA in Zellen von <i>E. coli</i> .....	108
3.9.1	SDS-PAGE-Analyse der Expression der HcPT-3-cDNA in <i>E. coli</i> .....	108
3.9.2	Enzymaktivitätstests mit Protein aus HcPT-3-exprimierenden <i>E. coli</i> -Zellen .....	109
3.10	Expression der HcPT-2-, HcPT-3- und HpPT-470-cDNAs in Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	110
3.10.1	Isolation von Proteinen aus Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	110
3.10.2	SDS-PAGE-Analyse der Expression der HcPT-2-, HcPT-3- und HpPT-470-cDNAs in Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	110
3.10.3	Enzymaktivitätstests mit Protein aus HcPT-2-, HcPT-3- und HpPT-470-exprimierenden Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	112
3.11	Fütterungsversuche an Zellsuspensionskulturen von <i>Hypericum calycinum</i> .....	113
3.11.1	Weitere Beobachtungen der Fütterungsversuche.....	117
V	Diskussion .....	121
1	Prenyltransferasen .....	121
1.1	Herkunft der Isopreneinheiten.....	122
1.1.1	Mevalonat-Weg.....	122
1.1.2	Desoxyxylulosephosphat-Weg .....	123
1.2	Aliphatische Prenyltransferasen .....	124
1.2.1	<i>cis</i> - und <i>trans</i> -Prenyltransferasen .....	124
1.2.2	Prenyltransferasen des Terpenstoffwechsels .....	126
1.3	Protein-Prenyltransferasen .....	127
1.4	Prenyltransferasen die funktionelle Gruppen prenylieren .....	127
1.5	Aromatische Prenyltransferasen .....	128
1.5.1	Aromatische Prenyltransferasen des Primärstoffwechsels .....	128
1.5.2	Aromatische Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels von Bakterien.....	130



1.5.3	Aromatische Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels von Pilzen.....	132
1.5.4	Aromatische Prenyltransferasen des pflanzlichen Sekundärstoffwechsels.....	134
2	Molekulare Analyse von Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Spezies .....	139
VI	Zusammenfassung.....	144
VII	Literaturverzeichnis .....	147
VIII	Anhang.....	163
1	Sequenzen .....	163
1.1	Fragment A nach Kühle (2009).....	163
1.2	Fragment B .....	164
1.2.1	Mögliches 5'-Ende von Fragment B .....	165
1.3	Fragment C .....	166
1.4	HcPT-1.....	167
1.5	HcPT-2.....	168
1.6	HcPT-3.....	169
1.7	HpPT-470 .....	170
2	Sequenzen die zur Konstruktion der phylogenetischen Bäume verwendet wurden	171
3	Vollständiges Alignment (IV.3.7) .....	173
4	Phylogenetische Bäume .....	174
4.1	NJ-JTT+G-Baum auf Basis des ClustalW-Alignments .....	174
4.2	MP-CNI-Baum auf Basis des ClustalW-Alignments .....	175
4.3	ML-JTT+F+G-Baum auf Basis des ClustalW-Alignments .....	176
4.4	NJ-PM-Baum auf Basis des Muscle-Alignments .....	177
4.5	NJ-JTT+G-Baum auf Basis des Muscle-Alignments.....	178
4.6	MP-CNI-Baum auf Basis des Muscle-Alignments .....	179
4.7	ML-JTT+F+G-Baum auf Basis des Muscle-Alignments.....	180
5	NMR-Spektren .....	181
5.1	<sup>1</sup> H-NMR.....	181
5.2	<sup>13</sup> C-NMR .....	182
5.3	DEPT.....	183
5.4	HMBC.....	184
5.5	HSQC.....	185
6	Massenspektrometrische Vermessung zwei putativer prenylierter Xanthone aus Zellkulturen von <i>Hypericum calycinum</i> , 48 h nach Elicitor-Behandlung.....	186





6.1	Peak 1 EMS im ESI-Positiv-Modus .....	186
6.2	Peak 1 EPI-MS von $m/z$ 329 im ESI-Positiv-Modus.....	186
6.3	Peak 2 EMS im ESI-Positiv-Modus .....	187
6.4	Peak 2 EPI-MS von $m/z$ 397 im ESI-Positiv-Modus.....	187
6.5	Peak 3 EMS im ESI-Positiv-Modus .....	188
6.6	Peak 3 EPI-MS von $m/z$ 397 im ESI-Positiv-Modus.....	188
6.7	Peak 3 EPI-MS von $m/z$ 415 im ESI-Positiv-Modus.....	189
6.8	Peak 3 EPI-MS von $m/z$ 465 im ESI-Positiv-Modus.....	189