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 Jentzsch-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 – *Hypericum* 15
1.4.1. Echtes Johanniskraut – *Hypericum perforatum* 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 – *Hypericum calycinum* L. 21

2 Zielsetzung 22

3 Materialien 23

3.1. Geräte und Hilfsmittel 23
3.2. Chemikalien, (Bio-)Reagenzien und Enzyme 25
3.3. Reagenziensysteme 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*

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

4.3.5. Polymerase-Kettenreaktion 44
4.3.5.1. Standard-PCR 45
4.3.5.2. Proofread-PCR 45
4.3.5.3. Touchdown-PCR 46
4.3.5.4. Verlängerung von cDNA-Fragmenten: RACE-PCR 47
4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese 47
4.3.6.1. DNA-Gelelektrophorese 47
4.3.6.2. RNA-Gelelektrophorese 48
4.3.6.3. Isolierung von DNA aus Agarose-Trenngelen 48
4.3.7. Ligations-Vorbereitungen und Ligation von DNA 48
4.3.7.1. T/A-Klonierung 48
4.3.7.2. Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA 48
4.3.7.3. Dephosphorylierung von DNA 49
4.3.7.4. Ligation von DNA 49
4.3.8. Transformation (Bakterien und Hefe) 51
4.3.8.1. Präparation chemisch kompetenter Bakterien 51
4.3.8.2. Transformation chemisch kompetenter Bakterien 51
4.3.8.3. Präparation kompetenter Hefezellen 52
4.3.8.4. Transformation kompetenter Hefezellen 52
4.3.9. Anzucht und Lagerung als Dauerkulturen 52
4.3.9.1. Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von E. coli 52
4.3.9.2. Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von S. cerevisiae 53
4.3.10. Extraktion von Plasmid-DNA 53
4.3.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli 53
4.3.10.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae 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. Kultivierung von genetisch modifizierten Hefezellen 55
4.4.1.2. Induktion von Hefezellen 55
4.4.2. Proteinexpression im Insektenzell-Baculovirus-System 55
4.4.2.1. Kultivierung von Sf9-Zellen 55
4.4.2.2. Herstellung von rekombinanten Bacmiden 56
4.4.2.3. Herstellung von rekombinanten Baculoviren 56
4.4.2.4. Infektion von Insektenzellen 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. *In vitro*-Aktivitätsuntersuchungen 59
4.5.5.1. Charakterisierung der Prenyltransferase HcPT aus H. calycinum-Zellsuspensionskulturen 61
4.5.5.2. Enzymatische Synthese von 1,3,6,7-TH8PX für die NMR-Spektroskopie 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

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

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 *H. perforatum*-Transkriptomen 72
5.2.3. Pflanzliche aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen: Aufbau und Eigenschaften 73
5.2.3.1. Generelle Proteinstruktur der AS-PTs aus Johanniskraut 73
5.2.3.2. Vorhergesagte Struktur-Charakteristika von AS-PTs aus Johanniskraut 76
5.2.3.3. Subzelluläre Lokalisierung von HcPT-2 79
5.2.3.4. Phylogenetische Untersuchung von AS-PTs aus Johanniskraut 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. Klonierung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen 86
5.4.3.2. Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen 87
5.4.3.3. Fluoreszenzmarkierung von HcPT-2 und HcPT-2_oT 88
5.4.4. Prenyltransferase HpPT-1 und eine Variante 89
5.4.4.1. Entwurf degenerierter Primer anhand konservierter PT-Motive 89
5.4.4.2. Klonierung der Volllänge-PT HpPT-1 für Expressionsuntersuchungen 90
5.4.4.3. Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen 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. Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes als 1,3,6,7-TH8PX 103
5.6.3.2. Charakterisierung der rekombinanten HcPT 106
5.6.3.3. Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes „P2“ als Patulon 109
5.6.3.4. Aktivitätsnachweis mit 1,3,7-THX 112
5.6.3.5. Aktivitätsnachweis mit 1,3,5,6-THX 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

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.

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 monogeranylierten 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 *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen 180
10.4.2. MS-Untersuchung der Referenzsubstanz Patulon aus *H. calycinum*-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

Dieses Werk ist copyrightgeschützt und darf in keiner Form vervielfältigt werden noch an Dritte weitergegeben werden.
Es gilt nur für den persönlichen Gebrauch.