



Christian Landmann (Autor)

Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärstoffwechsels in Lavendel (*Lavandula angustifolia*) und Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)

Christian Landmann

**Funktionelle Charakterisierung von
Enzymen des Sekundärstoffwechsels in
Lavendel (*Lavandula angustifolia*) und
Erdbeere (*Fragaria x ananassa*)**



 Cuvillier Verlag Göttingen

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1657>

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

Danksagung	I
Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	XI
Summary	XV
A Einleitung.....	1
1 Sekundärstoffwechsel.....	1
1.1 Einteilung in Primär- und Sekundärstoffwechsel.....	1
1.2 Vielfalt des Sekundärmetabolismus.....	2
1.3 Funktionelle Charakterisierung von Enzymen des Sekundärmetabolismus	4
2 Glucosyltransferasen	6
2.1 Einteilung.....	6
2.2 Reaktionen und Struktur.....	6
2.3 Funktionen.....	8
2.4 Vorarbeiten zu FaGT2	10
3 Terpensynthesen	12
3.1 Einteilung der Terpenoide.....	12
3.2 Biosynthese der Terpenoide	13
3.2.1 Mevalonat-Weg	13
3.2.2 Deoxyxylulosephosphat-Weg	13
3.2.3 Synthese von Geranyldiphosphat und Farnesyldiphosphat.....	14
3.2.4 Kompartimentierung	14
3.2.5 Reaktionen der Mono- und Sesquiterpensynthesen.....	16
3.2.6 Struktur der Mono- und Sesquiterpensynthesen	18
3.3 Phylogenetik der Mono- und Sesquiterpensynthesen.....	19
3.4 Funktionen der Mono- und Sesquiterpene.....	21
3.5 Terpene in der Erdbeere.....	22
3.6 Terpene in Lavendel (<i>Lavandula angustifolia</i>)	24
3.7 <i>Metabolic Engineering</i> von Terpenen	25
4 Acyltransferasen.....	27
4.1 Überblick über die Acyltransferasen	27
4.2 Gemeinsame Eigenschaften der BAHD-Acyltransferasen.....	27
4.3 Klassifizierung der BAHD-Acyltransferasen.....	29
5 Problemstellung.....	32
B Ergebnisse und Diskussion.....	34
1 Erweiterte Charakterisierung von FaGT2	34
1.1 Expression und Aufreinigung von FaGT2	34
1.2 Abhängigkeit von Magnesiumkationen	34
1.3 Strukturelle Vielfalt der Substrate von FaGT2.....	36
1.4 Glucosylierung von Umweltkontaminanten.....	42
1.5 Glucosylierung von 2,5-Dimethyl-4-hydroxy-3[2H]-furanon	43

1.6	Bildung glucosidischer Verbindungen <i>in planta</i>	43
1.7	Diskussion	44
1.7.1	Strukturelle Gemeinsamkeiten der Substrate	44
1.7.2	Bedeutung von FaGT2 in der Aromabiosynthese	45
1.7.3	Bedeutung von FaGT2 als Entgiftungsenzym	46
1.7.4	FaGT2 - ein multifunktionelles Enzym	48
2	Terpensynthasen in der Erdbeere	50
2.1	Design von degenerierten Primern	50
2.2	Klonierung und Sequenzanalyse von Terpensynthasen aus <i>Fragaria x ananassa</i> und <i>Fragaria vesca</i>	52
2.3	Expression und Charakterisierung von FaLINS und FvNES	53
2.4	Diskussion	56
3	Terpensynthasen in <i>Lavandula angustifolia</i>	58
3.1	Klonierung von Terpensynthasen	58
3.2	Sequenzanalyse	58
3.3	Heterologe Expression	62
3.4	Charakterisierung der klonierten Terpensynthasen	64
3.4.1	Charakterisierung einer (R)-Limonensynthase	65
3.4.1.1	Identifizierung der gebildeten Produkte	65
3.4.1.2	Biochemische Charakterisierung	67
3.4.2	Charakterisierung einer (R)-Linaloolsynthase	70
3.4.2.1	Identifizierung der gebildeten Produkte	70
3.4.2.2	Biochemische Charakterisierung	71
3.4.3	Charakterisierung einer <i>trans</i> - α -Bergamotensynthase	73
3.4.3.1	Identifizierung der Produkte	73
3.4.3.2	Biochemische Charakterisierung	75
3.5	Vergleich mit einem Extrakt aus Lavendelblüten	77
3.6	Diskussion	78
3.6.1	Zusammenfassung der Enzymeigenschaften	78
3.6.2	(R)-Limonensynthase	79
3.6.3	(R)-Linaloolsynthase	80
3.6.4	<i>trans</i> - α -Bergamotensynthase	81
3.6.5	Bedeutung der drei Terpensynthasen in <i>Lavandula angustifolia</i>	82
4	Acyltransferasen in <i>Lavandula angustifolia</i>	83
4.1	Klonierung von Acyltransferasen	83
4.2	Sequenzanalyse und phylogenetische Einordnung	84
4.3	Heterologe Expression	89
4.4	Enzymassays	91
4.5	Diskussion	93
C	Material und Methoden	97
1	Material	97
1.1	Chemikalien	97
1.2	Pflanzenmaterial	97
1.3	Bakterien- und Hefestämme	97
1.4	Vektoren	98
1.4.1	Leervektoren	98

1.4.2	Vektoren mit Insert	98
1.5	Medien, Pufferlösungen und andere Lösungen	98
1.5.1	Medien.....	98
1.5.2	Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	99
1.5.3	Lösungen zur Proteinaufreinigung.....	100
1.5.4	Lösungen für SDS-PAGE	102
1.5.5	Lösungen für Western Blotting	102
1.5.6	Sonstige Lösungen.....	103
1.6	Enzyme.....	104
1.6.1	Restriktionsendonucleasen.....	104
1.6.2	Reverse Transkriptase	104
1.6.3	DNA-Polymerasen.....	104
1.6.4	Sonstige Enzyme.....	104
1.7	Primer	104
1.7.1	Standard-Primer	104
1.7.2	Degenerierte Primer zur Klonierung von Terpensynthasen.....	105
1.7.3	Degenerierter Primer zur Klonierung von Acyltransferasen.....	105
1.7.4	Primer zur cDNA-Synthese und RACE-PCR.....	105
1.7.5	Primer zur Vollängenklonierung und Herstellung der Konstrukte...106	
1.8	Kits für molekularbiologische Arbeiten.....	107
2	Geräte	108
2.1	Hochauflösende Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS).....	108
2.1.1	Gerätekonfiguration	108
2.1.2	Methode 1: Identifizierung	108
2.1.3	Methode 2: Quantifizierung.....	108
2.2	Chiralphasen-Gaschromatographie (Chirale GC).....	109
2.3	Multidimensionale Gaschromatographie (MDGC)	109
2.4	Multidimensionale Gaschromatographie-Massenspektrometrie (MDGC-MS).....	110
2.5	Hochleistungsflüssigchromatographie-Elektrosprayionisations- Massenspektrometrie (HPLC-ESI-MS/MS).....	110
2.5.1	HPLC-System.....	110
2.5.2	Massenspektrometer.....	111
2.5.3	Methode 1.....	111
2.5.4	Methode 2.....	112
2.5.5	Methode 3.....	112
2.5.6	Methode 4.....	113
2.5.7	Methode 5.....	113
2.6	Präparative Hochleistungsflüssigchromatographie	114
2.7	Flüssigszintillationszähler (LSC)	114
2.8	Sonstige Geräte.....	114
2.9	Software und Internetressourcen.....	115
3	Methoden.....	117
3.1	Allgemeine Techniken	117
3.1.1	Extraktion pflanzlicher mRNA und DNA	117
3.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	117

3.1.3	Gelelektrophorese für DNA	118
3.1.4	Subklonierung.....	119
3.1.5	Ligation in pYES2.1	119
3.1.6	Restriktionsverdau, Dephosphorylierung und Ligation klebriger Enden	119
3.1.7	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> Zellen	120
3.1.8	Transformation von <i>Escherichia coli</i> Zellen	120
3.1.9	Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Zellen	121
3.1.10	Überprüfung transformierter Kolonien	121
3.1.11	Isolierung von Plasmid-DNA.....	121
3.1.12	Fällung von DNA	122
3.1.13	Sequenzierung von DNA	122
3.2	Klonierung von Terpensynthasen und Acyltransferasen.....	122
3.2.1	Herstellung von cDNA (RT-PCR)	122
3.2.2	PCR mit degenerierten Primern.....	123
3.2.3	3'-Rapid Amplification of cDNA Ends (3'-RACE-PCR)	124
3.2.4	5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (5'-RACE-PCR)	125
3.2.5	Klonierung der Vollängen	126
3.2.6	Herstellung der Expressionskonstrukte	127
3.2.7	Sequenzierung der genomischen Sequenzen	128
3.3	Allgemeine biochemische Methoden	128
3.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	128
3.3.2	<i>Western Blot</i>	129
3.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	129
3.3.4	Heterologe Expression in <i>E. coli</i>	130
3.3.5	Heterologe Expression in <i>S. cerevisiae</i>	130
3.3.6	Aufreinigung von FaGT2	130
3.3.7	Aufreinigung von 4CL	131
3.3.8	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	131
3.3.9	Aufreinigung von hefeexprimierten Proteinen.....	132
3.4	Biochemische Charakterisierung von FaGT2	132
3.4.1	<i>In-vitro</i> -Assays.....	132
3.4.2	Inkubation und Aufarbeitung von Erdbeerfrüchten	133
3.5	Biochemische Charakterisierung von Terpensynthasen.....	134
3.5.1	Enzymassays	134
3.5.2	Identifizierung der Enzymprodukte	135
3.5.3	Quantifizierung der Enzymprodukte	136
3.5.4	Extrakte aus Lavendel und <i>Hyptis suaveolens</i>	137
3.6	Biochemische Charakterisierung von Acyltransferasen.....	137
3.6.1	Darstellung von Caffeoyl- und <i>p</i> -Cumaroyl-CoA.....	137
3.6.2	Enzymassays	138
D	Literaturverzeichnis	139