

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	Naphtodianthrone	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	Dephosphorylierung von durch Restriktion verdauten Vektoren	59
4.11	Ligation	60
4.11.1	Klonierung in den Vektor pGEM [®] -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 Transkriptoms 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	1-H-NMR.....	181
5.2	13-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