

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung und Nutzung von sekundären Pflanzenstoffen	1
1.2. Gewinnung von Wirkstoffen aus Arzneipflanzen	1
1.3. Homologe und heterologe in vitro-Systeme zur Produktion von pflanzlichen Wirkstoffen	3
1.4. Johanniskraut als moderne Arzneipflanze	6
1.4.1. Inhaltsstoffe und Bedeutung im Arzneischatz	6
1.4.2. Ansätze zur Gewinnung von Hyperforin	7
1.4.3. Biosynthese von Hyperforin	8
1.5. Prenylierende Enzyme in Pflanzen	9
1.6. Ziel der Arbeit	14
2. Material und Methoden	15
2.1. Lösungen, Medien und Puffer	15
2.1.2. Substrate für Enzymaktivitätstests	19
2.1.2.1. Prenylakzeptoren und -donoren	19
2.1.2.2. Vergleichssubstanzen für prenylierte Verbindungen	19
2.2. Organismen	20
2.2.1. Bakterien	20
2.2.2. Pflanzenmaterial	20
2.2.2.1. <i>Hypericum perforatum</i>	20
2.2.2.2. Zellsuspensionskultur von <i>Hypericum calycinum</i>	20
2.2.2.3. <i>Nicotiana benthamiana</i>	20
2.3. Vektoren und cDNAs	21
2.4. Oligonukleotide	22
2.5. Mikrobiologische Methoden	25
2.5.1. Erzeugung kompetenter <i>E. coli</i>	25
2.5.2. Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	25
2.5.3. Erzeugung elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	25
2.5.4. Transformation elektrokompetenter <i>A. tumefaciens</i>	26
2.5.5. Plasmidisolation aus <i>E. coli</i> (Alkalische Lyse)	26
2.5.6. Isolation von Gesamt-DNA aus <i>A. tumefaciens</i>	26
2.5.7. Bestimmung der DNA Konzentration	27
2.5.8. Kryokonservierung von Bakterien	27
2.6. Molekularbiologische Methoden	27
2.6.1. Isolation von RNA	27
2.6.1.1. RNA-Isolationskits	27
2.6.1.2. Lithiumchlorid-Methode	27
2.6.2. Analyse der RNA	28
2.6.3. DNase-Verdau	28
2.6.4. Reverse Transkription	28

2.6.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	29
2.6.6.	Genexpressionsanalyse mittels quantitativer Real-Time-PCR (qPCR)	30
2.6.6.1.	Durchführung der qPCR	30
2.6.6.2.	Auswertung der qPCR	31
2.6.7.	Klonierungstechniken	32
2.6.7.1.	USER-Technik	32
2.6.7.2.	Klonierung in pGEM-T-easy Vektor	32
2.6.7.3.	Blau-Weiß-Selektion	32
2.6.8.	Restriktionsverdau	33
2.6.9.	Agarosegelektrophorese	33
2.6.10.	Aufreinigung von Produkten aus dem Agarosegel	33
2.6.11.	Sequenzierung	33
2.7.	Biochemische Methoden	34
2.7.1.	Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i>	34
2.7.2.	Chloroplasten-Isolation	34
2.7.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.7.4.	Nachweis der Prenyltransferase-Aktivität <i>in vitro</i>	35
2.7.5.	Nachweis der Prenyltransferase-Aktivität <i>in planta</i>	35
2.8.	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie	36
2.9.	Analytische Methoden	36
2.9.1.	Gehaltsbestimmung von Hyperforin.....	36
2.9.2.	Massenspektrometrie	36
2.9.3.	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	37
2.10.	Bioinformatische Methoden.....	38
3.	Ergebnisse	39
3.1.	Identifizierung von cDNAs von Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten.....	39
3.1.1.	Klonierung und Sequenzbestätigung der Prenyltransferasen	39
3.1.2.	Datenbankinformationen und Strukturvorhersagen zu den identifizierten Prenyltransferasen	40
3.1.3.	Erstellung von Expressionskonstrukten	44
3.2.	Subzelluläre Lokalisation der Prenyltransferasen nach Expression in <i>N. benthamiana</i>	45
3.2.1.	Subzelluläre Lokalisation des YFP (Kontrolle).....	45
3.2.2.	Subzelluläre Lokalisation von HcPT-1 in Fusion mit YFP	46
3.2.3.	Subzelluläre Lokalisation von HcPT-2 in Fusion mit YFP	47
3.2.4.	Subzelluläre Lokalisation von HcPT-3 in Fusion mit YFP	48
3.2.5.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-1A und HpPT-1B in Fusion mit YFP	49
3.2.6.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-2 in Fusion mit YFP	51
3.2.7.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-3 in Fusion mit YFP	52
3.2.8.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-4 in Fusion mit YFP	53
3.2.9.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-5 in Fusion mit YFP	54
3.2.10.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-6 in Fusion mit YFP	55
3.2.11.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-7 in Fusion mit YFP	56
3.2.12.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-8A und HpPT-8B in Fusion mit YFP	57
3.2.13.	Subzelluläre Lokalisation von HpPT-9A und HpPT-9B in Fusion mit YFP	59
3.3.	Prenyltransferase-Aktivität nach Expression von cDNAs aus <i>Hypericum</i> -Arten in <i>N. benthamiana</i>	61
3.3.1.	Auswahl eines geeigneten Protokolls zur Aufarbeitung von transformierten Blättern von <i>N. benthamiana</i> für <i>in vitro</i> -Enzymaktivitätstests	61
3.3.2.	Funktionelle Expression der Prenyltransferasen in <i>N. benthamiana</i>	61

3.3.3.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-1	62
3.3.3.1.	HcPT-1 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	62
3.3.3.2.	HcPT-1 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	63
3.3.3.3.	HcPT-1 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	64
3.3.4.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-2	65
3.3.4.1.	HcPT-2 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	65
3.3.4.2.	HcPT-2 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	66
3.3.4.3.	HcPT-2 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	67
3.3.5.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-3	69
3.3.5.1.	HcPT-3 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	69
3.3.5.2.	HcPT-3 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	70
3.3.5.3.	HcPT-3 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	71
3.3.5.4.	HcPT-3 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und GPP	73
3.3.6.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-1A und HpPT-1B	74
3.3.6.1.	HpPT-1A und HpPT-1B mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	74
3.3.6.2.	HpPT-1A und HpPT-1B mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	75
3.3.6.3.	HpPT-1A und HpPT-1B mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	76
3.3.7.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-2	77
3.3.7.1.	HpPT-2 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	77
3.3.7.2.	HpPT-2 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	78
3.3.7.3.	HpPT-2 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	79
3.3.7.4.	HpPT-2 mit Phlorisobutyrophenon und GPP	80
3.3.8.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-3	82
3.3.8.1.	HpPT-3 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	82
3.3.8.2.	HpPT-3 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	83
3.3.8.3.	HpPT-3 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	84
3.3.9.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-4	85
3.3.9.1.	HpPT-4 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	85
3.3.9.2.	HpPT-4 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	86
3.3.9.3.	HpPT-4 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	87
3.3.10.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-5	88
3.3.10.1.	HpPT-5 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	88
3.3.10.2.	HpPT-5 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	89
3.3.10.3.	HpPT-5 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	90
3.3.11.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-6	91
3.3.11.1.	HpPT-6 mit Phlorisobutyrophenon mit DMAPP	91
3.3.11.2.	HpPT-6 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	92
3.3.11.3.	HpPT-6 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	93
3.3.11.4.	HpPT-6 mit Phlorisobutyrophenon und GPP	94
3.3.12.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-7	95
3.3.12.1.	HpPT-7 mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	95
3.3.12.2.	HpPT-7 mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	96
3.3.12.3.	HpPT-7 mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	97
3.3.13.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-8A und HpPT-8B	98
3.3.13.1.	HpPT-8A und HpPT-8B mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	98
3.3.13.2.	HpPT-8A und HpPT-8B mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	99
3.3.13.3.	HpPT-8A und HpPT-8B mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	100
3.3.14.	<i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HpPT-9A und HpPT-9B	101
3.3.14.1.	HpPT-9A und HpPT-9B mit Phlorisobutyrophenon und DMAPP	101
3.3.14.2.	HpPT-9A und HpPT-9B mit 1,3,7-Trihydroxyxanthon und DMAPP	102
3.3.14.3.	HpPT-9A und HpPT-9B mit 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon und DMAPP	103

3.3.15. <i>in vitro</i> -Produktbildung bei Kombination von Prenyltransferasen	104
3.3.15.1. Umsetzung von Phlorisobutyrophenon mit DMAPP und GPP durch HpPT-2 und HpPT-6.....	104
3.3.15.2. Kombination von HcPT-1, HcPT-2, HcPT-3 aus <i>H. calycinum</i>	106
3.3.15.3. Kombination der neuen Prenyltransferasen aus <i>H. perforatum</i>	109
3.3.16. Aktivität von Prenyltransferasen <i>in planta</i>	112
3.4. Expressionsanalyse von Prenyltransferasen	113
3.4.1. Genexpression in Zellsuspensionskulturen von <i>H. calycinum</i>	113
3.4.2. Genexpression in <i>H. perforatum</i>	115
3.5. Hyperforingehalt in <i>H. perforatum</i>	118
4. Diskussion	119
4.1. <i>Hypericum</i> -Arten verfügen über eine Vielzahl an Prenyltransferase-Genen.....	119
4.2. Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten sind an der äußeren Chloroplastenmembran lokalisiert.	120
4.3. Zehn Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten katalysieren die Prenylierung oder Geranylierung von Phlorisobutyrophenon- oder Xanthonderivaten.....	122
4.4. Erfolgt die Biosynthese von Hyperforin durch einen Enzymkomplex?	129
4.5. Perspektiven.....	131
5. Zusammenfassung.....	133
Literaturverzeichnis	135
Anhang	147
A1. Vektorkarten	147
A2. Sequenzalignments	148
A3. Nachweis der Expressionskonstrukte in <i>A. tumefaciens</i>	152
A4. Betrachtung mehrerer Ebenen von Chloroplasten zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Prenyltransferasen.....	153
A5. Klokalisierung zur weiteren Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Prenyltransferasen	153
A6. <i>In vitro</i> -Enzymaktivität von HcPT-3 bei Vorliegen eines Strep-Tag- oder YFP- Fusionsproteins	157
A7. Code des Statistikpaketes R für den Boxplot zur Darstellung des Vergleiches der CT-Werte der Referenzgene 18S-RNA, Aktin, Histon und Tubulin.	159
A8. Erzeugung stabiler Überexpressionslinien in <i>Arabidopsis thaliana</i>	160