

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG

1. EINLEITUNG	1
1.1 Die Gattung <i>Thymus</i> L.....	1
1.1.1 Arten.....	1
1.1.2 Botanik.....	3
1.1.3 Polymorphie und Vererbung.....	3
1.1.4 Inhaltsstoffe und Chemotypen.....	4
1.1.5 Medizinische und biologische Bedeutung des Thymians und dessen Inhaltsstoffe.....	6
1.2 Terpenbiosynthese in <i>Thymus vulgaris</i> L.....	7
1.2.1 Grundbausteine der Biosynthese.....	7
1.2.2 Kompartimentierung und Vorstufenbildung.....	9
1.2.3 Terpensynthesen.....	10
1.2.4 Monoterpen-Biosynthese.....	11
1.2.4.1 Zyklische Monoterpene.....	12
1.2.4.2 Azyklische Monoterpene.....	13
1.2.4.3 Thymol-Biosynthese.....	14
1.2.4.4 Enzyme der Thymol-Biosynthese.....	16
1.2.4.4.1 Monoterpensynthese: γ -Terpinen Synthase/Cyclase (GTS).....	16
1.2.4.4.2 Cytochrom P ₄₅₀ -abhängige Monooxygenasen/Hydroxylasen.....	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	20
2. MATERIALIEN UND METHODEN	21
2.1 Materialien.....	21
2.1.1 Pflanzenmaterial.....	21
2.1.2 Deionisiertes Wasser.....	22
2.1.3 Chemikalien.....	22
2.1.4 Lösungen.....	24
2.1.4.1 Lösungen für die molekularbiologischen Arbeiten.....	24
2.1.4.2 Lösungen für die Dünnschichtchromatographie.....	25
2.1.4.3 Lösungen für die proteinbiochemischen Arbeiten.....	25
2.1.4.3.1 Lösungen für den Western Blot.....	26
2.1.5 Puffer.....	26
2.1.5.1 Puffer für die molekularbiologischen Arbeiten.....	26
2.1.5.2 Puffer für die His-tag Reinigung.....	27
2.1.5.3 Puffer für die Proteinkristallisierung.....	27
2.1.5.4 Puffer für die SDS-PAGE.....	27
2.1.5.5 Puffer für den Western Blot.....	28
2.1.5.6 Puffer für den Standard-Enzymassay.....	28
2.1.5.7 Puffer für die Calciumchlorid-Behandlung zur Gewinnung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen.....	28
2.1.6 Anzuchtmedien.....	29
2.1.7 Oligodesoxyribonukleotide/Primer.....	29

2.1.8	<i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	34
2.1.9	Klonierungs- und Expressionsvektoren.....	34
2.1.10	Erzeugte Vektor-Insert-Konstrukte	35
2.1.11	Enzyme und Kits	37
2.1.12	Antikörper.....	38
2.1.13	Geräte	38
2.1.14	Verbrauchsmaterialien.....	41
2.1.15	DNA- und Proteinmarker	41
2.1.16	Software und Programme.....	42
2.2	Methoden.....	44
2.2.1	Mikroskopische Analysen von Drüsenschuppen.....	44
2.2.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse	44
2.2.1.2	Analyse mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.....	44
2.2.2	Gewinnung von ätherischem Öl aus Thymianpflanzen.....	44
2.2.2.1	Probenaufarbeitung für die Wasserdampfdestillation	44
2.2.2.2	Wasserdampfdestillation	45
2.2.3	Analytische Methoden.....	45
2.2.3.1	Dünschichtchromatographie (DC)	45
2.2.3.2	Thermomikro-Abtrenn-Transfer- & Auftrageverfahren nach Stahl.....	45
2.2.4	Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS).....	46
2.2.4.1	Analyse der Standard-Enzymassays.....	46
2.2.4.2	Analyse von ätherischen Ölen.....	47
2.2.5	Molekulare Unterscheidung von Thymian-Herkünften	47
2.2.5.1	Isolierung von genomischer DNA (gDNA)	47
2.2.5.2	Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)-PCR	47
2.2.6	Klonierung und Mutagenese von cDNA-kodierten Genen	48
2.2.6.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	48
2.2.6.2	Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von RNA- und DNA- Lösungen	49
2.2.6.3	Umschreiben von messenger RNA (mRNA) in komplementäre DNA (cDNA)	49
2.2.6.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	49
2.2.6.5	Rapid amplification of 5'-3' cDNA-ends (RACE)-PCR	50
2.2.6.5.1	Rapid amplification of 5' cDNA-ends (5'-RACE)	51
	First-strand cDNA Synthesis (Reverse Transkription)	51
	Reinigung der cDNA.....	51
	Poly(A) Tailing der first-strand cDNA	51
	Erste Amplifikation der dA-tailed cDNA	52
	Zweite Amplifikation der 5'-RACE.....	53
2.2.6.5.2	Rapid amplification of 3' cDNA-ends (3'-RACE)	53
	First-strand cDNA Synthesis (Reverse Transkription)	53
	Erste Amplifikation der 3'-RACE.....	53
	Zweite Amplifikation der 3'-RACE.....	54
2.2.6.6	Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL)-PCR.....	54

2.2.6.7	Nachweis von PCR-Produkten	57
2.2.6.8	Aufreinigung und Isolierung von PCR-Produkten	58
2.2.6.9	Anfügen von 3'-Adenosinüberhangen an blunt-end PCR-Produkte (A-Tailing)	58
2.2.6.10	Entfernen von 3'-Adenosinüberhangen	58
2.2.6.11	Subklonierung von PCR-Produkten	59
2.2.6.11.1	Subklonierung von Taq-amplifizierten PCR-Produkten	59
	TOPO-TA-Cloning® Kit	59
	InsTAclone PCR Cloning Kit	59
2.2.6.11.2	Subklonierung von Phusion-amplifizierten PCR-Produkten	60
	Zero Blunt®TOPO®PCR Cloning Kit	60
	CloneJET PCR Cloning Kit	61
	Gateway Cloning Kit (pDONR221-Vektor)	61
	Gateway Cloning Kit (pENTR/D-TOPO)	63
2.2.6.12	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	63
2.2.6.13	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	64
2.2.6.14	Colony-PCR	64
2.2.6.15	Plasmid-DNA Isolierung	65
2.2.6.16	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	65
2.2.6.17	Kladistische Analyse	65
2.2.6.18	Langzeitlagerung von Bakterienkulturen	65
2.2.6.19	Site-Directed Mutagenesis (SDM)-PCR	66
2.2.6.20	<i>DpnI</i> -Verdau von methylierter Plasmid-DNA	66
2.2.6.21	Ligation von 5'-phosphorylierten Enden	66
2.2.7	Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	67
2.2.7.1	Herstellung von Expressionskonstrukten	67
2.2.7.2	Heterologe Expression von rekombinanten γ -Terpinen Synthasen aus verschiedenen Thymianarten/Herkünften	67
2.2.7.3	Zellyse und native His-tag Affinitätschromatographie	68
2.2.7.3.1	ÄKTApurifier	68
2.2.7.3.2	Ni-NTA Säulen	68
2.2.8	Proteinbiochemische und immunologische Methoden	68
2.2.8.1	Umpuffern von Proteinen	68
2.2.8.2	Einkonzentrieren von Proteinen	69
2.2.8.3	Konzentrationsbestimmung nach Bradford	69
2.2.8.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	69
2.2.8.5	Proteinfärbung mit sensitiver Coomassie-Lösung	70
2.2.8.6	Silberfärbung von Proteinen	70
2.2.8.7	Western Blot	70
2.2.8.7.1	Detektion der Signale auf einem Röntgenfilm	71
2.2.8.7.2	Detektion der Signale mit einem Chemilumineszenz Western Blot Scanner	71
2.2.8.8	Standard-Enzymassay für rekombinante γ -Terpinen Synthasen	72

2.2.8.9	Kristallisation der rekombinanten γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus vulgaris</i> Obi	72
3.	ERGEBNISSE	73
3.1	Korrelationsanalyse der Drüschuppendichte und des ätherischen Ölgehalts der Thymianzüchtungen des Kooperationspartners	73
3.1.1	Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Drüschuppen	73
3.1.2	Wasserdampfdestillation zur Isolierung des ätherischen Öls	77
3.1.3	Dünnschichtchromatographische Analyse des ätherischen Öls	79
3.1.4	Gaschromatographische Analyse des ätherischen Öls	80
3.2	Ätherische Öl-Analyse diverser Thymianarten	83
3.2.1	Dünnschichtchromatographische Analyse	83
3.2.2	Gaschromatographische Analyse	84
3.3	Molekulare Unterscheidung von <i>Thymus</i> species durch RAPD-PCR	88
3.3.1	genomische DNA-Isolierung	88
3.3.2	RAPD-PCR	89
3.3.2.1	RAPD-Analyse der ersten Pflanzenlieferung vom 10.07.2012	89
3.3.2.2	RAPD-Analyse der zweiten Pflanzenlieferung vom 31.01.2014	91
3.3.3	TAS-Verfahren zur Schnellbestimmung der Chemotypen	92
3.3.4	Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR)-Analyse	93
3.3.4.1	Isolierung und Subklonierung der Markerbanden	93
3.3.4.2	Nukleotidsequenzen	94
3.3.4.3	PCR mit SCAR-Primern	96
3.4	Isolierung und Klonierung von Genen aus <i>Thymus</i> species	97
3.4.1	Isolierung und Klonierung putativer γ -Terpinen Synthasegene (<i>GTS</i>) aus <i>Thymus</i> species	98
3.4.1.1	Standard-PCR	98
3.4.1.2	Subklonierung	99
3.4.1.3	Nukleotidsequenz	99
3.4.1.4	Aminosäuresequenz	100
3.4.1.5	Aminosäuresequenzvergleich der Herkünfte des Kooperationspartners	100
3.4.1.6	Aminosäuresequenzvergleich der verschiedenen Thymianarten	102
3.4.1.7	Zusammenfassende kladistische Analyse	102
3.4.2	Isolierung und Klonierung putativer Progesteron 5 β -Reduktase-/Isoprenoidsynthasegene (<i>PRISE</i>) aus <i>Thymus</i> species	103
3.4.2.1	Standard-PCR	104
3.4.2.2	Subklonierung	104
3.4.2.3	Nukleotidsequenz	105
3.4.2.4	Aminosäuresequenz	106
3.4.2.5	Aminosäuresequenzvergleich der Herkünfte des Kooperationspartners	106
3.4.2.6	Aminosäuresequenzvergleich der verschiedenen Thymianarten	107
3.4.2.7	Zusammenfassende kladistische Analyse	108
3.4.3	Isolierung und Klonierung putativer Limonen-6-Hydroxylasegene (<i>L6H</i>)	

und Limonen-3-Hydroxylasegene (<i>L3H</i>) aus <i>Thymus vulgaris</i> Uni	109
3.4.3.1 Isolierung und Klonierung eines putativen Limonen-6-Hydroxylasegens (<i>L6H</i>) aus <i>Thymus vulgaris</i> Uni	109
3.4.3.1.1 Vervollständigung der Nuklotidsequenz durch 3'-RACE-PCR.	111
3.4.3.1.2 Vervollständigung der Nuklotidsequenz durch 5'-TAIL-PCR ..	112
3.4.3.1.3 Isolierung und Klonierung eines kompletten putativen Limonen-6-Hydroxylasegens (<i>L6H</i>) aus <i>Thymus vulgaris</i> Uni	114
3.4.3.2 Isolierung und Klonierung eines zweiten putativen Limonen-6- Hydroxylasegens (<i>L6H2</i>) aus <i>Thymus vulgaris</i> Uni	116
3.4.3.2.1 Vervollständigung der Nuklotidsequenz durch 5'-TAIL-PCR ..	118
3.4.3.2.2 Isolierung und Klonierung eines kompletten zweiten putativen Limonen-6-Hydroxylasegens (<i>L6H2</i>) aus <i>Thymus vulgaris</i> Uni ...	120
3.5 Funktionelle Expression der cDNA-kodierten Gene aus <i>Thymus</i> species	123
3.5.1 Funktionelle Expression von γ -Terpinen Synthasen aus <i>Thymus</i> species in <i>E. coli</i>	123
3.5.1.1 Erstellung der Expressionskonstrukte	124
3.5.1.2 Heterologe Expression	127
3.5.1.2.1 Native His-tag Reinigung und Expressionsnachweis durch SDS-PAGE und Western Blot	127
3.5.1.3 Transitpeptid-Vorhersage.....	128
3.5.1.3.1 Deletion der Signalsequenz.....	129
3.5.1.4 Expressionsnachweis der N-terminalen Einkürzungsmutante durch SDS-PAGE und Western Blot.....	131
3.5.1.4.1 <i>Tvu_GTS1_Obi_PTS46</i> und <i>Tvu_GTS1_Obi_PTS54</i>	131
3.5.1.4.2 <i>Thymus</i> species & Herkünfte des Kooperationspartners.....	131
3.5.1.5 Kristallisationsversuche der rekombinanten GTS1_PTS54_G356D_A565T aus <i>Thymus vulgaris</i> Obi	133
3.5.1.5.1 Native His-tag Reinigung.....	133
3.5.2 Heterologe Überexpression der putativen Limonen-6-Hydroxylase bzw. Limonen-6-Hydroxylase 2 aus <i>Thymus vulgaris</i> Uni in <i>S. cerevisiae</i>	134
3.5.2.1 Erstellung der Vektorkonstrukte	135
3.5.2.2 Heterologe Expression der rekombinanten Hydroxylasen.....	137
3.6 Biochemische Charakterisierung der γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus</i> species	137
3.6.1 Nachweis der katalytischen Aktivität der <i>rTvU_GTS_Bio1_PTS46</i>	137
3.6.2 Etablierung eines geeigneten Enzymassays	138
3.6.2.1 Puffersystem.....	138
3.6.2.2 pH-Optimum	138
3.6.2.3 Cofaktor.....	139
3.6.2.4 Magnesiumchloridkonzentration (Cofaktor).....	139
3.6.2.5 Geranyldiphosphatkonzentration (Substrat).....	140
3.6.2.6 Enzymkonzentration.....	140
3.6.2.7 Temperaturoptimum	140
3.6.2.8 Assaydauer	141
3.6.2.9 Schütteldrehzahl	141

3.6.2.10	Optimierter Enzymassay	142
3.6.3	Aktivitätsvergleich	142
3.6.4	Vergleich des Nebenproduktspektrums.....	142
3.6.5	Aktivitätsunterschiede der Einkürzungsmutanten der <i>Tvu_GTS1_Obi</i>	143
3.6.6	Substratspezifität	144
3.7	Homologie-Modellierung der γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus vulgaris</i> Obi und deren Validierung	144
3.8	Ortsgerichtete Mutagenese (SDM) der rekombinanten γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus species</i>	147
3.8.1	Mutagenese zur Änderung des Nebenproduktspektrums der rekombinanten γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus vulgaris</i> Bio1.....	147
3.8.1.1	Mutanten I342A und I342N	147
3.8.2	Mutagenese zur Änderung der katalytischen Aktivität der rekombinanten γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus vulgaris</i> Obi	150
3.8.2.1	Mutante A565T	150
3.8.2.2	Mutante G356D.....	151
3.8.2.3	Doppelmutante G356D_A565T	152
3.9	Inhibitionsanalyse der γ -Terpinen Synthase aus <i>Thymus vulgaris</i> Bio1	153
4.	DISKUSSION.....	155
4.1	Korrelationsanalyse zwischen Drüsenschuppendichte und dem ätherischen Ölgehalt	155
4.2	Ätherische Öl-Zusammensetzung verschiedener Thymianarten.....	159
4.3	RAPD- und SCAR-Analysen	163
4.4	Klonierung und Sequenzanalyse von orthologen Genen aus Thymian.....	168
4.4.1	γ -Terpinen Synthase (GTS).....	168
4.4.2	Progesteron 5 β -Reduktase/ Iridoid Synthase (PRISE).....	171
4.5	Charakterisierung von Thymol-Biosyntheseegenen	174
4.5.1	γ -Terpinen Synthase (<i>GTS</i>)	175
4.5.1.1	Mutagenese-Experimente.....	178
4.5.1.1.1	<i>Tvu_GTS_Bio1_PTS46</i>	179
4.5.1.1.2	<i>Tvu_GTS1_Obi_PTS54</i>	183
4.5.1.2	Kristallisation der GTS aus <i>Thymus vulgaris</i> Obi.....	183
4.5.1.3	Inhibition der GTS	186
4.5.2	Limonen-6-Hydroxylasen (L6H/L6H2).....	187
5.	ZUSAMMENFASSUNG	193
6.	SUMMARY	195
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	197
8.	ANLAGEN	220
8.1	Sequenzdaten der Gene aus den kommerziell erworbenen Thymianpflanzen	220
8.1.1	PRISE-Sequenzen.....	220
8.1.2	GTS-Sequenzen.....	224
8.1.3	Aktin-Sequenz	230
8.2	Sequenzdaten der Gene aus den <i>Thymus vulgaris</i> -Herkünften des Kooperationspartners.....	230

8.2.1	PRISE-Sequenzen.....	230
8.2.2	GTS-Sequenzen.....	232
8.3	Gaschromatographische Analysen des ätherischen Öls der <i>Thymus species</i>	235
8.3.1	GC-Chromatogramme des ätherischen Öls der kommerziell erworbenen Thymianpflanzen.....	235
8.3.2	GC-Chromatogramme des ätherischen Öls der <i>Thymus vulgaris</i> -Herkünfte des Kooperationspartners	238
8.4	Bilder der <i>Thymus vulgaris</i> -Herkünfte des Kooperationspartners	239
8.5	Abkürzungsverzeichnis	241
8.6	Lebenslauf	245
8.7	Publikationsliste	246
8.8	Wissenschaftliche Kongresse	246