



**Untersuchung von Polyketidsynthasen
aus *Hypericum*-Arten,
insbesondere Charakterisierung und Mutagenese
einer neuartigen bifunktionellen Polyketidsynthase
aus *Hypericum polyphyllum***

Christian Bunzel



Untersuchung von Polyketidsynthesen
aus *Hypericum*-Arten,
insbesondere Charakterisierung und Mutagenese
einer neuartigen bifunktionellen Polyketidsynthase
aus *Hypericum polyphyllum*





Untersuchung von Polyketidsynthesen
aus *Hypericum*-Arten,
insbesondere Charakterisierung und Mutagenese
einer neuartigen bifunktionellen Polyketidsynthase
aus *Hypericum polyphyllum*

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr.rer.nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Christian Bunzel
aus Goslar



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliographische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2021

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2020

1. Referent: Prof. Dr. Ludger Beerhues

2. Referentin: Prof. Dr. Ute Wittstock

eingereicht am: 29.07.2020

mündliche Prüfung (Disputation) am: 26.11.2020

Druckjahr 2021

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2021

Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen

Telefon: 0551-54724-0

Telefax: 0551-54724-21

www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie) zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2021

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-7381-7

eISBN 978-3-7369-6381-8



Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

C. Bunzel, B. Liu, L. Beerhues (2019) Novel dual-function type III polyketide synthase from *Hypericum polyphyllum*. *Planta Med.* 85:1398-1399

Tagungsbeiträge

Vortrag:

C. Bunzel, B. Liu, L. Beerhues (2019) Novel dual-function type III polyketide synthase from *Hypericum polyphyllum*. 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Young Researcher Workshop, Innsbruck

Poster:

C. Bunzel, M. M. Gaid, B. Liu, L. Beerhues (2018) Benzophenone-biphenyl synthase, a novel type III polyketide synthase from *Hypericum polyphyllum*. Metabolism, biotechnology and ecology of plant natural products, Young scientist workshop of the 'Natural Products' section of the German Society for Plant Sciences (DBG), Warberg

C. Bunzel, B. Liu, L. Beerhues (2019) Novel dual-function type III polyketide synthase from *Hypericum polyphyllum*. 67th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Innsbruck



Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Mentor Prof. Dr. Ludger Beerhues für die Überlassung des interessanten und herausfordernden Themas sowie für seine stete Unterstützung bedanken. Er hat mir viele Freiheiten bei der Durchführung der Arbeit gelassen. Er war mir eine große Hilfe bei allen meinen Fragen und Problemen sowie immer für eine fachliche Diskussion bereit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Prof. Dr. Ute Wittstock für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens sowie bei Prof. Dr. Stephan Scherneck für den Vorsitz der Prüfungskommission bedanken.

Mein großer Dank gilt Dr. Benye Liu für die Begleitung meiner Arbeit durch anregenden wissenschaftlichen Austausch sowie für die Einarbeitung in viele Methoden, seine tatkräftige Unterstützung und seine Hilfe bei vielen Fragestellungen und Problemen.

Für die Unterstützung bei analytischen Fragen und Synthesefragen möchte ich mich bei Dr. Till Beuerle und Dr. Matthias Strieker bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Dr. Rainer Lindigkeit für unsere gemeinsame erfolgreiche Betreuung des Phyto-Praktikums und für zahlreiche interessante, aufmunternde und unterhaltsame Gespräche.

Außerdem möchte ich mich bei Ines Rahaus und Philipp Koch für die aufmunternden wissenschaftlichen und zwischenmenschlichen Gesprächen sowie bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmazeutische Biologie für das gute Arbeitsklima bedanken.

Mein Dank gilt auch der Donnerstagsgruppe für unsere zahlreichen schönen Treffen und Ausflüge.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie und Freundin danke sagen. Danke an meine Eltern für die stete Unterstützung, für alle Aufmunterungen und das Interesse an meiner Arbeit und ihre Motivation stets ehrgeizig zu sein und nie das Ziel aus den Augen zu verlieren. Danke an meine Schwester, mit der ich mich wunderbar über alles außer Wissenschaft unterhalten konnte. Danke an meine Freundin, die mir die größte Unterstützung durch wissenschaftliche Diskussionen, großes Verständnis, Mitgefühl und Aufmunterung war. Durch sie habe ich nie das Interesse und die Freude an meiner Arbeit verloren.



Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1 Johanniskräuter – <i>Hypericum</i>..... | 1 |
| 1.1.1 Echtes Johanniskraut – <i>Hypericum perforatum</i> L. | 1 |
| 1.1.2 Polster-Johanniskraut – <i>Hypericum polyphyllum</i> | 6 |
| 1.2 Polyketidsynthesen | 8 |
| 1.2.1 Typ I Polyketidsynthesen..... | 9 |
| 1.2.2 Typ II Polyketidsynthesen..... | 9 |
| 1.2.3 Typ III Polyketidsynthesen..... | 10 |
| 1.2.4 Chalkonsynthese-artige Typ III Polyketidsynthesen..... | 12 |
| 1.2.4.1 Struktur und Mechanismus der Chalkonsynthase | 12 |
| 1.2.4.2 Benzophenonsynthesen..... | 15 |
| 1.2.4.3 Polyprenylierte Benzophenone und polyprenylierte Xanthone..... | 16 |
| 1.2.5 Stilbensynthese-artige Typ III Polyketidsynthesen..... | 19 |
| 1.2.5.1 Struktur und Mechanismus der Stilbensynthese..... | 19 |
| 1.2.5.2 Biphenylsynthesen..... | 20 |
| 1.2.6 Methylierte Polyketide | 21 |
| 1.3 Ziele der Arbeit..... | 23 |
| | |
| 2. Material | 24 |
| 2.1 Oligonukleotide | 24 |
| 2.2 Organismen | 28 |
| 2.3 Vektoren | 28 |
| 2.4 Kulturmedien..... | 29 |
| 2.5 Substrate | 29 |
| 2.6 Referenzsubstanzen | 30 |
| 2.7 Nachweisreagenz für die Dünnschichtchromatographie..... | 30 |
| 2.8 Verwendete Software..... | 31 |
| | |
| 3. Methoden..... | 32 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden..... | 32 |
| 3.1.1 RNA-Isolation | 32 |
| 3.1.2 RNA- und DNA-Analyse | 32 |



| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.3 | Reverse Transkription | 32 |
| 3.1.4 | Polymerase-Kettenreaktion (PCR) | 33 |
| 3.1.4.1 | Standard-PCR..... | 33 |
| 3.1.4.2 | <i>Touchdown</i> -PCR..... | 34 |
| 3.1.4.3 | Verlängerung von cDNA-Fragmenten: RACE-PCR | 36 |
| 3.1.5 | Ortsgerichtete Mutagenese | 36 |
| 3.1.6 | Quantitative Real-Time-PCR (qPCR) zur Genexpressionsanalyse | 37 |
| 3.1.6.1 | Durchführung | 37 |
| 3.1.6.2 | Primereffizienz | 38 |
| 3.1.6.3 | Genexpression..... | 38 |
| 3.1.7 | Agarose-Gelelektrophorese..... | 38 |
| 3.1.8 | Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen | 39 |
| 3.1.9 | Restriktionsverdau..... | 40 |
| 3.1.10 | Dephosphorylierung linearisierter Expressionsplasmide..... | 40 |
| 3.1.11 | Ligation | 41 |
| 3.1.12 | Sequenzierung..... | 41 |
| 3.1.13 | Phylogenetische Analyse | 41 |
| 3.2 | Mikrobiologische Methoden | 42 |
| 3.2.1 | Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> | 42 |
| 3.2.2 | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> | 42 |
| 3.2.3 | Plasmidisolation durch alkalische Lyse aus <i>E. coli</i> | 42 |
| 3.2.4 | Kryokonservierung von <i>E. coli</i> | 43 |
| 3.3 | Biochemische Methoden | 44 |
| 3.3.1 | Überexpression von rekombinanten Proteinen in <i>E. coli</i> und Zellernte | 44 |
| 3.3.2 | Zellaufschluss und Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC)..... | 44 |
| 3.3.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 45 |
| 3.3.4 | Bestimmung der Proteinkonzentration..... | 47 |
| 3.3.5 | Nachweis der Typ III Polyketid-Synthase-Aktivität <i>in vitro</i> | 47 |
| 3.3.5.1 | Aktivitätsnachweis mittels Proteinrohextrakt aus <i>E. coli</i> | 48 |
| 3.3.5.2 | Aktivitätsnachweis mittels Proteinrohextrakt aus Pflanzen | 48 |
| 3.3.5.3 | Aktivitätsnachweis mittels aufgereinigten Proteins | 49 |
| 3.3.5.4 | Funktionelle Charakterisierung der bifunktionellen Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i> | 49 |
| 3.3.5.5 | Enzymatische Synthese von Produkten unter Verwendung von Methylmalonyl-Coenzym A als Extender | 51 |
| 3.3.6 | Extraktion von Biphenylen aus <i>H. polyphyllum</i> | 51 |



| | |
|---|-----------|
| 3.4 Chemische Synthesen | 52 |
| 3.4.1 Malonyl-Coenzym A | 52 |
| 3.4.2 Diketidyl-NAC (S-(2-Acetamidoethyl)4-methyl-3-oxopentanthioat) | 53 |
| 3.4.3 Triketidyl-NAC (S-(2-acetamidoethyl)2,6-dimethyl-3,5-dioxoheptanthioat)..... | 54 |
| 3.5 Analytische Methoden | 57 |
| 3.5.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) | 57 |
| 3.5.2 Semipräparative Isolierung von enzymatischen Produkten unter Verwendung von Methylmalonyl-CoA als Extender | 58 |
| 3.5.3 Massenspektrometrie (MS) | 59 |
| 3.5.4 Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC-MS) | 61 |
| 3.5.5 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (HPLC-MS)..... | 62 |
| 3.5.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)..... | 63 |
| 4. Ergebnisse | 64 |
| 4.1 Chemische Synthesen | 64 |
| 4.1.1 Synthese von Malonyl-CoA | 64 |
| 4.1.2 Synthese des Diketidyl-NAC (S-(2-Acetamidoethyl)4-methyl-3-oxopentanthioat)..... | 65 |
| 4.1.3 Synthese des Triketidyl-NAC (S-(2-Acetamidoethyl)2,6-dimethyl-3,5-dioxoheptanthioat) | 69 |
| 4.2 Polyketidsynthesen aus <i>H. polyphyllum</i> | 74 |
| 4.2.1 Klonierung der Polyketidsynthase-cDNAs | 74 |
| 4.2.2 Qualitativer <i>in vitro</i> Aktivitätsnachweis rekombinanter Polyketidsynthesen | 76 |
| 4.2.2.1 Aktivität der PKS006 | 76 |
| 4.2.2.2 Aktivität der bifunktionellen Polyketidsynthase | 80 |
| 4.2.2.3 Aktivität weiterer Polyketidsynthesen | 82 |
| 4.2.3 Massenspektrometrische Aufklärung der enzymatischen Produkte unter Verwendung von Methylmalonyl-CoA als Extendersubstrat..... | 84 |
| 4.2.4 Aktivitätsnachweis von Polyketidsynthesen mit Methylmalonyl-CoA mittels Proteinrohextrakt aus Pflanzen | 88 |
| 4.3 Bifunktionelle Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i> | 89 |
| 4.3.1 Funktionelle Charakterisierung | 89 |
| 4.3.2 Genexpressionsanalyse | 98 |
| 4.3.3 Detektion von Biphenylen aus <i>H. polyphyllum</i> -Extrakten | 98 |



| | |
|---|------------|
| 4.3.4 Ortsgerichtete Mutagenese | 100 |
| 4.3.4.1 Auswahl aussichtsreicher Aminosäuren zur Mutation..... | 100 |
| 4.3.4.2 Einzelmutationen | 100 |
| 4.3.4.3 Doppelmutationen | 104 |
| 4.3.4.4 Dreifachmutationen..... | 106 |
| 4.3.5 Bestimmung der kinetischen Parameter der Doppelmutante S129T/V211M | 107 |
| 4.4 Genexpressionsanalysen von Typ III Polyketidsynthasen aus <i>H. per-</i> <i>foratum</i> | 109 |
| 4.4.1 Bioinformatische Vorabauswahl | 109 |
| 4.4.2 Genexpressionsanalyse | 110 |
| 5. Diskussion | 112 |
| 5.1 Hypothese zur Biosynthese von Hyperpolyphyllirin in <i>H. polyphyllum</i>..... | 112 |
| 5.2 Bifunktionelle Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i>..... | 115 |
| 5.2.1 Einordnung der bifunktionellen Polyketidsynthase als Benzoyl-CoA- spezifische Typ III Polyketidsynthase | 115 |
| 5.2.2 Mutagenesen zur Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen für die verschiedenen Kondensationsmechanismen im aktiven Zentrum..... | 117 |
| 5.2.3 Funktionelle Charakterisierung der bifunktionellen Polyketidsynthase..... | 119 |
| 5.2.3.1 Einfluss verschiedener Kationen und Anionen auf die Aktivität | 119 |
| 5.2.3.2 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Aktivität und das Produktverhältnis von 2,4,6-Trihydroxybenzophenon und 3,5-Di- hydroxybiphenyl..... | 120 |
| 5.2.3.3 Substratspezifität | 121 |
| 5.2.3.4 Kinetische Parameter der bifunktionellen Polyketidsynthase sowie ihrer S129T/V211M Doppelmutante | 122 |
| 5.3 Genexpression von Typ III Polyketidsynthasen aus <i>H. perforatum</i> | 123 |
| 5.4 Ausblick..... | 125 |
| 6. Zusammenfassung..... | 127 |
| 7. Literatur | 129 |



| | |
|---|------------|
| 8. Anhang | 142 |
| 8.1 Polyketidsynthese-Sequenzen..... | 142 |
| 8.1.1 Polyketidsynthese-Sequenzen für die Genexpressionsanalyse in <i>H. perforatum</i> | 142 |
| 8.1.2 Polyketidsynthese-Sequenzen aus <i>H. polyphyllum</i> | 144 |
| 8.1.3 Proteinsequenzen des phylogenetischen Verwandtschaftsbaums..... | 149 |
| 8.2 Alignment der Proteinsequenzen von BF-PKS mit HaBPS, HsBPS, MdBIS3 und SaBIS..... | 155 |
| 8.3 Zusätzliche Analytik-Daten..... | 156 |
| 8.3.1 HPLC-Untersuchung der bifunktionellen Polyketidsynthese mit Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA..... | 156 |
| 8.3.2 HPLC-Untersuchung der PKS006 und der bifunktionellen Polyketidsynthese aus <i>H. polyphyllum</i> mit den Extendersubstraten Malonyl-CoA, Methylmalonyl-CoA und der Kombination aus Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA..... | 157 |
| 8.3.2.1 HPLC-Untersuchung der PKS006..... | 157 |
| 8.3.2.2 HPLC-Untersuchungen der bifunktionellen Polyketidsynthese..... | 160 |
| 8.3.3 Gaschromatogramm des Alkan-Gemisches | 163 |



Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abbildung 1: Verteilung von <i>Hypericum</i> weltweit | 1 |
| Abbildung 2: <i>Hypericum perforatum</i> L. | 2 |
| Abbildung 3: PPAPs (A) und Naphthodianthrone (B) aus <i>H. perforatum</i> | 4 |
| Abbildung 4: Flavonoide (A) und Amentoflavin (B) aus <i>H. perforatum</i> | 5 |
| Abbildung 5: Xanthone aus <i>H. perforatum</i> | 6 |
| Abbildung 6: <i>H. polyphyllum</i> während der Blüte..... | 7 |
| Abbildung 7: Hyperpolyphyllirin (A) und Hyperforin (B)..... | 7 |
| Abbildung 8: Mechanismus der decarboxylierenden Claisen-Kondensation der Polyketidsynthesen..... | 8 |
| Abbildung 9: Typ III PKS in der KEGG GENES Datenbank | 10 |
| Abbildung 10: Strukturformel von Coenzym A mit einem Acyl-Rest (R) | 11 |
| Abbildung 11: Typ III PKS unterteilt nach Anzahl der Zyklisierungen..... | 12 |
| Abbildung 12: Chalkonsynthase-katalysierte Biosynthese von Naringenin-Chalkon sowie <i>in vitro</i> Nebenprodukte..... | 13 |
| Abbildung 13: Benzophenonsynthase-katalysierte Biosynthese von 2,4,6-Tri- hydroxybenzophenon | 15 |
| Abbildung 14: Struktur von Sampsonion A | 16 |
| Abbildung 15: Strukturen prenylierter Xanthone | 17 |
| Abbildung 16: Biosynthese von 1,3,5- und 1,3,7-Trihydroxybenzophenon..... | 18 |
| Abbildung 17: Stilbensynthase-katalysierte Biosynthese von Resveratrol | 19 |
| Abbildung 18: Phytoalexine der Malinae..... | 20 |
| Abbildung 19: Biphenylsynthase-katalysierte Biosynthese von 3,5-Dihydroxy- biphenyl..... | 20 |
| Abbildung 20: Methylierte Polyketide..... | 22 |
| Abbildung 21: Vektorkarten | 28 |
| Abbildung 22: Reaktionsschema der Synthese von Malonyl-Coenzym A | 52 |
| Abbildung 23: Reaktionsschema der Synthese des Diketidyl-NAC..... | 54 |
| Abbildung 24: Reaktionsschema des erfolgreichen Teils der Synthese des Tri- ketidyl-NAC | 56 |
| Abbildung 25: Reaktionsschema des nicht erfolgreichen Teils der Synthese des Triketidyl-NAC | 56 |
| Abbildung 26: HPLC-Chromatogramme des synthetisierten Malonyl-CoA (A) und der Referenz (B)..... | 64 |
| Abbildung 27: MS-Analyse der 5-Isobutyrylmeldrumsäure (7) | 65 |
| Abbildung 28: MS-Analyse des Diketidyl-NAC (9) | 66 |
| Abbildung 29: GC-MS-Analyse des Methyl-4-methyl-3-oxopentanoat (10) | 69 |



| | |
|--|----|
| Abbildung 30: Nebenreaktion zur Bildung des 4-Hydroxy-6-isopropyl-2 <i>H</i> -pyran-2-on | 70 |
| Abbildung 31: MS-Analyse des Methyl-2-(2-isopropyl-1,3-dioxan-2-yl)acetat (12) | 70 |
| Abbildung 32: MS-Analyse der 2-(2-Isopropyl-1,3-dioxan-2-yl)essigsäure (13) | 71 |
| Abbildung 33: HPLC-MS-Analyse des 5-(2-(2-Isopropyl-1,3-dioxan-2-yl)acetyl)-2,2,5-trimethyl-1,3-dioxan-4,6-dion (16) | 72 |
| Abbildung 34: HPLC-MS-Analyse des S-(2-Acetamidoethyl)-4-(2-isopropyl-1,3-dioxan-2-yl)-2-methyl-3-oxobutanthioat (17) | 73 |
| Abbildung 35: Ergebnisse der enzymatischen Synthese von Produkten unter Verwendung von Benzoyl-CoA als Startersubstrat, Methylmalonyl-CoA als Extendersubstrat und der PKS006 | 85 |
| Abbildung 36: Ergebnisse der enzymatischen Synthese von Produkten unter Verwendung von Diketidyl-NAC als Startersubstrat, Methylmalonyl-CoA als Extendersubstrat und der PKS006 | 86 |
| Abbildung 37: Ergebnisse der enzymatischen Synthese von Produkten unter Verwendung von Isobutyryl-CoA als Startersubstrat, Methylmalonyl-CoA als Extendersubstrat und der PKS006 | 87 |
| Abbildung 38: Bestimmung der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon und Biphenyl unter variablen Inkubationsbedingungen | 89 |
| Abbildung 39: Bestimmung der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon und Biphenyl unter Einfluss der Inkubationstemperatur | 90 |
| Abbildung 40: Bestimmung der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon (A) und Biphenyl (B) unter Einfluss des pH-Wertes | 91 |
| Abbildung 41: Bestimmung der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon (A) und Biphenyl (B) unter Einfluss steigender Konzentrationen verschiedener Kationen | 92 |
| Abbildung 42: Bestimmung der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon und Biphenyl unter variablen Inkubationsbedingungen | 93 |
| Abbildung 43: Vergleich der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon und Biphenyl unter Verwendung von Kaliumdihydrogenphosphat- und Magnesiumsulfat-Puffer bei 37 °C und 45 °C | 94 |



Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|-----|
| Abbildung 44: Bestimmung der relativen Enzymaktivität der BF-PKS bei der Bildung von Benzophenon und Biphenyl unter steigenden Dithiothreitol (DTT) Konzentrationen..... | 94 |
| Abbildung 45: Bestimmung der Substratspezifität der BF-PKS..... | 95 |
| Abbildung 46: Enzymatische Biosyntheseprodukte der BF-PKS unter Verwendung verschiedener Starter-Substrate | 96 |
| Abbildung 47: Genexpression von <i>BF-PKS</i> in Wurzel, Spross und Blatt von <i>H. polyphyllum</i> | 98 |
| Abbildung 48: Ergebnisse der GC-MS-Untersuchung eines Extraktes der Wurzel von <i>H. polyphyllum</i> | 99 |
| Abbildung 49: Ausschnitt aus dem Vergleich der Proteinsequenz der bifunktionellen PKS (BF-PKS) von Position 75 bis 233 mit einer Benzophenonsynthase aus <i>Hypericum androsaemum</i> (HaBPS), einer Benzophenonsynthase aus <i>Hypericum sampsonii</i> (HsBPS), einer Biphenylsynthase aus <i>Malus domestica</i> (MdBIS3) und einer Biphenylsynthase aus <i>Sorbus aucuparia</i> (SaBIS)..... | 100 |
| Abbildung 50: Phylogenetischer Verwandtschaftsbaum von Typ III Polyketidsynthase-Proteinsequenzen aus <i>H. perforatum</i> | 109 |
| Abbildung 51: Genexpression von <i>PKS006</i> (A), <i>PKS009</i> (B), <i>HpCHS</i> (C), <i>HpOKS</i> (D), <i>HpPKS1</i> (E) in junger Wurzel, alter Wurzel, jungem Blatt, altem Blatt, Spross, Knospe, Blüte und Frucht von <i>H. perforatum</i> | 111 |
| Abbildung 52: Biosynthese-Hypothese von 3-Methylphorisorbutyrophenon, der Kernstruktur von Hyperpolyphyllirin | 113 |
| Abbildung 53: Biosynthese von 2,4,6-Trihydroxybenzophenon und 3,5-Dihydroxybiphenyl durch BPS (Benzophenonsynthase), BIS (Biphenylsynthase) und BF-PKS (bifunktionelle PKS) | 115 |
| Abbildung 54: <i>In vitro</i> Produkte der BF-PKS mit Benzoyl-CoA und Malonyl-CoA..... | 116 |

**Tabellenverzeichnis**

| | |
|--|----|
| Tabelle 1: Pharmakologische Wirkungen von Hyperforin..... | 3 |
| Tabelle 2: Pharmakologische Wirkungen von Hypericin | 4 |
| Tabelle 3: Pharmakologische Wirkungen von Flavonoiden aus <i>H. perforatum</i> | 5 |
| Tabelle 4: Aminosäuren im aktiven Zentrum der Benzophenonsynthese aus <i>H. androsaemum</i> L..... | 16 |
| Tabelle 5: Pharmakologische Wirkungen von polyprenylierten Benzophenonen | 17 |
| Tabelle 6: Pharmakologische Wirkungen von Xanthonen..... | 18 |
| Tabelle 7: Oligonukleotide zur ortsgerichteten Mutagenese der BF-PKS..... | 24 |
| Tabelle 8: Oligonukleotide zur Amplifizierung der ausgewählten Gene für die qPCR | 25 |
| Tabelle 9: Oligonukleotide zur Amplifizierung von Polyketid-Synthasen aus <i>H. polyphyllum</i> | 26 |
| Tabelle 10: Oligonukleotide für 3'-RACE-PCR zur Gewinnung von Polyketid-Syn- thasen aus <i>H. polyphyllum</i> | 26 |
| Tabelle 11: Oligonukleotide für RACE-Anwendungen | 27 |
| Tabelle 12: Oligonukleotide für die qPCR-Analyse | 27 |
| Tabelle 13: Zusammensetzung der Kulturmedien | 29 |
| Tabelle 14: Starter-Substrate zur Aktivitätstestung von Polyketidsynthasen..... | 29 |
| Tabelle 15: Extender-Substrate zur Aktivitätstestung von Polyketidsynthasen | 30 |
| Tabelle 16: Referenzsubstanzen zum qualitativen und quantitativen Nachweis der Enzymaktivität..... | 30 |
| Tabelle 17: Zusammensetzung des Vanillin-Schwefelsäure-Reagenzes | 30 |
| Tabelle 18: Verwendete Software..... | 31 |
| Tabelle 19: Temperaturprogramm der reversen Transkription..... | 33 |
| Tabelle 20: Zusammensetzung eines Standard-Ansatzes einer PCR mit <i>Taq</i> - Polymerase | 33 |
| Tabelle 21: Zusammensetzung eines Standard-Ansatzes einer PCR mit Phusion Hot Start II DNA-Polymerase..... | 34 |
| Tabelle 22: Temperaturprogramm einer PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase | 34 |
| Tabelle 23: Temperaturprogramm einer PCR mit Phusion Hot Start II DNA-Poly- merase..... | 34 |
| Tabelle 24: Temperaturprogramm einer <i>Touchdown</i> -PCR mit <i>Taq</i> -Polymerase..... | 35 |
| Tabelle 25: Temperaturprogramm einer <i>Touchdown</i> -PCR mit Phusion Hot Start II DNA-Polymerase | 35 |
| Tabelle 26: Temperaturprogramm einer Mutations-PCR | 37 |
| Tabelle 27: Temperaturprogramm für die qPCR..... | 37 |
| Tabelle 28: Zusammensetzung des 50x TAE-Puffers..... | 39 |



Tabellenverzeichnis

| | |
|--|----|
| Tabelle 29: Zusammensetzung des 6x Nukleinsäure-Ladepuffers..... | 39 |
| Tabelle 30: Zusammensetzung des 10x TBE-Puffers..... | 39 |
| Tabelle 31: Zusammensetzung eines Restriktionsverdaus..... | 40 |
| Tabelle 32: Zusammensetzung der Dephosphorylierung linearisierter Expressionsplasmide..... | 40 |
| Tabelle 33: Zusammensetzung des Ansatzes zur DNA-Ligation..... | 41 |
| Tabelle 34: Zusammensetzung der Puffer zur Plasmidisolaton..... | 43 |
| Tabelle 35: Zusammensetzung der Puffer zur Aufreinigung rekombinanter Proteine mittels Immobilisierte-Metallchelate-Affinitätschromatographie.... | 45 |
| Tabelle 36: Ansatz für zwei SDS-Polyacrylamidgele..... | 46 |
| Tabelle 37: Zusammensetzung des 5x SDS-PAGE-Ladepuffers..... | 46 |
| Tabelle 38: Zusammensetzung des SDS-PAGE-Laufpuffers..... | 46 |
| Tabelle 39: Zusammensetzung der Coomassie-Färbelösung..... | 47 |
| Tabelle 40: Zusammensetzung des Bradford-Reagenzes..... | 47 |
| Tabelle 41: Zusammensetzung eines Standard-Enzymaktivitätsansatzes mit Proteinhextrakt aus <i>E. coli</i> | 48 |
| Tabelle 42: Zusammensetzung eines Standard-Enzymaktivitätsansatzes mit Proteinhextrakt aus Pflanzen..... | 49 |
| Tabelle 43: Zusammensetzung eines Standard-Enzymaktivitätsansatzes mit aufgereinigtem Enzym..... | 49 |
| Tabelle 44: Zusammensetzung des Standard-Enzymaktivitätsansatzes zur funktionellen Charakterisierung der BF-PKS..... | 50 |
| Tabelle 45: Zusammensetzung des Fließmittelgradienten verschiedener HPLC-Methoden..... | 58 |
| Tabelle 46: Massenspektrometrische Einstellungen bei der Vermessung von Produkten aus den chemischen Synthesen..... | 59 |
| Tabelle 47: Massenspektrometrische Einstellungen bei der Vermessung der enzymatischen Produkte unter Verwendung von Benzoyl-CoA (B-CoA) und Methylmalonyl-CoA (MM-CoA)..... | 60 |
| Tabelle 48: Massenspektrometrische Einstellungen bei der Vermessung der enzymatischen Produkte unter Verwendung von Diketidyl-NAC (D-NAC) und Methylmalonyl-CoA (MM-CoA)..... | 60 |
| Tabelle 49: Massenspektrometrische Einstellungen bei der Vermessung der enzymatischen Produkte unter Verwendung von Isobutyryl-CoA (I-CoA) und Methylmalonyl-CoA (MM-CoA)..... | 61 |
| Tabelle 50: Zusammensetzung des Fließmittelgradienten der HPLC-MS Methode.... | 62 |
| Tabelle 51: Massenspektrometrische Einstellungen der HPLC-MS Methode..... | 62 |



| | |
|--|-----|
| Tabelle 52: Diketidyl-NAC in Keto- und Enol-Form sowie die Ergebnisse des 1D- ¹ H-NMR-Spektrums..... | 67 |
| Tabelle 53: Ergebnisse des ¹ H, ¹ H-COSY (<i>correlated spectroscopy</i>)-Spektrums | 67 |
| Tabelle 54: Ergebnisse der 1D- ¹³ C und 2D- ¹ H- ¹³ C-NMR-Spektren | 68 |
| Tabelle 55: Übersicht der aus <i>H. polyphyllum</i> amplifizierten Polyketidsynthese-Sequenzen, der verwendeten Oligonukleotid-Paare und der Identität ihrer Aminosäuresequenzen mit denen aus <i>H. perforatum</i> | 75 |
| Tabelle 56: Ergebnisse des Ansatzes der Polyketidsynthese PKS006 mit dem Startersubstrat Benzoyl-CoA und dem Extendersubstrat Malonyl-CoA | 77 |
| Tabelle 57: Ergebnisse des Ansatzes der Polyketidsynthese PKS006 mit dem Startersubstrat Benzoyl-CoA und dem Extendersubstrat Methylmalonyl-CoA | 78 |
| Tabelle 58: Ergebnisse des Ansatzes der Polyketidsynthese PKS006 mit dem Startersubstrat Diketidyl-NAC und dem Extendersubstrat Malonyl-CoA..... | 78 |
| Tabelle 59: Ergebnisse des Ansatzes der Polyketidsynthese PKS006 mit dem Startersubstrat Diketidyl-NAC und dem Extendersubstrat Methylmalonyl-CoA | 79 |
| Tabelle 60: Ergebnisse des Ansatzes der Polyketidsynthese PKS006 mit dem Startersubstrat Isobutyryl-CoA und dem Extendersubstrat Malonyl-CoA..... | 79 |
| Tabelle 61: Ergebnisse des Ansatzes der Polyketidsynthese PKS006 mit dem Startersubstrat Isobutyryl-CoA und dem Extendersubstrat Methylmalonyl-CoA | 80 |
| Tabelle 62: Ergebnisse des Ansatzes der BF-PKS mit dem Startersubstrat Benzoyl-CoA und dem Extendersubstrat Malonyl-CoA | 81 |
| Tabelle 63: Übersicht der Aktivität der aus <i>H. polyphyllum</i> rekombinant hergestellten Polyketidsynthasen | 83 |
| Tabelle 64: Untersuchung der Enzymkinetik der BF-PKS in Bezug auf die Bildung des Benzophenons | 97 |
| Tabelle 65: Untersuchung der Enzymkinetik der BF-PKS in Bezug auf die Bildung des Biphenyls..... | 97 |
| Tabelle 66: Effizienz der qPCR-Primer für <i>BF-PKS</i> und das Referenzgen <i>Aktin</i> | 98 |
| Tabelle 67: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Einzelmutationen der BF-PKS in die korrespondierenden Aminosäuren der Benzophenonsynthasen an den Positionen 129, 194 und 211..... | 101 |



| | |
|---|-----|
| Tabelle 68: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Einzelmutationen der BF-PKS in die korrespondierenden Aminosäuren der Biphenylsynthasen an den Positionen 129, 194 und 211 | 102 |
| Tabelle 69: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Einzelmutationen der BF-PKS an der Position 129 | 103 |
| Tabelle 70: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Einzelmutationen der BF-PKS an der Position 211 | 104 |
| Tabelle 71: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Doppelmutationen der BF-PKS in die korrespondierenden Aminosäuren der Benzophenonsynthasen an den Positionen 129, 194 und 211 | 105 |
| Tabelle 72: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Doppelmutationen der BF-PKS in die korrespondierenden Aminosäuren der Biphenylsynthasen an den Positionen 129, 194 und 211 | 106 |
| Tabelle 73: Mengen der enzymatischen Produkte Benzophenon, Biphenyl, Triketid-Nebenprodukt (Triketid-NP) und Tetraketid-Nebenprodukt (Tetraketid-NP) als Resultat der Dreifachmutationen der BF-PKS in die korrespondierenden Aminosäuren der Benzophenon- und Biphenylsynthasen an den Positionen 129, 194 und 211 | 107 |
| Tabelle 74: Untersuchung der Enzymkinetik der Doppelmutante S129T/V211M der BF-PKS in Bezug auf die Bildung des Benzophenons..... | 108 |
| Tabelle 75: Effizienz der qPCR-Primer für <i>PKS006</i> , <i>HpCHS</i> , <i>HpOKS</i> , <i>HpPKS1</i> , <i>PKS009</i> und der Referenzgene <i>Aktin</i> und <i>Tubulin</i> | 110 |



Formelverzeichnis

| | |
|---|----|
| Formel 1: Berechnung der Effizienz der qPCR-Primer | 38 |
| Formel 2: Berechnung der relativen Quantität des interessierenden Gens | 38 |
| Formel 3: Berechnung der relativen Quantität des Referenzgens..... | 38 |
| Formel 4: Berechnung der normalisierten Expression des interessierenden Gens | 38 |
| Formel 5: Berechnung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Test..... | 47 |
| Formel 6: Sättigungsfunktion eines Enzyms nach der Michaelis-Menten-Beziehung. | 50 |
| Formel 7: Berechnung der Benzophenonmasse..... | 50 |
| Formel 8: Berechnung der Biphenylmasse..... | 50 |
| Formel 9: Berechnung der Masse der Nebenprodukte | 50 |
| Formel 10: Kovats-Index | 61 |