



---

## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Einleitung</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Johanniskräuter – <i>Hypericum</i></b> .....                    | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Echtes Johanniskraut – <i>Hypericum perforatum</i> L. ....       | 1         |
| 1.1.2 Polster-Johanniskraut – <i>Hypericum polyphyllum</i> .....       | 6         |
| <b>1.2 Polyketidsynthesen</b> .....                                    | <b>8</b>  |
| 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        |
| <b>1.3 Ziele der Arbeit</b> .....                                      | <b>23</b> |
| <br>   |           |
| <b>2. Material</b> .....   | <b>24</b> |
| 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        |
| <br>   |           |
| <b>3. Methoden</b> .....   | <b>32</b> |
| <b>3.1 Molekularbiologische Methoden</b> .....                         | <b>32</b> |
| 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        |
| <b>3.2</b> | <b>Mikrobiologische Methoden .....</b>  | <b>42</b> |
| 3.2.1      | Erzeugung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> .....   | 42        |
| 3.2.2      | Transformation kompetenter <i>E. coli</i> .....   | 42        |
| 3.2.3      | Plasmidisolierung durch alkalische Lyse aus <i>E. coli</i> .....  | 42        |
| 3.2.4      | Kryokonservierung von <i>E. coli</i> .....  | 43        |
| <b>3.3</b> | <b>Biochemische Methoden .....</b>  | <b>44</b> |
| 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        |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>3.4 Chemische Synthesen</b> .....  | <b>52</b> |
| 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        |
| <b>3.5 Analytische Methoden</b> .....   | <b>57</b> |
| 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        |
| <b>4. Ergebnisse</b> .....  | <b>64</b> |
| <b>4.1 Chemische Synthesen</b> .....  | <b>64</b> |
| 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        |
| <b>4.2 Polyketidsynthesen aus <i>H. polyphyllum</i></b> .....   | <b>74</b> |
| 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        |
| <b>4.3 Bifunktionelle Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i></b> .....   | <b>89</b> |
| 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<br>S129T/V211M .....   | 107        |
| <b>4.4 Genexpressionsanalysen von Typ III Polyketidsynthasen aus <i>H. perforatum</i> .....</b>   | <b>109</b> |
| 4.4.1 Bioinformatische Vorabauswahl .....   | 109        |
| 4.4.2 Genexpressionsanalyse .....   | 110        |
| <b>5. Diskussion .....</b>  | <b>112</b> |
| <b>5.1 Hypothese zur Biosynthese von Hyperpolyphyllirin in <i>H. polyphyllum</i>.....</b>   | <b>112</b> |
| <b>5.2 Bifunktionelle Polyketidsynthase aus <i>H. polyphyllum</i>.....</b>  | <b>115</b> |
| 5.2.1 Einordnung der bifunktionellen Polyketidsynthase als Benzoyl-CoA-<br>spezifische Typ III Polyketidsynthase .....  | 115        |
| 5.2.2 Mutagenesen zur Untersuchung der strukturellen Voraussetzungen für<br>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<br>Produktverhältnis von 2,4,6-Trihydroxybenzophenon und 3,5-Di-<br>hydroxybiphenyl..... | 120        |
| 5.2.3.3 Substratspezifität .....  | 121        |
| 5.2.3.4 Kinetische Parameter der bifunktionellen Polyketidsynthase sowie<br>ihrer S129T/V211M Doppelmutante .....   | 122        |
| <b>5.3 Genexpression von Typ III Polyketidsynthasen aus <i>H. perforatum</i> .....</b>  | <b>123</b> |
| <b>5.4 Ausblick.....</b>  | <b>125</b> |
| <b>6. Zusammenfassung.....</b>  | <b>127</b> |
| <b>7. Literatur .....</b>   | <b>129</b> |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>8. Anhang .....</b>  | <b>142</b> |
| <b>8.1 Polyketidsynthese-Sequenzen.....</b>   | <b>142</b> |
| 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        |
| <b>8.2 Alignment der Proteinsequenzen von BF-PKS mit HaBPS, HsBPS, MdBIS3 und SaBIS.....</b>  | <b>155</b> |
| <b>8.3 Zusätzliche Analytik-Daten.....</b>  | <b>156</b> |
| 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        |