

AROMATISCHE PRENYLTRANSFERASEN AUS *HYPERICUM*-ARTEN:

Biosynthese (poly-)prenylierter Acylphloroglucin-
 Derivate im Johanniskraut

Tobias G. Fiesel



Aromatische Prenyltransferasen aus *Hypericum*-Arten:
Biosynthese (poly-)prenylierter Acylphloroglucin-Derivate im Johanniskraut





AROMATISCHE PRENYLTRANSFERASEN AUS *HYPERICUM*-ARTEN:

Biosynthese (poly-)prenylierter Acylphloroglucin-Derivate im Johanniskraut

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
Tobias Günther Fiesel
aus Stade



Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

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

1. Aufl. - Göttingen: Cuvillier, 2017

Zugl.: (TU) Braunschweig, Univ., Diss., 2016

1. Referent:	Professor Dr. Ludger Beerhues
2. Referent:	Professor Dr. Theo Lange
eingereicht am:	15.08.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am:	01.12.2016

Druckjahr 2017

Dissertation an der Technischen Universität Braunschweig,
Fakultät für Lebenswissenschaften

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2017

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, 2017

Gedruckt auf umweltfreundlichem, säurefreiem Papier aus nachhaltiger Forstwirtschaft.

ISBN 978-3-7369-9461-4

eISBN 978-3-7369-8461-5



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:

Publikationen

1. **FIESEL, T.**, GAID, M., MÜLLER, A., BARTELS, J., EL-AWAAD, I., BEUERLE, T., ERNST, L., BEHREND, S., BEERHUES, L.: Molecular Cloning and Characterization of a Xanthone Prenyltransferase from *Hypericum calycinum* Cell Cultures. *Molecules* 20(9): 15616–15630 (2015); doi:10.3390/molecules200915616

Tagungsbeiträge

Vorträge

1. **FIESEL, T.**, GAID, M., MÜLLER, A., BIEDERMANN, E., BEERHUES, L.: Klonierung und heterologe Expression von Prenyltransferasen aus Johanniskraut-Arten. 2. SynFoBiA-Kolloquium des PVZ, Braunschweig (2015)
2. **FIESEL, T.**, GAID, M., BEERHUES, L.: Klonierung und Expression von aromatischen Prenyltransferasen aus Johanniskraut-Arten. 4. Young Researcher Meeting – Phytotherapeutika in der aktuellen Forschung: Phytochemie, Pharmakologie und klinische Anwendungen, Münster (2015)
3. **FIESEL, T.**, GAID, M., MÜLLER, A., BEERHUES, L.: Molecular Investigation of Prenyltransferases Involved in Secondary Metabolism of *Hypericum* Species. 1st Eduard Strasburger-Workshop of the German Botanical Society, Nürnberg (2014)

Posterbeiträge

1. **FIESEL, T.**, GAID, M., BARTELS, J., MÜLLER, A., BEHREND, S., BEERHUES, L.: Molecular Cloning and Characterization of a Xanthone Prenyltransferase from *Hypericum calycinum* Cell Cultures. 4. SynFoBiA-Kolloquium des PVZ, Braunschweig (2016)
2. **FIESEL, T.**, GAID, M., MÜLLER, A., BEERHUES, L.: Klonierung und funktionelle Charakterisierung von Prenyltransferasen aus Johanniskraut-Arten. 1. SynFoBiA-Kolloquium des PVZ, Braunschweig (2014)
3. **FIESEL, T.**, MÜLLER, A., BEERHUES, L.: Molecular Investigation of Prenyltransferases Involved in Hyperforin Biosynthesis. Botanikertagung der Deutschen Botanischen Gesellschaft, Tübingen (2013)



*Du wirst Tage verbringen
An denen Zähne nicht knirschen
Deine Scheine ausreichen
Deine Schulden zu begleichen
Deine Augen nicht feucht sind
Du bekommst, was du bräuchtest –
Es wird passieren
Ich hoffe du weißt es!*

[Du bist den ganzen Weg gerannt – THEES UHLMANN, Tomte]



DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen Oktober 2011 und Juni 2016 am Institut für Pharmazeutische Biologie und dem Zentrum für Pharmaverfahrenstechnik der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig unter der Leitung von PROF. DR. LUDGER BEERHUES angefertigt.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater **PROF. DR. LUDGER BEERHUES** für sein entgegengebrachtes Vertrauen und die Überlassung des überaus herausfordernden, interessanten Themas. Ich danke ihm als Mentor zutiefst für seine ständige Unterstützung, dass er jederzeit ein offenes Ohr sowie stete Bereitschaft zu interessanten, motivierenden Fachdiskussionen fand und mir ein freies, kreatives Gestalten meiner wissenschaftlichen Arbeit ermöglichte.

Für die bereitwillige Übernahme des Zweitgutachtens spreche ich meinen großen Dank **PROF. DR. LANGE** (Institut für Pflanzenbiologie, TU Braunschweig) aus. **PROF. DR. SÖNKE BEHREND**S (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, TU Braunschweig) danke ich vielmals für den Vorsitz der Prüfungskommission.

Für ihre unersetzliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung, wann und in welcher Form auch immer benötigt, danke ich ganz herzlich **DR. MARIAM GAID**, die sich über die Promotionszeit nach und nach zu meiner Betreuerin entwickelt hat und wichtigen Anteil an dieser Arbeit trägt. Danke für all die wissenschaftlichen Diskussionen, hilfreichen Hinweise und Ideen zur Planung und Durchführung von Experimenten sowie ebenso für die konstruktive und ausgezeichnete Zusammenarbeit. **DR. ANDREAS MÜLLER** gebührt meine große Dankbarkeit für die praktische Einarbeitung in die projektbezogene Materie, gemeinsame Erarbeitung neuer Versuchsansätze und seine so wichtigen Vorarbeiten für die aktuellen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit. **DR. TILL BEUERLE** danke ich für seine Hilfestellung bei nahezu allen analytischen und Synthesefragen. Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern der **AG BEHREND**S (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, TU Braunschweig) für die angenehme und reibungslose Kooperation, insbesondere die Bemühungen rund um die zahlreichen Expressionsversuche.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen gegenwärtigen sowie ehemaligen Mitarbeitern/-innen meines Instituts und beteiligten Mitgliedern des PVZ-Verbundprojektes SynFoBiA, die meinen Weg begleitet haben und mit ihrem freundlichen, familiären Umgang ein so angenehmes Arbeitsklima geschaffen haben.

Insbesondere danke ich herzlichst **DR. RAINER LINDIGKEIT** für seine seelische und tatkräftige Unterstützung in hilfreichen Gesprächen, aber auch seine unzähligen erheiternden Anekdoten und unsere so überaus erfolgreiche und hervorragende Praktikumsbetreuung (*Pro Phyto!*); **DR. MAIKE VAN OHLEN**, **DR. LUISE BÜCKER**, **DR. FRAUKE GUMZ**, **DR. MARION WIGGERMANN**, **DR. MALTE GUMZ**, **NICO LANGER**, **ELINE BIEDERMANN**, **ANNA-MARIA HERFURTH** und allen Mitgliedern der FRUMP-Runde für zahlreiche wissenschaftliche Austausche, ihre uneingeschränkte Unterstützung, Hilfsbereitschaft und Loyalität, unbeschreibliche Konferenzfahrten, Exkursionen, Spielevents, Kittelverbrennungen, Geburtstagsfeiern, Laufevents, Pharmacup-Teilnahmen, Pharma-Partys, Krimidinner...; der zur **DONNERSTAGSGRUPPE** erweiterten FRUMP-Runde für all die tollen Treffen, Unternehmungen, Motto-Abende und die wunderbaren Freundschaften, die besonders auch die private Zeit neben der Promotion unvergesslich gemacht haben und für mich unvergänglich sein werden; meiner Lieblingsbüronachbarin **INES RAHAUS** für zahllose wissenschaftliche und ebenso viele fragwürdige bis unnötige, aber äußerst unterhaltsame Diskussionen jeglicher Art und Weise.



Ein sehr großer Dank geht auch an **DR. FLORIAN KÖLLING**, der mich in seiner Assistentenzeit „entdeckte“, durch viele legendäre Sessions – gute/schlechte, lange/kurze, langweilige/lustige, dramatische/harmonische, seriöse/Wäääh! – begleitete und dadurch ein wirklich guter Freund geworden ist, und schließlich maßgeblich zu meiner naturwissenschaftlich ausgerichteten Entwicklung inklusive der Entscheidung pro Promotion sowie meinen zukünftigen Karriereschritten beigetragen hat.

Und ich danke vielmals **DR. SABRINA WOLLENHAUPT** für ihre aufmunternden Worte und die fachlichen, aber auch zwischenmenschlichen Gespräche, die mir eine motivierende Unterstützung in wissenschaftlicher und zukunftsgerichteter Hinsicht gewesen sind und geholfen haben die vorliegende Arbeit anzugehen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei dem ehemaligen und aktuellen Team der Bahnhof-Apotheke in Wolfenbüttel – und speziell bei **DR. CHRISTIAN HANTELMANN**, der mir die Möglichkeit gab parallel zur Promotion das Apothekerhandwerk weiter zu betreiben und mir mit seinem Vertrauen, seinem Erfahrungsschatz und seiner Hilfe die Strapazen der Doktorarbeit ein gutes Stück erleichtert hat.

Nicht zuletzt ein ganz besonderes Dankeschön an meine Familie, meine großartige Freundin und all meine Liebsten/Nächsten zuhause, die mich bestmöglich mit ihrer Hilfe unterstützt haben, mit Geduld sowie größtem Verständnis oft und lange auf mich verzichten mussten und dennoch nicht müde wurden mich mit unzähligen lieben Worten zu ermuntern meinen Weg durch das Studium und die Promotion zu gehen.



INHALTSVERZEICHNIS

Vorveröffentlichungen der Dissertation	i
Danksagung	iii
Inhaltsverzeichnis	v
1 Einleitung und Grundlagen	1
1.1. Pflanzliche Phloroglucin-Derivate	1
1.2. Polycyclische polyprenylierte Acylphloroglucine	3
1.2.1. Bioaktivität und wissenschaftliches Interesse	4
1.2.2. Hyperforin	7
1.2.3. Biosynthese polycyclischer polyprenylierter Acylphloroglucine	10
1.3. Prenylierende Enzyme	12
1.4. Johanniskräuter – <i>Hypericum</i>	15
1.4.1. Echtes Johanniskraut – <i>Hypericum perforatum</i> L.	16
1.4.1.1. Botanik	17
1.4.1.2. Inhaltsstoffe (Sekundärstoffe)	18
1.4.1.3. Therapeutische Verwendung von Johanniskraut	20
1.4.2. Großkelchiges Johanniskraut – <i>Hypericum calycinum</i> L.	21
2 Zielsetzung	22
3 Materialien	23
3.1. Geräte und Hilfsmittel	23
3.2. Chemikalien, (Bio-)Reagenzien und Enzyme	25
3.3. Reagenzsysteme	26
3.4. Puffer und Lösungen	26
3.5. Pflanzen (-zellkultur)	28
3.6. Klonierungs- und Expressionsorganismen	28
3.7. (Zell-)Kulturmedien	29
3.8. DNA: Oligonukleotide und Plasmide	30
3.9. Verwendete Software und Online-Tools	34
4 Methoden	35
4.1. Kultivierung und Elicitor-Behandlung von Zellsuspensionskulturen	35
4.2. Chemische Synthesen	35
4.2.1. Synthese von Dimethylallyldiphosphat	35
4.2.2. Synthese von Phlorisobutyrophenon	36
4.2.3. Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	37
4.3. Molekularbiologische Untersuchung von Prenyltransferase-Genen	39
4.3.1. Transkriptom-Analysen	39
4.3.2. Extraktion von Gesamt-RNA	41
4.3.2.1. RNA-Extraktion mit kommerziellen Kits	41
4.3.2.2. RNA-Extraktion mit TRIzol®-Reagenz	41
4.3.2.3. RNA-Extraktion mittels Lithiumchlorid-Fällung	42
4.3.3. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	42
4.3.4. cDNA-Synthese durch reverse Transkription	43
4.3.4.1. Reverse Transkription	43
4.3.4.2. Reverse Transkription für RACE-geeignete cDNA	43



4.3.5.	Polymerase-Kettenreaktion	44
4.3.5.1.	<i>Standard-PCR</i>	45
4.3.5.2.	<i>Proofread-PCR</i>	45
4.3.5.3.	<i>Touchdown-PCR</i>	46
4.3.5.4.	<i>Verlängerung von cDNA-Fragmenten: RACE-PCR</i>	47
4.3.6.	Agarose-Gelelektrophorese	47
4.3.6.1.	<i>DNA-Gelelektrophorese</i>	47
4.3.6.2.	<i>RNA-Gelelektrophorese</i>	48
4.3.6.3.	<i>Isolierung von DNA aus Agarose-Trenngelen</i>	48
4.3.7.	Ligations-Vorbereitungen und Ligation von DNA	48
4.3.7.1.	<i>T/A-Klonierung</i>	48
4.3.7.2.	<i>Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA</i>	48
4.3.7.3.	<i>Dephosphorylierung von DNA</i>	49
4.3.7.4.	<i>Ligation von DNA</i>	49
4.3.8.	Transformation (Bakterien und Hefe)	51
4.3.8.1.	<i>Präparation chemisch kompetenter Bakterien</i>	51
4.3.8.2.	<i>Transformation chemisch kompetenter Bakterien</i>	51
4.3.8.3.	<i>Präparation kompetenter Hefezellen</i>	52
4.3.8.4.	<i>Transformation kompetenter Hefezellen</i>	52
4.3.9.	Anzucht und Lagerung als Dauerkulturen	52
4.3.9.1.	<i>Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von E. coli</i>	52
4.3.9.2.	<i>Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von S. cerevisiae</i>	53
4.3.10.	Extraktion von Plasmid-DNA	53
4.3.10.1.	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	53
4.3.10.2.	<i>Isolierung von Plasmid-DNA aus S. cerevisiae</i>	54
4.3.11.	DNA-Sequenzierung und Auswertung	54
4.3.12.	Phylogenie	54
4.4.	Proteinexpression	54
4.4.1.	Proteinexpression in Hefezellen	55
4.4.1.1.	<i>Kultivierung von genetisch modifizierten Hefezellen</i>	55
4.4.1.2.	<i>Induktion von Hefezellen</i>	55
4.4.2.	Proteinexpression im Insektenzell-Baculovirus-System	55
4.4.2.1.	<i>Kultivierung von Sf9-Zellen</i>	55
4.4.2.2.	<i>Herstellung von rekombinanten Bacmiden</i>	56
4.4.2.3.	<i>Herstellung von rekombinanten Baculoviren</i>	56
4.4.2.4.	<i>Infektion von Insektenzellen</i>	57
4.5.	Biochemische Methoden	57
4.5.1.	Proteinextraktion aus Hefezellen	57
4.5.2.	Proteinextraktion aus Insektenzellen	57
4.5.3.	Bestimmung der Proteinkonzentration	58
4.5.4.	Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen	58
4.5.5.	<i>In vitro</i> -Aktivitätsuntersuchungen	59
4.5.5.1.	<i>Charakterisierung der Prenyltransferase HcPT aus H. calycinum-Zellsuspensionskulturen</i>	61
4.5.5.2.	<i>Enzymatische Synthese von 1,3,6,7-TH8PX für die NMR-Spektroskopie</i>	61
4.6.	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	62
4.7.	Analytik mittels Flüssigchromatographie	63
4.7.1.	Verwendete Fließmittel-Systeme	63
4.7.2.	Semipräparative Isolierung von 1,3,6,7-TH8PX	63
4.8.	Analytik mittels Massenspektrometrie	64
4.9.	Analytik mittels Kernspinresonanzspektroskopie	64

5	Ergebnisse	65
5.1.	Chemische Synthesen	65
5.1.1.	Synthese von Dimethylallyldiphosphat	65
5.1.2.	Synthese von Phlorisobutyrophenon	66
5.1.3.	Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	68
5.2.	(Bioinformatische) Vorab-Charakterisierung von Prenyltransferase-Genen	71
5.2.1.	Überlassene Prenyltransferase-Sequenzen aus vorherigen Arbeiten	71
5.2.2.	Prenyltransferase-Sequenzen aus vier analysierten <i>H. perforatum</i> -Transkriptomen	72
5.2.3.	Pflanzliche aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen: Aufbau und Eigenschaften	73
5.2.3.1.	<i>Generelle Proteinstruktur der AS-PTs aus Johanniskraut</i>	73
5.2.3.2.	<i>Vorhergesagte Struktur-Charakteristika von AS-PTs aus Johanniskraut</i>	76
5.2.3.3.	<i>Subzelluläre Lokalisierung von HcPT-2</i>	79
5.2.3.4.	<i>Phylogenetische Untersuchung von AS-PTs aus Johanniskraut</i>	80
5.3.	RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial	82
5.4.	Klonierung von Prenyltransferase-Genen	84
5.4.1.	Prenyltransferase HcPT	85
5.4.2.	Prenyltransferase HcPT-1	85
5.4.3.	Prenyltransferase HcPT-2 und Varianten	86
5.4.3.1.	<i>Klonierung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen</i>	86
5.4.3.2.	<i>Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen</i>	87
5.4.3.3.	<i>Fluoreszenzmarkierung von HcPT-2 und HcPT-2_oT</i>	88
5.4.4.	Prenyltransferase HpPT-1 und eine Variante	89
5.4.4.1.	<i>Entwurf degenerierter Primer anhand konservierter PT-Motive</i>	89
5.4.4.2.	<i>Klonierung der Volllänge-PT HpPT-1 für Expressionsuntersuchungen</i>	90
5.4.4.3.	<i>Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen</i>	92
5.4.5.	Prenyltransferase HpPT-2	92
5.4.6.	Prenyltransferase HpPT-3	93
5.4.7.	Prenyltransferase HpPT-4	94
5.4.8.	Prenyltransferase HpPT-5	95
5.4.9.	Prenyltransferase HpPT-6	96
5.4.10.	Prenyltransferase HpPT-7	97
5.4.11.	Prenyltransferase HpPT-8	98
5.4.12.	Prenyltransferase HpPT-9	98
5.5.	Expressionsanalyse von Prenyltransferasen	99
5.5.1.	Prenyltransferase-Expressionssysteme	99
5.5.2.	Versuche der Expressionskontrolle durch denaturierende Protein-Gelelektrophorese	100
5.6.	Qualitativer Nachweis rekombinanter Prenyltransferase-Aktivität	101
5.6.1.	Ausbleibende Aktivität in Hefezellen	101
5.6.2.	Prenyltransferase-Aktivität in Insektenzellen	101
5.6.3.	Aktive HcPT aus Sf9-Zellen	103
5.6.3.1.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes als 1,3,6,7-TH8PX</i>	103
5.6.3.2.	<i>Charakterisierung der rekombinanten HcPT</i>	106
5.6.3.3.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes „P2“ als Patulon</i>	109
5.6.3.4.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,7-THX</i>	112
5.6.3.5.	<i>Aktivitätsnachweis mit 1,3,5,6-THX</i>	113
5.6.4.	Aktive HcPT-1 aus Sf9-Zellen	114
5.6.5.	Aktive HcPT-2 aus Sf9-Zellen	114
5.6.6.	Aktive HpPT-1 aus Sf9-Zellen	117
5.6.7.	Aktive HpPT-2 und HpPT-6 aus Sf9-Zellen	117



5.6.7.1.	Aktivitätsnachweis von HpPT-2 mit PIBP und Strukturanalyse des Produktes „P2“	118
5.6.7.2.	Aktivitätsnachweis von HpPT-6 mit dem monogerynylierten Produkt von HpPT-2	121
5.6.8.	Aktive HpPT-5 aus Sf9-Zellen	123
5.6.9.	Aktive HpPT-8 aus Sf9-Zellen	124
6	Diskussion	126
6.1.	Aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen	126
6.2.	Heterologe Expression membranassoziierter Prenyltransferasen	130
6.3.	Aktivität aromatischer Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen aus Johanniskraut-Arten	135
6.3.1.	Die Hyperforin-Biosynthese	135
6.3.2.	Xanthon-spezifische Prenyltransferasen	141
7	Zusammenfassung und Ausblick	150
8	Verzeichnisse / Auflistungen	152
8.1.	Abkürzungen	152
8.2.	Abbildungen	156
8.3.	Formeln	157
8.4.	Tabellen	158
9	Literatur	159
10	Anhang	177
10.1.	DC-Dokumentation	177
10.1.1.	Cellulose-DC-Fertigplatten der Synthese von DMAPP	177
10.1.2.	Kieselgel-DC-Fertigplatten der Aufreinigung von 1,3,6,7-THX	177
10.2.	Prenyltransferase-Sequenzen	178
10.3.	Alignment aller AS-PT-Sequenzen aus Johanniskraut und publizierter pflanzlicher AS-PTs	179
10.4.	Zusätzliche Analytik-Daten	180
10.4.1.	HPLC-Untersuchung von Elicitor-behandelten <i>H. calycinum</i> -Zellsuspensionskulturen	180
10.4.2.	MS-Untersuchung der Referenzsubstanz Patulon aus <i>H. calycinum</i> -Zellsuspensionskulturen	181
10.4.3.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HcPT-1	182
10.4.4.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-1	182
10.4.5.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-5	183
10.4.6.	HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-8	184



1 EINLEITUNG UND GRUNDLAGEN

1.1. Pflanzliche Phloroglucin-Derivate

Das dreiwertige Phenol Phloroglucin (1,3,5-Trihydroxybenzol) ist das strukturelle Grundgerüst einer Vielzahl von bedeutenden Naturstoffklassen, die ubiquitär im Pflanzenreich, v.a. in Asteraceae, Cannabaceae, Clusiaceae, Euphorbiaceae, Fagaceae, Hypericaceae, Myrtaceae, Rosaceae und Rutaceae sowie bei Pilzen, marinen Lebewesen und Mikroorganismen zu finden sind^[1]. Derivate des Phloroglucins sind insbesondere für Pflanzen, die permanent an ihren Standort und die dort vorherrschenden Bedingungen gebunden sind, wichtige phytochemische Stoffwechselprodukte. Diese werden entweder konstitutiv oder als Reaktion auf akute äußere Umwelteinflüsse gebildet und dienen den Pflanzen zur Interaktion mit der Außenwelt, v.a. der Anlockung von Bestäubern durch Farb-/Duftstoffe, der chemischen Verteidigung gegen Pathogene und Fressfeinde (Herbivoren) sowie dem Schutz vor UV-Strahlung und Verdunstung. Bezeichnet werden derart funktionelle Metabolite als Sekundärstoffe, Sekundärmetabolite oder sekundäre Pflanzenstoffe – Produkte des pflanzlichen oder mikrobiellen Sekundärmetabolismus, die nicht zwingend existenziell für den sie produzierenden Organismus sind, sondern ihm (Selektions-)Vorteile zum Überleben am Standort und bei der Vermehrung/Fortbestand bieten^[2]. Im Gegensatz dazu ist der Primärstoffwechsel, der generell in jedem einzelnen Organismus die Aufgabe lebensnotwendiger Prozesse wie Wachstum, Entwicklung und Energiehaushalt übernimmt, absolut essentiell und unentbehrlich.

In der Natur vorkommende Phloroglucin-Derivate zeichnen sich durch eine erstaunliche strukturelle Diversität aus (Abbildung 1.1). Die vielfältigen Variationen kommen durch unterschiedliche Substitutionsmuster der Phenolgruppen und der unbesetzten, freien C-Atome am zentralen Grundkörper zustande. Neben funktionellen Gruppen und einzelnen Heteroatomen können zwischen einer und vier Kohlenstoff-Seitenketten in Form von aliphatischen bzw. aromatischen Acylresten oder unterschiedlich langen und verzweigten Prenylresten angeknüpft werden, z.T. unter Aufhebung des aromatischen Charakters des Phloroglucins. Weiterhin sind Cyclisierungen angeknüpfter Seitenketten hin zur Ausbildung benachbarter Ringsysteme ebenso wie die Verbindung zu überbrückten Käfigstrukturen keine Seltenheit. Bis heute sind mehr als 700 natürlich vorkommende Phloroglucin-Derivate bekannt^[3].

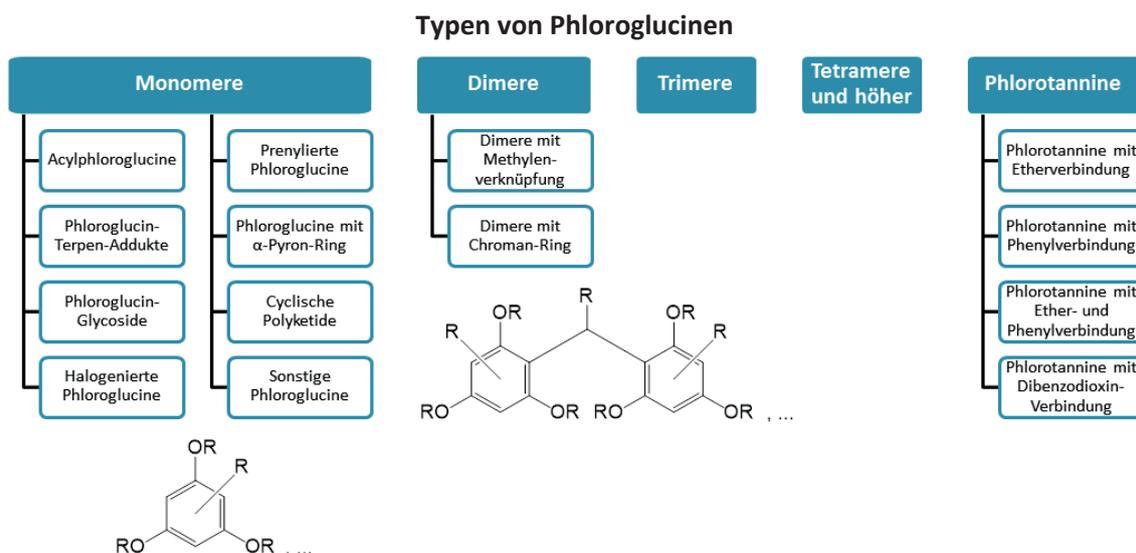


Abbildung 1.1 Klassifizierung von natürlich vorkommenden Phloroglucin-Derivaten nach Kondensationsgrad, Verknüpfung und Substitutionsmuster (nach SINGH & BHARATE^[1]) inkl. des allgemeinen Grundgerüsts monomerer und dimerer Phloroglucine

Alle pflanzlichen Phloroglucin-Derivate werden phytochemisch zu der großen und sehr heterogenen Naturstoffgruppe der Polyketide gezählt. Sie entstehen nach dem Biosynthese-Schema des Acetat-Malonat-Weges („Polyketidweges“) und werden enzymatisch durch sich wiederholende, decarboxylierende Claisen-Kondensationen eines aktivierten Acyl-Starter-Moleküls mit einem ebenfalls aktivierten Extender aufgebaut^[4–7]. Im Fall der **Acylphloroglucine (APs)**, welche die größte Gruppe aller Phloroglucin-Derivate in Pflanzen ausmachen, ist die Startereinheit immer eine mit Coenzym A (CoA) veresterte Carbonsäure, meist abgeleitet von einer Aminosäure. An deren reaktives Carbonyl-C-Atom wird von einer Typ III-Polyketid-Synthase (Typ III-PKS), einer pflanzlichen Acyltransferase, die für die Bildung aromatischer Polyketid-Verbindungen verantwortlich ist, in drei aufeinander folgenden Elongationsschritten jeweils eine durch Decarboxylierung von Malonyl-CoA (seltener auch Methylmalonyl-CoA) gewonnene Acetyl-Verlängerungseinheit kondensiert. Durch C–C-Verknüpfungen entsteht bei diesem sequenziellen Kohlenstoffketten-Aufbau ein lineares β -Polyketoacyl-CoA als Zwischenstufe, welches dann in einer intramolekularen Dieckmann-Kondensation zum AP-Grundgerüst cyclisiert^[8,9].

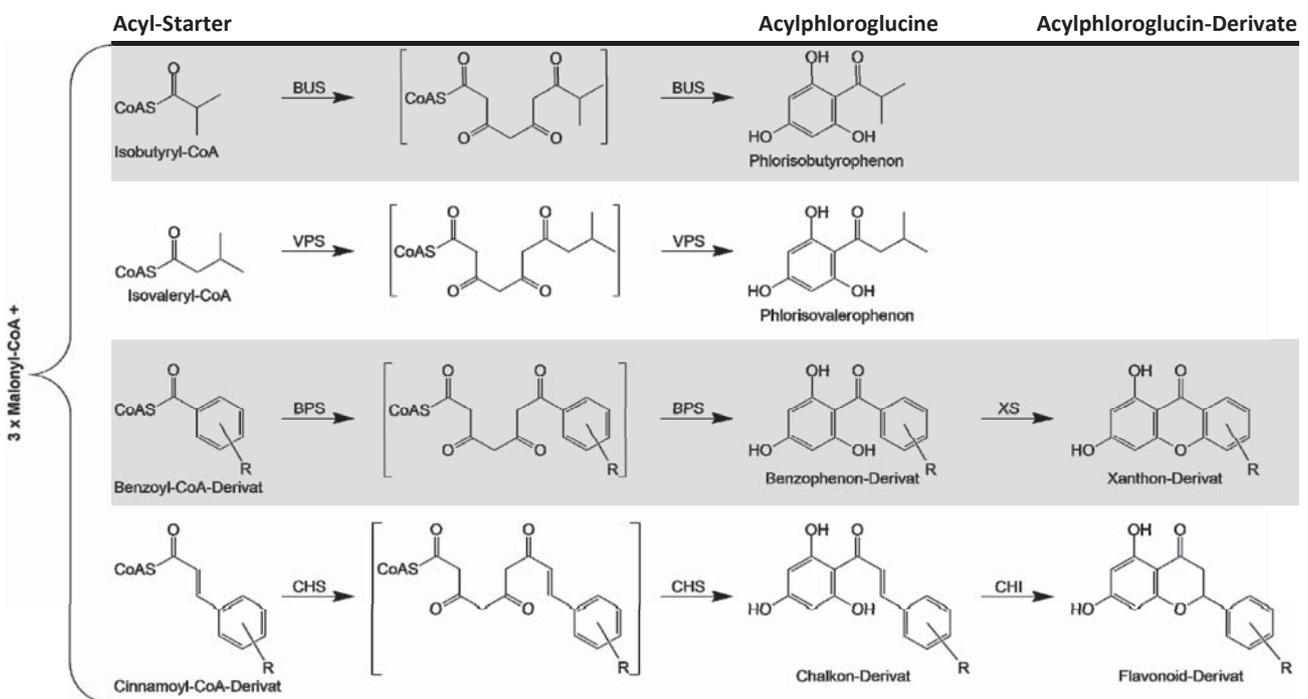


Abbildung 1.2 Vereinfachtes Biosynthese-Schema von APs und AP-Derivaten. BPS: Benzophenon-Synthase; BUS: Isobutyrophenon-Synthase; CHI: Chalkon-Isomerase; CHS: Chalkon-Synthase; CoAS: Coenzym A-Thioester; VPS: Isovalerophenon-Synthase; XS: Xanthon-Synthase

Die Struktur des eingesetzten, aktivierten Starter-Moleküls legt beim Polyketidweg bereits grundlegend fest, zu welcher Naturstoffgruppe mit Phloroglucin-Grundgerüst die Biosynthese führen kann (Abbildung 1.2). Ausgehend von kurzkettigen aliphatischen Ausgangsstoffen wie Isobutyryl-, Isovaleryl-, 2-Methylbutyryl-, Acetyl- oder Propionyl-CoA werden strukturell entsprechende C-Substituenten an Acylphloroglucinen erhalten, während aromatische Acyl-Starter wie (Hydroxy-)Benzoyl-CoA zu dem Diphenylketon-Grundgerüst der Benzophenone führen^[10,11]. Diese stellen einerseits eine eigene Sekundärstoffgruppe dar, fungieren auf der anderen Seite aber auch als eine Zwischenstufe in der Xanthon-Biosynthese. Durch einen zusätzlichen enzymatischen Ringschluss, katalysiert durch eine Cytochrom P450-Oxidoreduktase, reagiert das Benzophenon unter Ausbildung eines cyclischen Ethers weiter zum Dibenzo- γ -pyron-Grundgerüst der Xanthone^[12–15]. Zwei weitere, ans Phloroglucin angelehnte Naturstoffgruppen können ausgehend von einem Phenylpropan-Derivat auf dem gemischten Polyketidweg gewonnen werden. Aus aktivierten Phenyl-



propansäuren wie beispielsweise Cinnamoyl-, *p*-Cumaroyl- oder Caffeoyle-CoA, die sich von den aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin oder Tyrosin) aus dem Shikimisäure-Weg ableiten, entstehen die natürlichen Chalkone (Benzylidenacetophenone). Kommt es im weiteren Verlauf durch eine Isomerase zu einem intramolekularen Ringschluss zwischen dem Phloroglucin und der ungesättigten Seitenkette, so entsteht mit dem Flavanon (2-Phenylchroman-4-on) die zentrale Grundstruktur aller Flavonoide^[16–18].

Wie für den überwiegenden Großteil aller natürlich vorkommenden Polyketide gilt typischerweise auch im Fall der zuvor beschriebenen APs und davon abgeleiteten Derivate (Abbildung 1.2), dass ihre Grundstrukturen in den Organismen, in denen sie gebildet werden, äußerst selten frei und unsubstituiert vorliegen. Stattdessen stellen sie hauptsächlich phytochemische Zwischenstufen auf dem Biosyntheseweg hin zu weitaus komplexeren Sekundärstoffen dar. Dabei werden die Grundgerüste mittels diverser Modifizierungsreaktionen wie Hydroxylierungen, Glycosylierungen, Reduktionen/Oxidationen, Methylierungen, Prenylierungen und Cyclisierungen strukturell zu den finalen Sekundärmetaboliten umgesetzt.

1.2. Polycyclische polyprenylierte Acylphloroglucine

Anhand der nachträglichen Veränderungen der zentralen chemischen Struktur eines Naturstoffes ist in der Regel leicht nachzuvollziehen, von welchem Biosyntheseweg oder von welcher zentralen Vor-/Zwischenstufe er sich ableitet. Es gibt jedoch in der Natur ebenso eine Fülle von sekundären Metaboliten, die nicht nur einfache Modifizierungen durchlaufen, sondern mit Kombinationen bzw. mehrfach wiederholten Reaktionen umgeformt werden. Aus den zuvor beschriebenen, chemisch eher einfach aufgebauten APs geht mit den **polycyclischen polyprenylierten Acylphloroglucinen (PPAPs)** eine solche Naturstoffklasse komplexer pflanzlicher Verbindungen hervor. Bis zum Jahr 2005 wurden erst 119 PPAPs aus Gattungen der Hypericaceae und Clusiaceae sowie verwandten Pflanzenfamilien der Clusioide-Klade isoliert und strukturell beschrieben. Diese Anzahl hat sich durch ein gesteigertes naturwissenschaftliches Interesse an diesen Substanzen (siehe 1.2.1) bis heute mit annähernd 300 identifizierten Naturstoffen mehr als verdoppelt^[19].

PPAPs zeichnen sich durch eine faszinierende (stereo-)chemische Architektur aus – ein Bicyclo[3.3.1]nona-2,4,9-trion (deutlich seltener ein Bicyclo[3.2.1]octa-2,4,8-trion) als überbrückte Kernstruktur, dekoriert mit sauerstoffhaltigen funktionellen Gruppen und unterschiedlichen Prenyl- und Acylresten^[20,21]. Anhand ihrer isomeren Formen werden alle bekannten PPAPs nach ihrem Substitutionsmuster in die Typen A–C eingeteilt (Abbildung 1.3). Eine wichtige Rolle spielen dabei die Positionen der Acyl-Seitenkette und eines asymmetrisch substituierten C-Atoms (Stereozentrum) im Bicyclus, in direkter Nachbarschaft zu einem der beiden Brückenkopf-C-Atome. Befindet sich nach der von CIOCHINA & GROSSMAN^[22] vorgeschlagenen Nomenklatur das stereogene C-Atom (C–8) unmittelbar neben der acylierten Brückenkopfposition (C–1), so werden die Verbindungen dem am häufigsten auftretenden Typ A zugeordnet. Beim Typ B, der immerhin noch halb so häufig zu finden ist, wandert ausschließlich der Acylsubstituent vom Brückenkopf an die vinyloge Position C–3. Der sehr selten auftretende Typ C hat hingegen das quartäre Zentrum an Position C–6, so dass es der Acylkette am Brückenkopf-Atom (C–1) gegenüberliegt. Für die Entstehung dieser drei unterschiedlichen Arten von PPAPs werden keine zufälligen An-/Umlagerungsreaktionen am bicyclischen Kern verantwortlich gemacht, sondern es wird eigens das postulierte Biosynthese-Schema, das im Anschluss an die allgemeine Vorstellung näher dargestellt wird (siehe 1.2.3), zur Erklärung herangezogen.

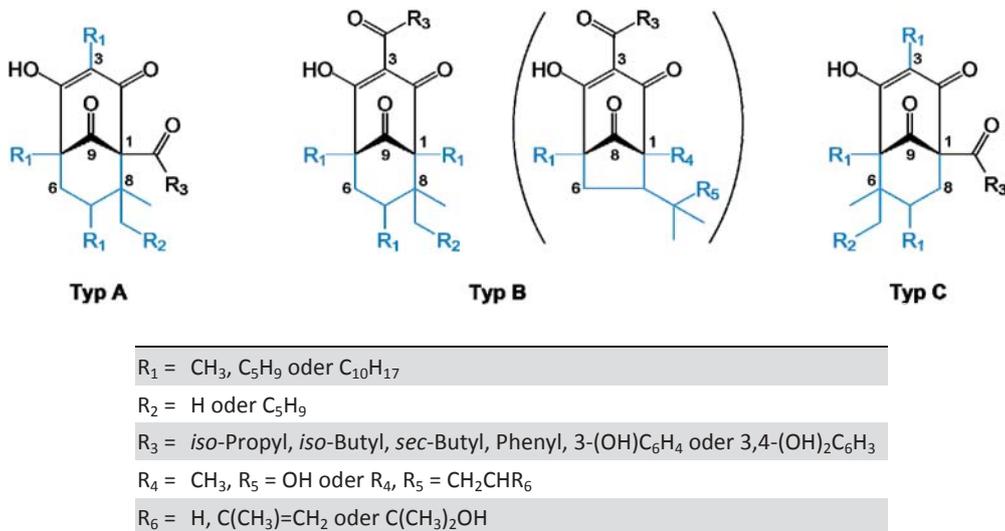


Abbildung 1.3 Strukturelle Einteilung von PPAPs (Typ A–C) anhand ihres bicyclischen Grundgerüsts

1.2.1. Bioaktivität und wissenschaftliches Interesse

Viele Vertreter der PPAP-Naturstofffamilie entspringen Pflanzen, die schon lange und traditionell zur Behandlung von unterschiedlichen Beschwerden und Krankheiten eingesetzt werden. Das naturwissenschaftliche Interesse an den wirksamkeitsbestimmenden Bestandteilen in diesen Pflanzen bzw. ihren Zubereitungen ist daher nicht ganz neu und unbegründet. Die Idee, einzelne Komponenten eines Sekundärstoffgemisches zu isolieren und als mögliche neue Arzneistoffe zu testen, ist dementsprechend auch beinahe genauso alt wie die Wirkstoffforschung selbst. Durch immer weiter verbesserte Extraktions- und Analysetechniken sind folglich in den letzten Jahren immer mehr PPAPs entdeckt worden, und das pharmazeutische Interesse an diesen Monosubstanzen mit ihren vermuteten, interessanten Bioaktivitäten stieg nochmals mit der Aussicht, mögliche neue Arzneistoffe zu finden. Die vorangetriebene Strukturaufklärung isolierter PPAPs und die anschließende Untersuchung ihrer pharmakologischen Eigenschaften zeigt in der Tat großes klinisches Potential, da für sie bereits u.a. antibakterielle (selbst gegen MRSA), antiprotozoische (gegen Malaria, Leishmaniose und Chagas-Krankheit), antikanzerogene, anti-neurodegenerative sowie auch antivirale (gegen HIV und HBV) Aktivitäten beschrieben sind. Eine ausführliche, aktuelle Übersicht der nachweislich als signifikant bioaktiv getesteten PPAPs (Tabelle 1.1) sowie eine Sammlung ausgewählter Molekülformeln (Abbildung 1.4) sind auf den nachfolgenden Seiten illustriert. Einer der bekanntesten und bioaktivsten Naturstoffe aus der Gruppe der PPAPs ist das **Hyperforin** (siehe 1.2.2) aus dem Echten Johanniskraut (siehe 1.4.1), welches Wirksamkeit bei unzähligen, breit gefächerten Aktivitätstests zeigt und sowohl als Bestandteil von apothekenpflichtigen als auch verschreibungspflichtigen Phytopharmaka und Pflegeprodukten in Deutschland und Europa angewendet wird. Aufgrund seiner Sonderstellung und seiner Relevanz in der Pharmakotherapie lohnt es sich, die Eigenschaften des Hyperforins im nächsten Abschnitt detaillierter zu betrachten.

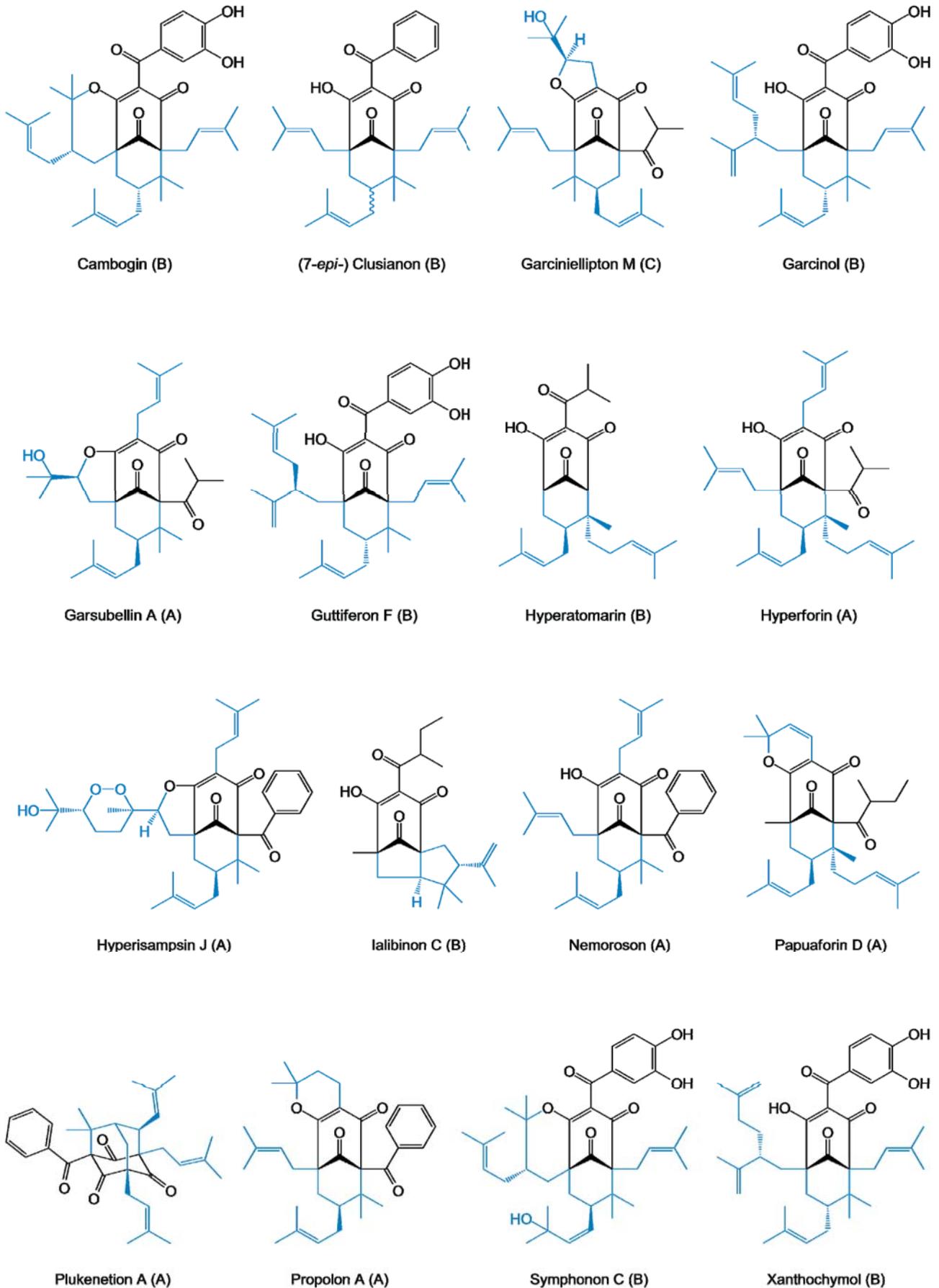


Abbildung 1.4 Strukturformeln ausgewählter, bioaktiver pflanzlicher PPAPs. (A/B/C): PPAP-Typ nach Grundgerüst

Tabelle 1.1 Übersicht ausgewählter, bioaktiver pflanzlicher PPAPs

Name (PPAP)	Biologische Aktivität (Wirkung und Target)
Aristophenon A	zytotoxisch (SW-480-Zellen; Darmkrebs) ^[23]
Cambogin	zytotoxisch (HT-29 / HCT116-Zellen; Darmkrebs) ^[24]
Chamon I	antibakteriell (gegen <i>Paenibacillus larvae</i> und <i>Paenibacillus alvei</i>) ^[25]
7- <i>epi</i> -Clusianon	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antiviral (HIV) (humane, HIV-1 infizierte C8166-T-Zellen)^[26,27] ▪ antiprotozoisch (gegen <i>Trypanosoma cruzi</i> und <i>Leishmania amazonensis</i>)^[28,29]
Clusianon	zytotoxisch (HeLa-, MIA-PaCa-2-, MCF7-Zellen; Cervix-, Pankreas- und Brustkrebs) ^[30]
Coccinon A–H	antiprotozoisch (gegen <i>Plasmodium falciparum</i> FcB1) ^[31]
Garcicowin C, D	zytotoxisch (HT-29 / HCT116-Zellen; Darmkrebs) ^[24]
Garcinalipton A–D	zytotoxisch (A549-, DU145-Zellen; Lungen-, Prostatakrebs) ^[32]
Garciellipton FB	zytotoxisch (MCF-7-, Hep 3B-, HT-29-Zellen; Brust-, Leber-, Darmkrebs) ^[33]
Garciellipton FC	antiprotozoisch (gegen Leishmanien) ^[34]
Garciellipton F, I, L, M	antiphlogistisch (Hemmung von β -Glucuronidase- und Histamin-Ausschüttung) ^[35,36]
Garcinol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antibakteriell (gegen MRSA)^[37] ▪ zytotoxisch (Hemmung der Topoisomerasen I und II)^[38] ▪ antioxidativ (chemopräventiv als Radikalfänger)^[39–41] ▪ zytotoxisch (MDA-MB-231 / BT-549-, BxPC-3 / Panc-1-, HL-60-Zellen; Brustkrebs, Pankreaskarzinom, Leukämie)^[42–44]
Garsubellin A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antiphlogistisch (Hemmung von β-Glucuronidase- und Histamin-Ausschüttung)^[45] ▪ antidementiv (Induktion der Cholin-Acetyltransferase)^[46]
Guttiferon A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antimikrobiell (gegen <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Plasmodium falciparum</i>, <i>Trypanosoma cruzi</i> und <i>Leishmania amazonensis</i>)^[28,47–49] ▪ antioxidativ (bei oxidativem Stress und als Radikalfänger)^[50]
Guttiferon A–F	antiviral (HIV) (gegen HIV-1) ^[51,52]
Guttiferon B, E, G, H, K	zytotoxisch (A2780-, HT-29 / HCT116 / SW-480-Zellen; Ovarial-, Darmkrebs) ^[23,24,53,54]
Hyperascyron C, G	zytotoxisch (HL60-Zellen; akute myeloische Leukämie) ^[55]
Hyperatomarin	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antibakteriell (gegen <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Micrococcus luteus</i> und <i>Bacillus subtilis</i>)^[56] ▪ zytotoxisch (LAMA-84 / K-562 / SKW-3-, U-266-, DOHH-2-, HD-MY-Z-, EJ-, MCF-7-Zellen; Leukämie, multiples Myelom, Non-Hodgkin-Lymphom, Hodgkin-Lymphom, Blasen-, Brustkrebs)^[57]
Hyperattenin K	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antiviral (HIV) (humane, HIV-1 infizierte C8166-T-Zellen)^[58] ▪ zytotoxisch (HL-60-, A549-Zellen; Leukämie, Brustkrebs)^[58]
Hypercohin K	<ul style="list-style-type: none"> ▪ zytotoxisch (HL-60-, SMMC-7721-, A-549-, MCF-7-Zellen; Leukämie, Leber-, Lungen-, Brustkrebs)^[59] ▪ antidementiv (Hemmung der Acetylcholinesterase)^[59]
Hyperforin	siehe 1.2.2 ^[60]
Hyperguinon B	antioxidativ (bei oxidativem Stress und als Radikalfänger) ^[61]
Hyperibon J, K, L	zytotoxisch (A549-, MCF-7-Zellen; Lungen-, Brustkrebs) ^[27]



Tabelle 1.1, fortgesetzt

Name (PPAP)	Biologische Aktivität (Wirkung und Target)	
Hyperisampsin H–M	zytotoxisch	(HL60 / NB40-Zellen; Leukämie) ^[62]
Hypermongon G	antiphlogistisch	(Hemmung von NO-Produktion) ^[63]
Hypersampson D–F	antiviral (HBV)	(Inhibierung des Virus-Antigens) ^[64]
Hypersubon B	zytotoxisch	(HeLa-, Eca109-, HepG2-, A549-Zellen; Cervix-, Ösophagus-, Leber, Lungenkrebs) ^[65]
Hyperuralon C–D	antidementiv	(Hemmung der Acetylcholinesterase) ^[66]
Ialibinin A–D	antibakteriell	(gegen <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> und <i>Micrococcus luteus</i>) ^[67]
Ialibinin E	antioxidativ	(bei oxidativem Stress und als Radikalfänger) ^[61]
Laxifloranon	antiviral (HIV)	(gegen Zellinfizierung) ^[68]
7- <i>epi</i> -Nemoroson	zytotoxisch	(LNCaP-Zellen; Prostatakrebs) ^[69]
Nemoroson	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antiviral (HIV) (humane, HIV-1 infizierte C8166-T-Zellen)^[26,47,70] ▪ zytotoxisch (Jurkat-, MCF-7 / MDA-MB-231-, PC-3-, HeLa-, MIA-PaCa-2 / Capan-1 / AsPC-1-, Hep-2-Zellen; Leukämie, Brust-, Prostata-, Cervix-, Pankreas-, Kehlkopfkrebs)^[30,71–74] ▪ antimikrobiell (u.a. gegen <i>Staphylococcus aureus</i>)^[75] ▪ antiprotozoisch (gegen <i>Plasmodium falciparum</i> und <i>Trypanosoma cruzi</i>)^[47] 	
Nemoroson II	antibakteriell	(gegen <i>Paenibacillus larvae</i> und <i>Paenibacillus alvei</i>) ^[25]
Papuaforin A, C, D, E	zytotoxisch	(KB-Zellen; Cervixkrebs) ^[76]
Plukenetion A	antiviral (HIV)	(gegen HIV-1) ^[70]
Propolon A	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antiviral (HIV) (humane, HIV-1 infizierte C8166-T-Zellen)^[26] ▪ antibakteriell (gegen <i>Streptomyces chartrensis</i> und <i>Streptomyces violochromogenes</i>)^[77] 	
Sampsonion A, I	zytotoxisch	(P388-Zellen; Leukämie) ^[78]
Symphonon A–I	antiprotozoisch	(gegen <i>Plasmodium falciparum</i>) ^[79]
Vismiaphenon D	antiviral (HIV)	(gegen HIV-1) ^[80]
Xanthochymol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ antibakteriell (gegen MRSA)^[37] ▪ zytotoxisch (Hemmung der Topoisomerasen I und II)^[38] ▪ zytotoxisch (SW-480 / HCT116 / HT29-Zellen; Darmkrebs)^[23,53] 	

1.2.2. Hyperforin

Das äußerst lipophile und instabile PPAP Hyperforin ist ein natürlich vorkommender Pflanzensekondärstoff, der bereits in den 1970er Jahren aus dem **Echten Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L.**; siehe 1.4.1) isoliert und identifiziert wurde^[81,82]. Es ist der Hauptinhaltsstoff von *H. perforatum* und gehört strukturell zu den PPAPs vom Typ A. Hyperforin akkumuliert im ätherischen Öl von *H. perforatum*, und zwar sowohl in den durchscheinenden Ölbehältern der vegetativen Blätter als auch verstärkt in durchscheinenden Kanälen der Blüten und Früchte^[83,84]. Über die zeitliche Entwicklung der Pflanze hinweg steigt mit zunehmendem Alter auch der durchschnittliche Hyperforingehalt im Echten Johanniskraut an, bis er ein Maximum in den unreifen Früchten mit bis zu 8,5% des Trockengewichts ausmacht^[85,86]. Neben Hyperforin kommen mit dem Derivat Adhyperforin und den postulierten Vorstufen Hyperfirin und Adhyperfirin noch

weitere strukturverwandte PPAPs vor, die jedoch mengenmäßig kein bedeutendes Ausmaß in der Pflanze bzw. deren Extrakten einnehmen^[87]. Außerdem sind noch weitere PPAPs, die strukturell Oxidationsprodukte des thermolabilen, oxidationsempfindlichen und photosensiblen Hyperforins darstellen, beschrieben^[88,89]. Es ist jedoch zweifelhaft, ob derartige Derivate wie beispielsweise Furohyperforin wirklich genuin im Johanniskraut vorkommen oder als Abbauprodukte des Hyperforins erst während der Extraktion aus dem Pflanzenmaterial oder bei der Lagerung entstehen^[90].

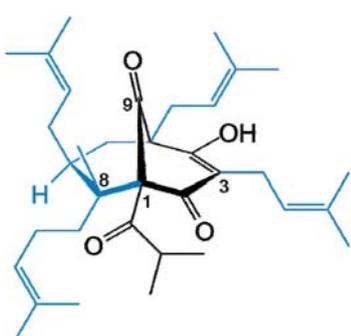
Strukturformel	Wirkung	Quelle	
 <p>Hyperforin</p>	antidepressiv	[91–95]	
	antibakteriell	[76,96–99]	
	antiinflammatorisch	[100–103]	
	neuroprotektiv	[91,104–106]	
	antiproliferativ	antitumoral	[107–109]
	antileukämisch		[110–113]
	antimetastatisch		[109,114]
	proapoptotisch		[107,115–117]
	antiangiogenetisch		[118–120]
	larvizid / antiplasmodisch	[90,121,122]	
	anti-autoimmun	[123]	

Abbildung 1.5 Übersicht nachgewiesener Hyperforin-Bioaktivitäten (*in vitro* und *in vivo*)

Nach zahlreichen Untersuchungen von Johanniskraut-Extrakten auf deren pharmazeutisch wirksame Bestandteile wird Hyperforin heutzutage in vielerlei Hinsicht als der wichtigste und potenteste Inhaltsstoff genannt. Sein vielfältiges pharmakologisches Potential (siehe Abbildung 1.5 und dort erwähnte Original-literatur) wird hauptsächlich in der Anwendung von Johanniskraut-Extrakten bei leichter bis mittelschwerer Depression ausgeschöpft. Antriebslosigkeit, gebremstes Empfinden von Freude und Hoffnung sowie emotionale Anteilnahmslosigkeit sind typische Symptome dieser psychischen Erkrankung, die multifaktoriell ausgelöst wird, jedoch immer mit einer Verarmung an sowie einem entgleisten Zusammenspiel und einer gestörten Signalübertragung von Neurotransmittern (NTs; „Monoamin-Mangel-Hypothese“) zusammenhängt^[124]. Nachdem anfänglich fälschlicherweise Hypericin für die antidepressive Wirkung von Johanniskraut-Extrakten verantwortlich gemacht wurde^[125], konnte um die Jahrtausendwende der Beweis erbracht werden, dass stattdessen – wenn auch nicht ausschließlich – Hyperforin die antidepressive Komponente ist^[126]. Bis heute beweisen zahlreiche darauf aufbauende Untersuchungen mit reinem Hyperforin an Zellkulturmodellen und (isolierten) neuronalen Geweben, dass die einzigartige Wirkung hochspezifisch über eine Interaktion mit dem nichtselektiven Ionenkanal TRPC6 (*engl.* transient receptor potential channel) vermittelt wird. Durch ligandengebundene Aktivierung dieses TRPC6 kommt es zum Ioneneinstrom von Na⁺ und Ca²⁺ in Nervenzellen, wodurch die intrazellulären Konzentrationen beider Ionen ansteigen. Als entscheidende Folge davon verringert sich der transmembranäre Na⁺-Gradient, der eine treibende Kraft der unspezifischen Wiederaufnahme von NTs aus dem synaptischen Spalt ist^[127,128]. Weil im Gegensatz zum Mechanismus synthetischer, nicht-selektiver Monoamin-Wiederaufnahmehemmer (*engl.* non selective monoamine reuptake inhibitor, NSMRI) also nicht-kompetitiv spezifische NT-Transporter präsynaptisch blockiert werden, wirkt sich der außergewöhnliche Hyperforin-Effekt auf ein viel breiteres Spektrum an NTs aus^[129]. Die Konzentrationen von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, γ -Aminobuttersäure (GABA) und L-Glutamat im synaptischen Spalt werden gleichermaßen beeinflusst, was in einem komplexen Zusammen-



spiel nachfolgend zu adaptiven Veränderungen (u.a. postsynaptische Rezeptordichte und Signaltransduktionsmechanismen) führt und letztlich die antidepressive Wirkung bedingt. Da allerdings auch Hyperforin-armen Johanniskraut-Extrakten ein antidepressiver Effekt nachzusagen ist^[130–133], muss vom derzeitigen Stand der Forschung immer noch davon ausgegangen werden, dass Hyperforin zwar entscheidend, aber letztlich nur im Zusammenspiel mit anderen Sekundärstoffen im Gesamtextrakt des Johanniskrauts für die Wirkung als Antidepressivum verantwortlich ist.

In mikrobiellen Untersuchungen weist Hyperforin ausgeprägte antibakterielle Eigenschaften gegen grampositive Bakterien – darunter sogar multiresistente Problemstämme wie MRSA – auf, was einen Erklärungsansatz für den traditionellen Einsatz von Johanniskraut-Extrakten bei äußerlichen Verletzungen wie Brand-, Schnitt- und Schürfwunden bietet. Dazu wird sich zusätzlich auch die entzündungshemmende Wirkqualität von Hyperforin, die sich auf eine Hemmung der proinflammatorischen Enzyme Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Arachidonat-5-Lipoxygenase (5-LO) zurückführen lässt, in topischen Johanniskraut-Zubereitungen bei entzündlichen Hauterkrankungen (z.B. atopisches Ekzem, chronische Dermatitis) zunutze gemacht. Weiterhin ahmt Hyperforin über den erhöhten Ca^{2+} -Einstrom die zentralnervösen, neurotrophen Effekte von Nerven-Wachstumsfaktoren (NGF und BDNF) nach, verringert Astroglie und die Aktivierung von Mikroglia-Zellen, kann die Aktivierung vom neurotoxischen Amyloid-Vorläuferprotein (*engl. amyloid precursor protein*, APP) vermindern und ist sogar fähig, *in vitro* senile Plaques des β -Amyloid-Peptids abzubauen. All diese neuroprotektiven Wirkungen machen Hyperforin zu einer äußerst interessanten, möglicherweise zukünftigen Behandlungsoption neurodegenerativer Erkrankungen wie beispielsweise der Alzheimer-Krankheit. Darüber hinaus ist Hyperforin ein äußerst potenter antitumoraler Wirkstoff, der an vielen isolierten Zelllinien, aber auch *in vivo* in Tierversuchen sein Potential als Zytostatikum bewiesen hat. Durch Unterdrückung von Tumor-bedingter Angiogenese und Induktion von Apoptose in entarteten Zellen wirkt es antiproliferativ und hemmt sowohl das Krebswachstum als dass es auch die Metastasierung einschränken kann. Aufgrund der antiproliferativen Eigenschaften, gepaart mit der antientzündlichen Wirkkomponente, befinden sich Hyperforin-haltige Formulierungen ebenfalls in der Erforschung neuer Therapieoptionen bei Psoriasis und verwandten Dermatitisformen. Außer den genannten Charakteristika wurden in einzelnen Studien noch eine gute Wirksamkeit von Hyperforin und einigen seiner Analoga gegen den Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* und gegen Larven der Gemeinen Stechmücke entdeckt.

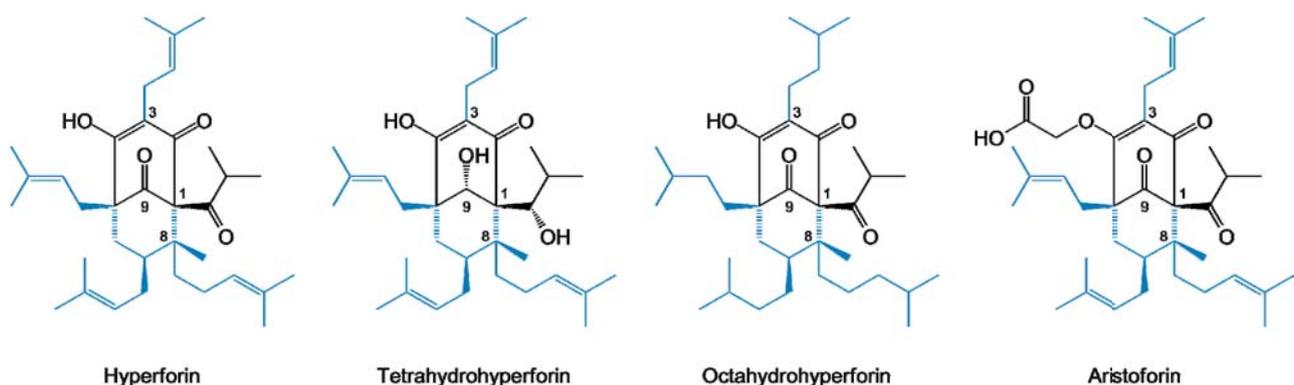


Abbildung 1.6 Hyperforin und hydrophilere, semisynthetische Hyperforin-Derivate

Bei all den positiven Anwendungsbeispielen treten problematischer Weise jedoch auch Schwierigkeiten in der Anwendung und der Verfügbarkeit auf. Wegen seiner hohen Lipophilie ist Hyperforin schlecht löslich in pharmazeutischen/therapeutischen Trägersystemen (fest/halbfest/flüssig), und seine stabilitätsrelevante Anfälligkeit gegenüber Wärme, UV-Licht, Sauerstoff und unpolaren Lösemitteln erschwert es, Hyperforin-

haltige Zubereitungen einfach in die Therapie einzubringen. Um diese Hürde zu umgehen, werden inzwischen auch stabilere und hydrophilere, semisynthetische Derivate wie Aristoforin und Tetra- oder Octahydrohyperforin auf ihre pharmakologischen Wirkeigenschaften untersucht und mit Hyperforin verglichen^[96,97,134,135]. Eine weitere Schwierigkeit ergibt sich aus der Tatsache, dass Hyperforin ein potenter Ligand am Pregnan-X-Rezeptor (PXR) ist, der die Transkription von Xenobiotika-metabolisierenden Enzymen reguliert^[136–138]. Durch Aktivierung wird die Expression von Genen für derartige Biotransformationsenzyme (v.a. CYP3A4), aber auch Transporter-Proteine (v.a. P-Glycoprotein = MDR1) induziert, die einen Großteil körperfremder Stoffe umsetzen und deren Verfügbarkeit im Organismus und am Bestimmungsort herabsetzen^[139]. Dadurch entsteht ein immenses Interaktionspotential zwischen Hyperforin und anderen co-applizierten Arzneistoffen, die als Enzymsubstrate über CYP3A4 metabolisiert werden (z.B. Immunsuppressiva, Zytostatika). Als Folge der Enzyminduktion kann es zu einer drastischen Reduktion der Plasmaspiegel betroffener Arzneistoffe und folglich bis zum lebensbedrohlichen Therapieversagen kommen^[140]. Derartige Wechselwirkungen dürfen daher bei einer Anwendung Hyperforin-haltiger Formulierungen, gerade auch bei Gabe als Co-Medikation im Rahmen einer kombinierten Therapie, niemals außer Acht gelassen werden.

1.2.3. Biosynthese polycyclischer polyprenylierter Acylphloroglucine

Die Biosynthese aller PPAPs verläuft, ausgehend vom Polyketid-Grundgerüst der APs, über die Zwischenstufe der zunächst weniger komplex aufgebauten **monocyclischen (poly-)prenylierten Acylphloroglucine (MPAPs)** – eine Gruppe von Sekundärstoffen, die hauptsächlich in den Pflanzenfamilien der Cannabaceae und Myrtaceae zu finden sind^[22]. Als bekannteste Vertreter gelten die α - und β -Hopfensäuren aus *Humulus lupulus* L. (Cannabaceae), die als Bestandteil von Hopfen-Extrakten vornehmlich wegen deren sedierender Wirkung bei Schlafproblemen und nervöser Unruhe sowie ihrer östrogenartigen Wirkung bei menopausalen Beschwerden pharmazeutisch Anwendung finden^[141]. Darüber hinaus werden die einzelnen Hopfensäuren wegen ihrer antimikrobiellen und chemopräventiven Aktivität in der Krebstherapie untersucht, und für die Bier-Brauindustrie sind die α -Hopfensäuren unersetzlich, weil die während des Brauprozesses aus ihnen entstehenden *iso*- α -Säuren für den herben Geschmack des Bieres sorgen^[142–144].

Die Bildung von MPAPs in Hopfen kann aufgrund ihrer umfangreichen Untersuchung in den letzten 40 Jahren als Modellmechanismus stellvertretend für deren generelle Biosynthese herangezogen werden (Abbildung 1.7). Mittels radioaktiv markierter Vorstufen war es bereits früh möglich, die Formulierung des Polyketid-Grundgerüsts durch Kondensation von Isobutyryl-, Isovaleryl- oder 2-Methylbutyryl-CoA mit drei Molekülen Malonyl-CoA aufzuklären^[145–148]. Ein folgender, enzymatisch katalysierter Ringschluss des intermediären, offenkettigen Tetraketids über eine intramolekulare Dieckmann-Reaktion konnte ebenfalls durch Untersuchungen pflanzlicher Polyketid-Synthasen gezeigt werden^[149,150]. Im weiteren Verlauf der Biosynthese werden durch **prenylierende Enzyme** (siehe 1.3) nacheinander zwei Moleküle Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) an die so entstandene AP-Struktur angeknüpft, und zwar an beide unsubstituierte C-Atome des Aromaten unter Ausbildung von C–C-Bindungen^[90,151–153]. Abschließend wird durch erneute enzymatische Addition eines weiteren Substituenten das aromatische System des diprenylierten MPAP aufgelöst. Dies geschieht entweder mittels einer zusätzlichen Hydroxylgruppe, wodurch die Biosynthese zu den Humulonen (α -Hopfensäuren) führt^[154], oder über Anknüpfung einer weiteren, dritten Isopreneinheit, was schließlich die Lupulone (β -Hopfensäuren) hervorbringt.

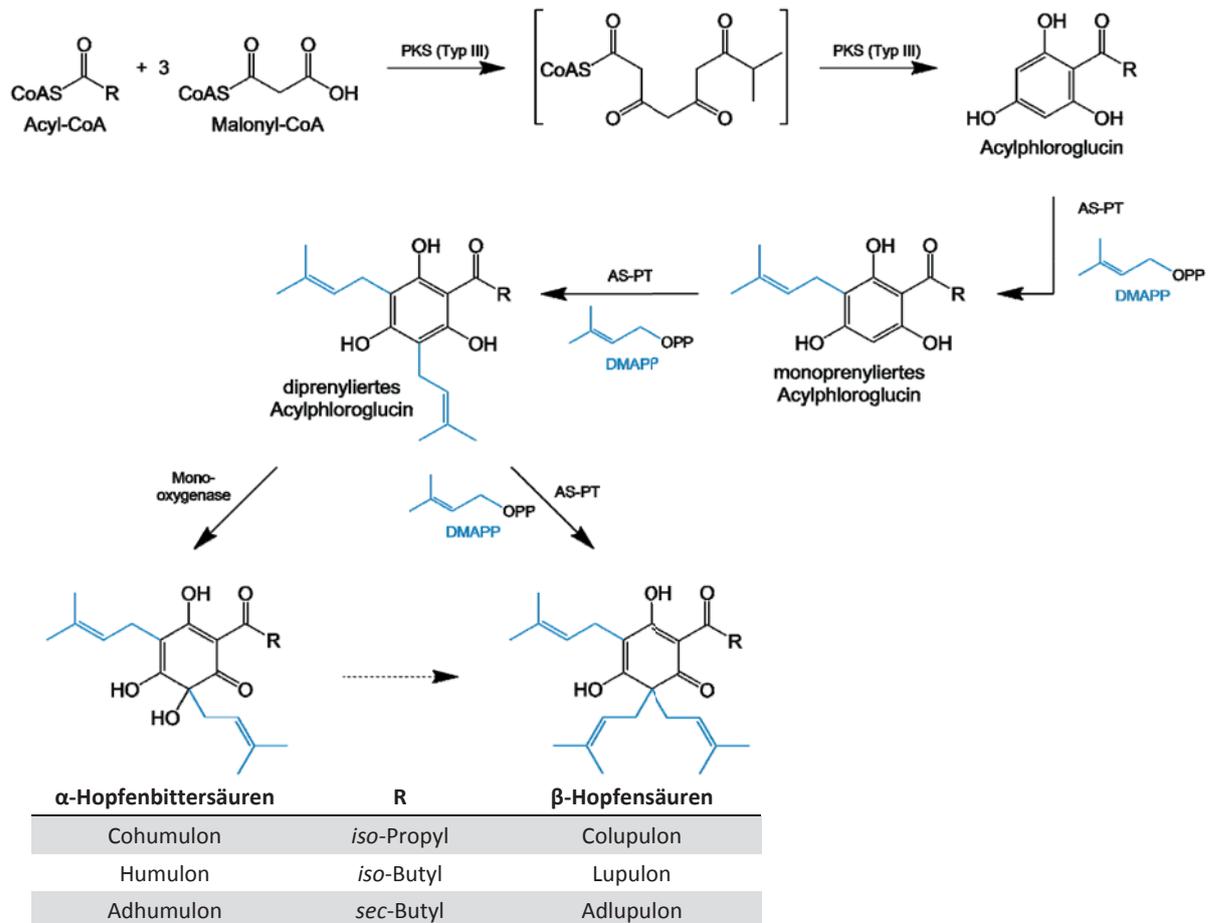


Abbildung 1.7 Biosynthese-Schema der Hopfensäuren als Vorstufen von PPAPs. AS-PT: aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferase; CoAS: Coenzym A-Thioester; DMAPP: Dimethylallyldiphosphat; PKS (Typ III): Typ III-Polyketid-Synthase; OPP: Diphosphatrest

Es ist mehrfach postuliert und derzeit vom wissenschaftlichen Standpunkt aus anerkannt, dass sowohl die PPAPs vom Typ A als auch vom Typ B über eine gemeinsamen MPAP-Vorstufe, ähnlich den β -Hopfensäuren (siehe oben), gebildet werden^[u.a. 21,63,65,155]. Durch einen nukleophilen Angriff einer der beiden geminalen Prenyl-Gruppen an das C-1-Atom eines Moleküls DMAPP wird unter Bildung eines Carbokations ein weiterer Prenylrest angelagert. Diese instabile Zwischenstufe reagiert durch einen nukleophilen Angriff des C-1'- (für Typ A) oder des C-5'-Enols (für Typ B) in einem intramolekularen Ringschluss zum überbrückten System der PPAPs und generiert die für Typ A und B charakteristisch substituierten Bicyclen (Abbildung 1.8). Die Bildung der PPAPs vom Typ C geht dem gegenüber von einer MPAP-Struktur aus, bei der ein gleichzeitig acyliertes und prenyliertes C-Atom vorliegt. Durch eine Anlagerung von DMAPP an den Prenylrest dieses C-Atoms entsteht auch hier ein Carbokation, das nach Angriff des C-1' auf die positiv geladene Seitenkette zum entsprechenden bicyclischen Grundgerüst reagiert. Alle Typen von PPAPs werden dabei ebenso wie bereits die MPAPs unter dem katalytischen Einfluss von speziellen **Prenyltransferasen (PTs;** siehe 1.3) biosynthetisiert. Oft unterliegen PPAPs im Anschluss noch weiteren, sekundären Ringschlüssen unter Beteiligung der Seitenketten und können so unter Ausbildung von angelagerten Pyran-/Dihydrofuran-Ringen gleichsam wie mit zusätzlichen Überbrückungen zu Adamantan-ähnlichen Käfigstrukturen weiter biosynthetisch verändert werden^[78,156,157]. Trotz der vorhergesagten Mechanismen bleiben jedoch die Biosynthesen der PPAPs letztlich Vorhersagen, da bis zu diesem Zeitpunkt für keinen dieser Naturstoffe (auch nicht für Hyperforin) die Biosynthese durch Entdeckung und Charakterisierung aller daran beteiligten Enzyme (siehe u.a. 1.3) und Zwischenstufen komplett aufgedeckt ist.

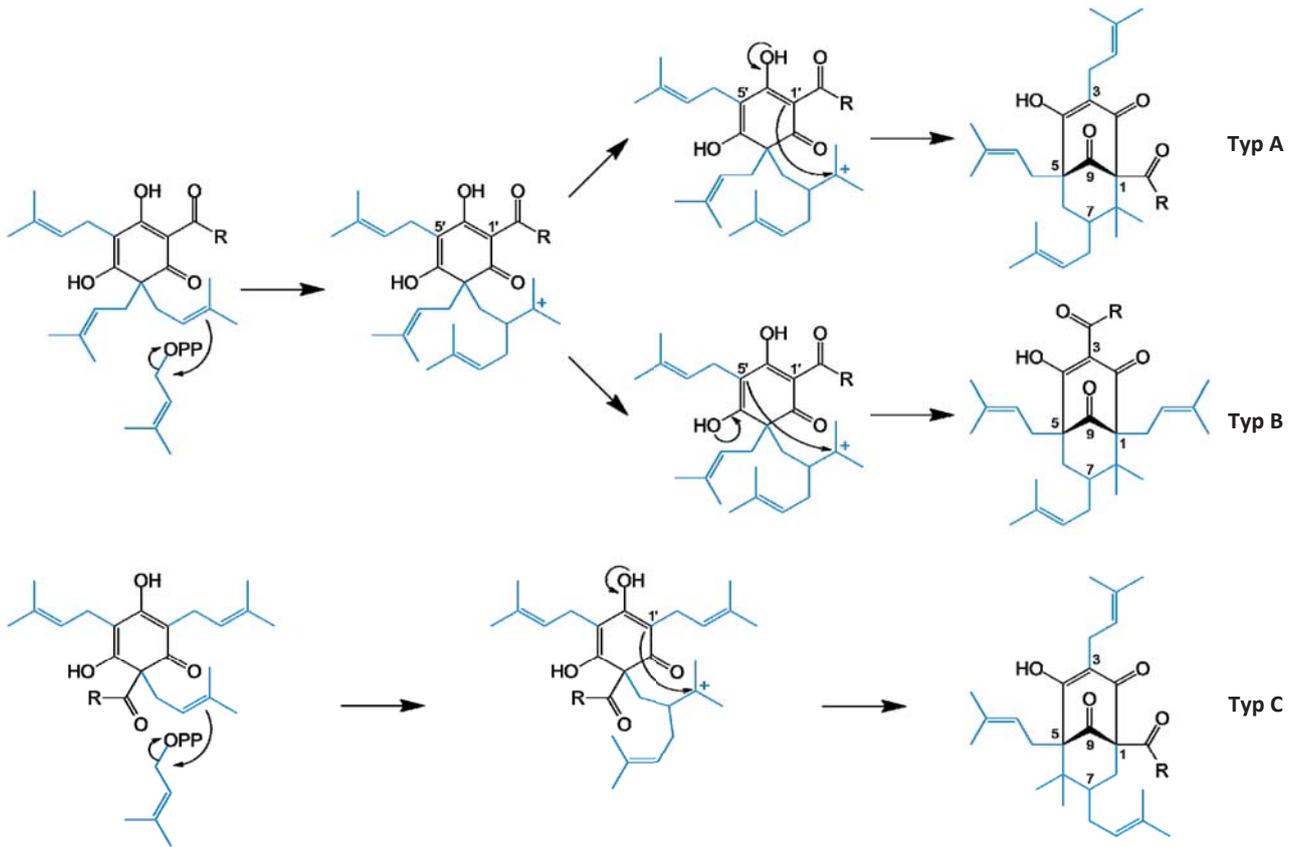


Abbildung 1.8 Angenommene Biosynthesewege der unterschiedlichen Grundgerüst-Typen von PPAPs (Typ A–C) aus MPAPs

1.3. Prenylierende Enzyme

Enzyme, die im Terpenstoffwechsel beheimatet sind und an der Synthese oder dem Transfer von (Oligo-)Prenyldiphosphaten (Isoprenreste/-einheiten) auf Akzeptor-Moleküle beteiligt sind, werden in die große und heterogene Familie der Prenyltransferasen (PTs) eingruppiert^[158,159]. Sie sind in allen Organismen weit verbreitet und zeichnen sich durch ihre bedeutenden biologischen Funktionen im Metabolismus aus. Es gibt mehrere Wege, PTs zu unterscheiden und einzuteilen – die verbreitetste Methode richtet sich nach der Struktur der Substrate, auf die Isoprenreste übertragen werden. Unterschieden werden folglich

- aliphatische/kettenverlängernde PTs (Oligoprenyl-Synthasen, welche die Kondensation allylischer Diphosphate miteinander katalysieren (Kohlenstoffkettenverlängerung), und Terpen-Cyclasen/-Synthasen, die intramolekulare Ringschlüsse katalysieren)
- Protein-PTs (prenylieren im Rahmen der posttranslationalen Modifikation Cystein-Reste nahe dem C-Terminus von Zielproteinen mit FPP oder GGPP zur Verankerung in Biomembranen)
- PTs, die funktionelle Gruppen/Hetero-Atome prenylieren (inkl. Cytokinin- und Chlorophyll-Synthasen) und
- aromatische PTs (übertragen Isoprenreste auf aromatische Substrate).

Die Enzyme übernehmen unterschiedlichste Aufgaben sowohl im Primär- als auch dem Sekundärmetabolismus^[u.a. 160–165]. Diejenigen PTs, die mit der Biosynthese von PPAPs (siehe 1.2.3) und anderen prenylierten APs in Pflanzen in Verbindung gebracht werden und dementsprechend bedeutungsvoll für die vorliegende Arbeit sind, finden sich dieser Einteilung folgend in der Gruppe der aromatischen PTs wieder (Abbildung 1.9).



Während die aromatischen PTs des Primärmetabolismus ubiquitär an der Bildung von Elektronenüberträgern der Atmungskette (Ubichinon, Plastochinon) und verschiedenen Vitaminen (u.a. Vit. K₂ = Menachinon, Vit. E = Tocopherole) beteiligt sind^[162], finden sich die **aromatischen Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen (AS-PTs)** nur in Bakterien, Pilzen und Pflanzen – denjenigen Lebewesen, die zum Sekundärmetabolismus befähigt sind. In Bakterien und Pilzen prenylieren sie dabei aromatische Substrate im Rahmen der Biosynthese von wichtigen Sekundärstoffen (z.B. antibakterielle Aminocumarine wie Clorobiocin und Novobiocin, Indol-Alkaloide wie Ergotamin)^[158,166,167]. Darüber hinaus spielt die enzymatische Prenylierung durch AS-PTs besonders in Pflanzen eine bedeutende Rolle, sowohl in der Biosynthese als auch der Derivatisierung von Naturstoffen. Dabei wird durch die Anknüpfung von Isoprenresten an strukturell unterschiedliche aromatische Grundgerüste (u.a. Acylphloroglucine, Flavonoide, Xanthone, Phenylpropane und Cumarine) eine Vielzahl an aromatischen bzw. dearomatisierten sekundären Inhaltsstoffen generiert (siehe Abbildung 1.10) – gerade auch dank zusätzlicher Variation in der Kettenlänge und der Anzahl angehängter Prenyleinheiten, woraus sich allein mehr als 1.000 prenylierte Flavonoide aus Pflanzen ableiten^[163].

Obwohl viele Strukturen von Produkten pflanzlicher AS-PTs genauso wie die Biosynthese über eine PT-vermittelte, enzymatische Katalyse bereits lange bekannt sind, wurden bisher nur wenige dieser prenylierenden Enzyme aus Pflanzen auf molekularer und biochemischer Ebene untersucht und publiziert. Die molekulargenetische Entdeckung der ersten pflanzlichen AS-PT wurde erst in diesem Jahrtausend veröffentlicht^[168]. Seitdem folgten zu dieser spärlich erforschten Enzymfamilie nur wenige Veröffentlichungen und Charakterisierungen weiterer Vertreter^[151,152,169–177]. Entgegen dem geringen Erfahrungsschatz an AS-PTs und ihrer Rolle in Biosynthesen von Sekundärstoffen steht das große medizinische Interesse an prenylierten Naturstoffen (wie beispielsweise dem PPAP Hyperforin; siehe 1.2.2). Viele von ihnen zeigen nämlich in Untersuchungen vielversprechende Bioaktivitäten, können aber aufgrund begrenzter Verfügbarkeitsmengen nur schwerlich weiter erforscht und schließlich klinisch zunutze gemacht werden. Daher ist die Charakterisierung von AS-PTs eine grundlegende Notwendigkeit, um die natürliche Bildung prenylierter Inhaltsstoffe besser zu verstehen und sich die Enzyme gentechnisch zugänglich zu machen.

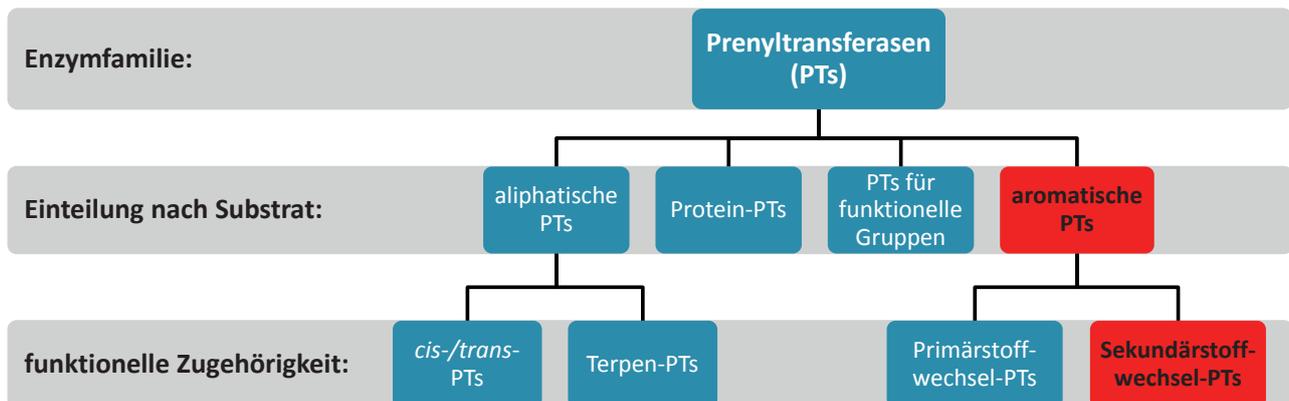


Abbildung 1.9 Einteilung von Prenyltransferasen

AS-PT	Organismus	Reaktion	Biosyntheseweg	Quelle
LePGT-1	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	<p>4-Hydroxybenzoesäure → 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure</p>	Shikonin	[168]
Sfn8DT	<i>Sophora flavescens</i>	<p>Naringenin → 8-Prenylnaringenin</p>	Sophoraflavanon G	[177]
CsPT-1	<i>Cannabis sativa</i>	<p>Olivetolsäure → Cannabigerolsäure</p>	Δ^9 -Tetrahydrocannabinolsäure	[172]
GmG4DT	<i>Glycine max</i>	<p>(-)-Glycinol → 4-Prenylglycinol</p>	(-)-Glyceollin I	[176]
PcPT / PsPT1	<i>Petroselinum crispum</i> / <i>Pastinaca sativa</i>	<p>Umbelliferon → Demethylsuberosin</p>	Psoralen	[169,170]

Abbildung 1.10 Beispiele pflanzlicher AS-PTs mit ihren katalysierten Reaktionen

AS-PTs repräsentieren mit ihrer Aktivität einen wichtigen Schnittpunkt zwischen allen pflanzlichen Biosynthesewegen: Viele (Zwischen-)Produkte des Shikimisäure- oder Polyketidweges dienen als aromatische Prenylakzeptoren für Kohlenwasserstoffketten, die dem Isoprenstoffwechsel entspringen. Diese von AS-PTs als Prenyldonor akzeptierten Isopreneinheiten leiten sich alle vom einfachsten Prenyldiphosphat **Dimethylallyldiphosphat (DMAPP)** ab, welches zusammen mit seinem Strukturanalogon Isopentenylidiphosphat (IPP) als Grundbaustein in der Terpenbiosynthese zu finden ist (Abbildung 1.11). DMAPP/IPP kann auf zwei unterschiedlichen Stoffwechselwegen biosynthetisiert werden, die in unterschiedlichen Zellkompartimenten ablaufen. Über den im Cytoplasma aller Organismen ablaufenden Mevalonsäure-Weg wird IPP aus drei Molekülen Acetyl-CoA aufgebaut und durch eine Isomerase entsteht mittels Umlagerung letztlich DMAPP. Alternativ existiert in Pflanzen, Bakterien, Algen und manchen Protozoen der Methylerythritolphosphat-Weg, der in Plastiden stattfindet. Bei dieser Biosynthese wird aus Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat eine gemeinsame Vorstufe gebildet, aus der durch Einfluss der IPP/DMAPP-Synthase sowohl DMAPP als auch IPP hervorgehen^[178–181]. In sogenannten Kopf-Schwanz-Reaktionen können aus diesen C₅-Bausteinen über 1'–4-Verknüpfungen lineare, ungesättigte, oligomere Isopren-Verbindungen (Geranyldiphosphat



(GPP) = C₁₀, Farnesyldiphosphat (FPP) = C₁₅ etc.) entstehen, welche durch AS-PTs als Seitenketten an Aromaten kondensiert werden können oder als Vorläufer der Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- und schließlich Polyterpene fungieren.

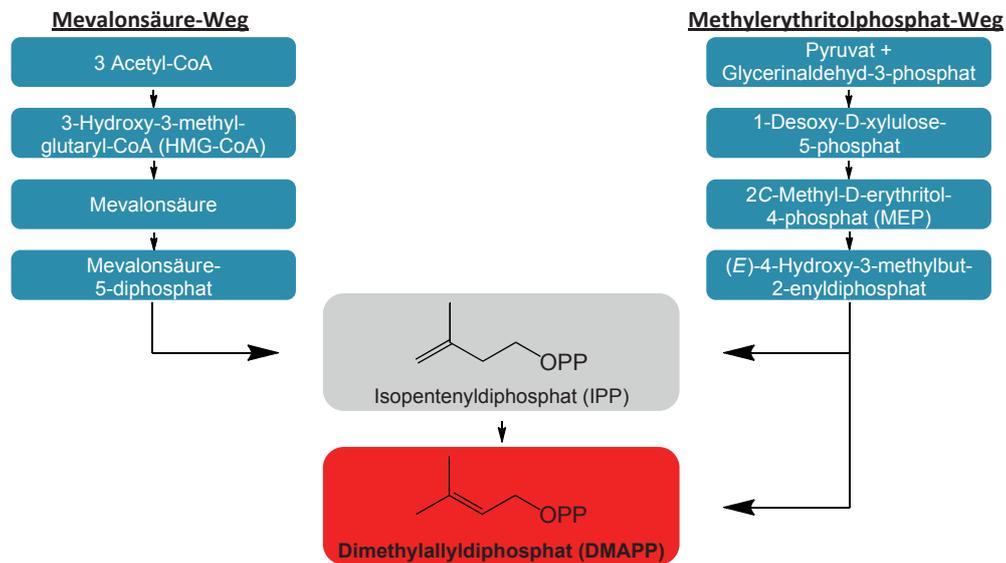


Abbildung 1.11 Unterschiedliche Biosynthesewege von DMAPP

1.4. Johanniskräuter – *Hypericum*

Zu der pflanzlichen Familie der Johanniskraut- bzw. Hartheugewächse (Hypericaceae) gehört die Gattung der Johanniskräuter (*Hypericum*), zu der knapp 500 unterschiedliche Arten Kräuter, Sträucher und auch wenige Bäume zählen^[182]. Sie kommen nahezu weltweit verteilt vor mit einer Prävalenz für die gemäßigten Zonen der nördlichen Hemisphäre, wo ihre Standorte vornehmlich in Flach- bzw. Hochlandgebieten – und nur in tropischen Wachstumsgebieten an höher gelegenen Vegetationsorten (wie z.B. in den Anden) – zu finden sind (Abbildung 1.12).

Der lateinische Eigenname *Hypericum* leitet sich von der volksmedizinischen und apotropäischen Verwendung der Johanniskräuter in der Antike ab. Als erstes tauchte er im zweiten Jahrhundert v.Chr. als „*υπερικων*“ = *Upereikon* bei Nikandros aus Kolophon (*Alexipharmaka*) auf. Später wurde er dann im ersten Jahrhundert n.Chr. von Dioskurides (*Materia medica*) erwähnt. Außerdem erschien der Name in *De codicis Dioscuridei Aniciae Iulianae*, wo Johanniskraut als Schmuck von Götterbildnissen dargestellt wurde. Diese Dekoration hatte einen tieferen, spirituellen Hintergrund: Der Name *Upereikon* wurde damals denjenigen Pflanzen gegeben, die zur Vertreibung böser Geister über („*υπερ*“) religiöse Abbilder („*ικων*“ = Ikone) gehängt wurden. Johanniskraut mit seinen leuchtend hellen, sonnengelben Blüten und unzähligen Staubblättern wie Sonnenstrahlen wurde eine solche Bann- und Heilkraft nachgesagt, so wie die Sonne das Dunkel vertreibt. Es ist daher überzeugend, dass schon die Menschen im antiken Griechenland, ebenso wie später im Mittelalter, zum Abwenden böser Kräfte und Dämonen ihre Altäre und Ikonen mit dem dafür prädestinierten Johanniskraut („*Fuga daemonum*“, „*Jageteufel*“, „*Teufelsflucht*“) als Apotropaion schmückten^[183,184]. Zugleich galt zu damaliger Zeit auch Johanniskraut als gemeines Heilmittel für mental verstimmte, melancholische Menschen selbst, da auch ihr Leiden – aus heutiger Sicht das Krankheitsbild der Depression – auf das Innewohnen böser Geister zurückgeführt wurde^[185].

Verantwortlich für den deutschen Gattungsnamen sind nach Überlieferungen höchstwahrscheinlich irische Christen, die den Kirchenheiligen JOHANNES mit der Namensgebung ehrten. Weil nämlich die begin-

nende Blütezeit des Johanniskrauts auf den 24. Juni und somit den Jahrestag von JOHANNES DEM TÄUFER fällt, benannten sie die zum Schmücken des christlichen Hochfestes gewählte Pflanze auch folglich nach ihm (*engl.* St. John's wort).

Bereits seit vielen Jahrhunderten werden mit dem Namen Johanniskraut wirksame Heilkräuter der Volksmedizin assoziiert. Der traditionelle Nutzen dieser Heilpflanzen in inneren und äußeren Anwendungen wurde bis heute bewahrt und hat nichts von seinem Potential und seiner Stellung in der Phytotherapie eingebüßt. Heutzutage ist das Echte Johanniskraut die bestuntersuchte und für Naturwissenschaftler interessanteste *Hypericum*-Art, weil nur diese pharmazeutisch Verwendung findet. Mit der Wahl des Echten Johanniskrauts zur Arzneipflanze des Jahres 2015^[186,187] unterstrich der „Studienkreis Entwicklungsgeschichte der Arzneipflanzenkunde“ an der Universität Würzburg sogar nochmals seine aktuelle Relevanz für Medizin und Forschung. Da sich in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit dem Echten Johanniskraut und dem Großkelchigen Johanniskraut befasst wird, sollen diese beiden Arten nachfolgend genauer vorgestellt werden.



Abbildung 1.12 Weltweites Vorkommen der Gattung *Hypericum* (nach NÜRK^[183])

1.4.1. Echtes Johanniskraut – *Hypericum perforatum* L.

Wenn im Allgemeinen im deutschsprachigen Raum von Johanniskraut gesprochen wird, so ist dabei nahezu immer die Arzneipflanze Echtes Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae) gemeint. Aufgrund seiner Blütezeit um den Johannistag am 24. Juni wird es im Deutschen altertümlich auch als Sonnenwendkraut bezeichnet, wegen des roten Saftes der Blüten als Herrgottsblut oder Blutkraut und bedingt durch den teilweise stark verholzten Stängel als (Tüpfel-)Hartheu. Es ist eine von neun in Deutschland vorkommenden *Hypericum*-Spezies und die einzige Art, dessen Droge im Europäischen Arzneibuch monographiert ist (Ph. Eur. 8.0/1438: Johanniskraut – „*Hyperici herba*“) und demnach in zugelassenen bzw. registrierten Arzneimitteln verarbeitet werden darf. Abgesehen von volkstümlichen Anwendungen oder traditionellen medizinischen Zubereitungen spielt also nur *H. perforatum* als Arzneipflanze eine Rolle in der rationalen Phytotherapie. Dieser Einsatz als Heilpflanze lässt sich bis in die Antike zurückverfolgen (siehe 1.4), u.a. mit der Erwähnung um 77 n.Chr. bei Plinius dem Älteren (*Naturalis historia*) gegen Verbrennungen. Um die gleiche Zeit hielt auch Dioskurides fest, dass zur Wundbehandlung, Fiebersenkung und Förderung der Diurese die Wirkung von Johanniskraut herangezogen werden kann. Als Anwendungsbeispiel bei melancholischen Verstimmungen und gegen dämonisches Treiben beschrieb Paracelsus im Jahr 1525 das erste Mal die wohltuende, psychoaktive Wirkkomponente einer *Hypericum*-Abkochung^[188].



Die erste offizielle Aufnahme in ein pharmazeutisches Standardwerk erlebte *H. perforatum* 1941 im Ergänzungsbuch des Deutschen Arzneibuches (DAB 6). Im Jahr 1979 wurde dann die Arzneidroge „Hyperici herba“ in den Deutschen Arzneimittel Codex aufgenommen und von der Kommission E des früheren Bundesgesundheitsamtes innerlich bei psychovegetativen Störungen, depressiven Verstimmungszuständen, Angst/nervöser Unruhe, dyspeptischen Beschwerden sowie äußerlich zur Behandlung von scharfen/stumpfen Verletzungen, Myalgien und leichten Verbrennungen empfohlen (veröffentlicht in Bundesanzeiger Nr. 43 vom 2. März 1984). Den Sprung in ein internationales Regelwerk meisterte das Echte Johanniskraut schließlich mit der Aufnahme der Monographien „Hyperici herba“ (Ph. Eur. 2002) und „Quantifizierter Johanniskrauttrockenextrakt“ (Ph. Eur. 6.2) in das Europäische Arzneibuch^[189].

1.4.1.1. Botanik

Das aufrecht wachsende, bis 1 m hohe Echte Johanniskraut ist eine ausdauernde krautige Pflanze mit stark verästelten Wurzeln und einem Rhizom. Der stielrunde und kahle Stängel ist mit zwei deutlichen Längskanten besetzt. Die daran sitzenden, gegenständig angeordneten Laubblätter sind elliptisch bis lanzettlich geformt, ganzrandig und erscheinen über die gesamte Blattspreite durchscheinend perforiert aufgrund von kugeligen, schizogenen Exkretbehältern, gefüllt mit farblosem ätherischem Öl. Diese charakteristische Morphologie der Blätter ist demnach auch der Ursprung des lateinischen Art-Namens *perforatum* sowie für die deutschen Synonyme Tüpfel-Johanniskraut oder Durchlöchertes Johanniskraut. Auf der Blattfläche und am Blattrand finden sich zusätzlich vereinzelt, schwarze Drüsen mit pigmenthaltigem Exkret, die jedoch typischerweise sehr viel häufiger auf den Blüten zu finden sind, wo sie den Petalenrand säumen. Diese goldgelben Kronblätter bilden zusammen mit schmalen, leicht zugespitzten Kelchblättern – ergänzt durch einen oberständigen Fruchtknoten und äußerst viele Staubblätter (ca. 70–120 Stamina) – die zahlreichen kleinen, fünfzähligen Blüten, die in der Blütezeit von Juni bis August in Trugdolden stehen und aus denen sich eine rote, riefelige Spaltkapsel als Frucht entwickelt^[184,190,191].

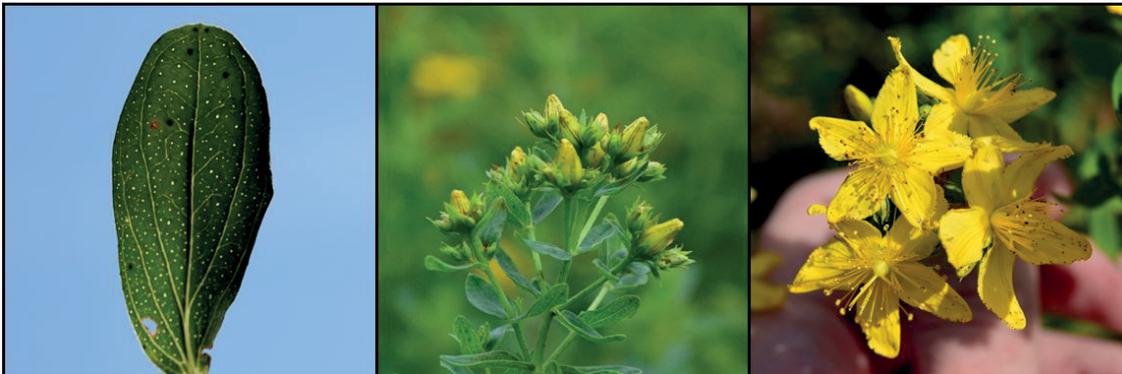


Abbildung 1.13 *Hypericum perforatum* L., Hypericaceae

H. perforatum kommt in vier Varianten vor (var. *perforatum* = Gewöhnliches Echte Johanniskraut; var. *latifolium* = Breitblättriges Echte Johanniskraut; var. *angustifolium* = Schmalblättriges Echte Johanniskraut; var. *microphyllum* = Kleinblättriges Echte Johanniskraut) und ist in Europa und Westasien bis hin zu Gebieten Nordafrikas einheimisch, ist jedoch in vielen weiteren Gebieten eingeschleppt und dort eingebürgert. Obwohl es einerseits im landwirtschaftlichen Anbau als Unkraut gilt, wird es andererseits in großem Ausmaß für pharmazeutische Zwecke in kontrolliertem Anbau kultiviert, da der hohe Bedarf an Echem Johanniskraut zum Gewinn der Arzneidroge und die steigenden Qualitätsanforderungen nicht durch Sammlungen an Wildstandorten erfüllt werden können (Abbildung 1.14).



Abbildung 1.14 Kontrollierter Anbau von *H. perforatum* (links: Inga Spence, 2011; rechts: PZ/Mies, PZ 13/2016)

1.4.1.2. Inhaltsstoffe (Sekundärstoffe)

Maßgeblich kommen im Echten Johanniskraut Vertreter aus der Naturstoffgruppe der Polyketide vor. Phloroglucin-Derivate (PPAPs), Naphthodianthrone, Flavonoide, Xanthone sowie Phenylpropane und Bestandteile von ätherischem Öl kennzeichnen das Inhaltsstoffspektrum von *H. perforatum*^[132,190,192,193].

Die Phloroglucin-Derivate (siehe 1.1) mit dem mengenmäßig vorherrschenden PPAP Hyperforin (siehe 1.2.2) machen erfahrungsgemäß 2–4% der Inhaltsstoffe in der Arzneipflanze aus. In der arzneilich verwendeten Droge – verwendet werden die während der Blütezeit geernteten, getrockneten, ganzen oder zerkleinerten Triebspitzen – liegt der durchschnittliche Gehalt letztlich doppelt so hoch. Zurückzuführen ist dieser Umstand auf die Tatsache, dass Hyperforin bei seiner Lagerung zusammen mit ätherischem Öl in den durchscheinenden Ölbehältern der Laubblätter alters- und entwicklungsabhängig in den Reproduktionsorganen (Knospen, Blüten, unreife Früchte) von *H. perforatum* akkumuliert^[83,84,86,194]. Vermutet wird, dass es dort als florales UV-Pigment und/oder zur Abschreckung von Herbivoren sowie Pathogenen dient^[195]. Neben Hyperforin kommt außerdem in deutlich geringerer Menge das PPAP Adhyperforin vor, und es sind weitere oxidierte Derivate wie u.a. Furohyperforin, Hyperforinperoxid und Oxepahyperforin beschrieben, deren genuines Vorkommen jedoch angezweifelt wird.

Naphthodianthrone gehören zu den Anthracen-Derivaten und sind strukturell Dimere von Anthronen, die durch beiderseitige C–10-Kupplung und zwei oxidative Ringschlüsse entstehen. Im Johanniskraut finden sich vornehmlich Hypericin und Pseudohypericin sowie ihre Vorstufen Protohypericin und -pseudohypericin, die in der Pflanze mit einem Gehalt von 0,03–0,3% vorhanden sind. Lokalisiert sind sie im pigmenthaltigen Exkret der schwarzen Drüsen auf den Blättern und verstärkt dem äußeren Rand der Petalen. Charakteristisch ist ihre tiefrote Färbung, die beispielsweise beim Zerreiben von frischen Blüten auftritt und die Rotfärbung öliger Johanniskraut-Extrakte (sog. „Rotöl“) verursacht. Zu Beginn der pharmakologischen Untersuchungen wurde Hypericin durch Hemmung von Monoaminoxidasen (MAOs) zur Erklärung der antidepressiven Wirksamkeit herangezogen, was aber nicht belegt werden konnte und daher anzuzweifeln ist^[125,196,197]. Stattdessen steht zur Diskussion, ob eine Beeinflussung von CRH- und ACTH-Spiegeln im Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-System durch die Naphthodianthrone des Johanniskrauts zum antidepressiven Effekt beiträgt. Außerdem wurde antivirale und antitumorale Wirksamkeit *in vitro* in den 1990er Jahren erforscht, und aktuell wird Hypericin in der Fluoreszenzdiagnostik von Blasen Tumoren eingesetzt^[198–200].

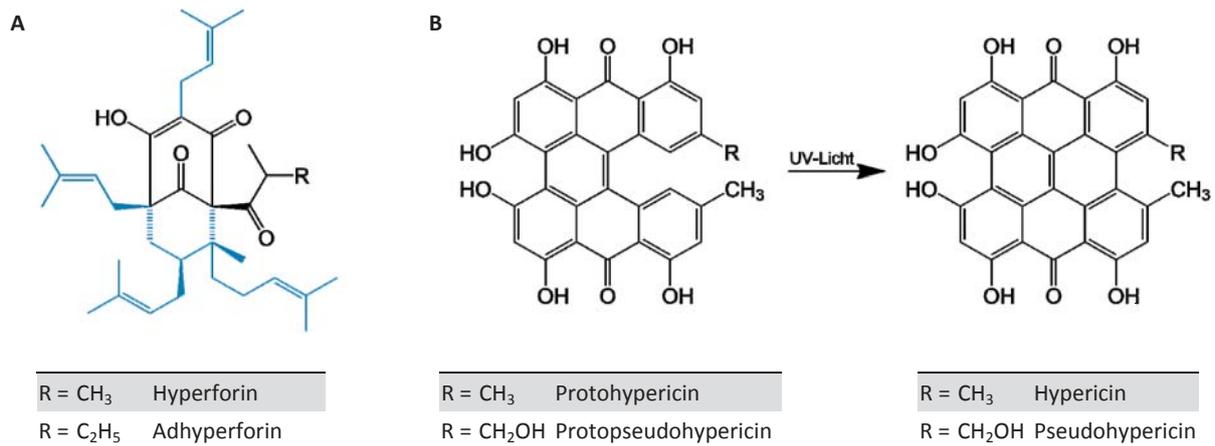


Abbildung 1.15 PPAPs (A) und Naphthodianthrone mit ihren Vorstufen (B) aus *H. perforatum* L.

Aus der Gruppe der Flavonoide kommen in *H. perforatum* hauptsächlich Flavonol-Glycoside des Quercetins, freie Flavonoid-Aglykone und die Biflavone 13,118-Biapigenin und Amentoflavon vor (insgesamt 2–4%). Sie dienen aufgrund ihrer häufigen Eigenfärbung der Farbgebung von Blüten und somit der Anlockung von potentiellen Bestäubern, aber auch als Antioxidantien zum Schutz vor oxidativem Stress und Radikalen. In Extrakten des Johanniskrauts wurde für diese Inhaltsstoffe bisher keine eigene antidepressive Wirksamkeit gefunden, jedoch scheinen sie in Bezug auf die wirksamen Bestandteile deren Bioverfügbarkeit zu steigern und/oder durch ihre antioxidativen Eigenschaften positive Effekte auf ihre Stabilität auszuüben^[201–203]. Als Di- und Polymere von Flavonoiden zählen auch Proanthocyanidine und Catechingerbstoffe mit Gehalten von 6–15% zu den Inhaltsstoffen.

In sehr kleiner Menge kommen die Xanthone 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon (1,3,6,7-THX), Mangiferin und Kielcorin im Johanniskraut vor. Weitere Xanthone können in Zellkulturen und *in vitro*-Systemen gefunden werden, wo sie durch biotischen Stress oder Elicitor-Behandlung induzierbar sind und als chemische Abwehrstoffe gegen Herbivoren und Mikroorganismen fungieren^[12,204]. Obwohl bereits früh festgestellt wurde, dass natürlich vorkommende Xanthone durch MAO-Hemmung (Therapieansatz von Depressionen nach der „Monoamin-Mangel-Hypothese“) ein antidepressives Potential haben können^[205,206], muss ein pharmakologisch relevanter Einfluss im Johanniskraut aufgrund ihres geringen Gehalts in der Pflanze (dabei vornehmlich in Wurzeln) und ihres noch geringeren Vorkommens in der arzneilich verwendeten Droge (ausschließlich oberirdische Pflanzenteile) kritisch betrachtet werden.

Zur Vervollständigung des Sekundärstoffprofils seien weiterhin noch Bisanthrachinonglycoside, die Phenylpropane Kaffee- und Chlorogensäure, Mono- und Sesquiterpene aus dem ätherischen Öl (v.a. α - und β -Pinen, Myrcen, Limonen) und Chinasäurederivate genannt.

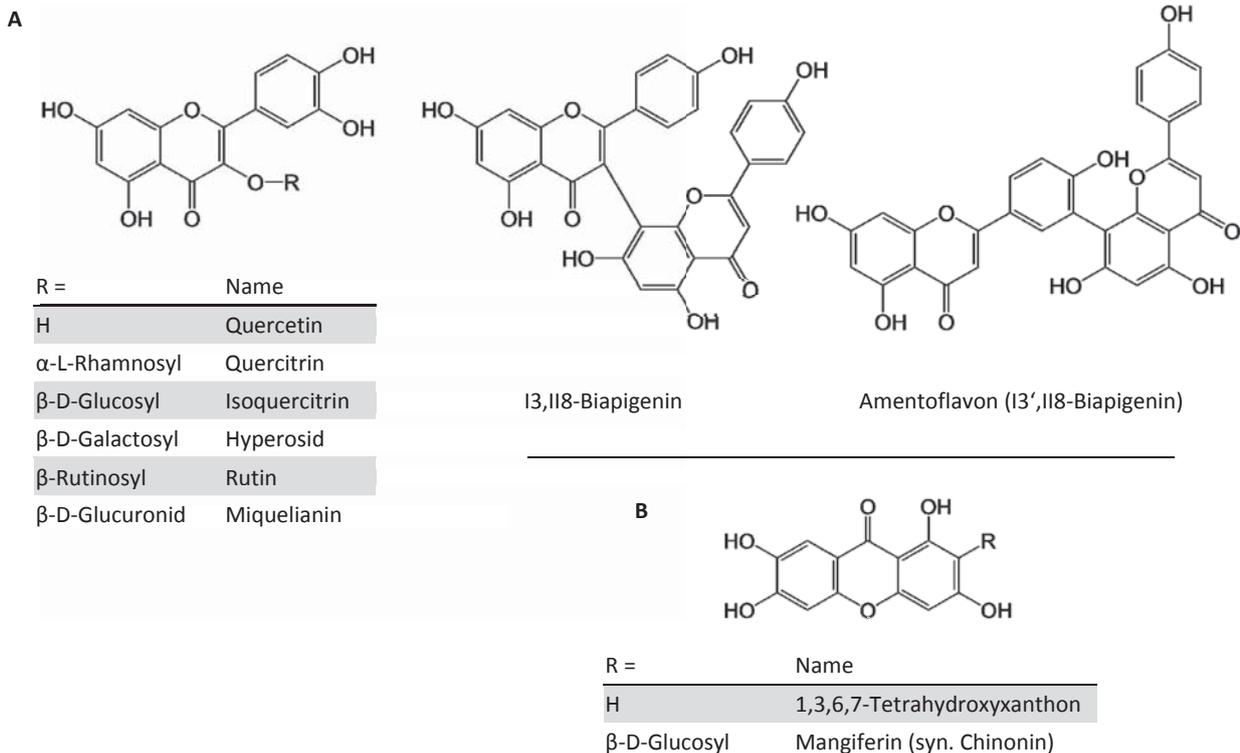


Abbildung 1.16 Flavonoide inkl. Biflavone (A) und Xanthone (B) aus *H. perforatum* L.

1.4.1.3. Therapeutische Verwendung von Johanniskraut

Die Einsatzgebiete von Johanniskraut und den daraus gewonnenen Arzneimitteln leiten sich ab vom volkstümlichen Einsatz von der Antike bis heute. Weil für keine der isolierten Inhaltsstoffgruppen oder gar Einzelsubstanzen aus *H. perforatum* eine wissenschaftlich bzw. klinisch belegte Überlegenheit gegenüber wässrig-alkoholischen Extrakten bewiesen werden konnte, gilt auch heute noch der Gesamtextrakt als Wirkstoff^[190]. Die relevanteste und häufigste Anwendung ist die Einnahme von Johanniskraut als Antidepressivum. Indiziert sind zahlreiche auf dem Arzneimittelmarkt befindliche Fertigarzneimittel von Phytopharmaka- und Generika-Herstellern bei leichten bis mittelschweren depressiven Episoden (nach ICD-10: F32.0, F32.1, F33.0, F33.1). Bezüglich der antidepressiven Effekte ist dabei bisher nur die klinische Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten in vielen Studien belegt^[207] – bei vergleichbarem Therapieerfolg wie bei chemisch-synthetischen Standard-Antidepressiva^[208], jedoch mit deutlich positiverem Profil unerwünschter Arzneimittelwirkungen (UAWs). Der oder die verantwortlichen Wirkstoffe sind hingegen, genauso wie der exakte zentralnervöse Wirkmechanismus, noch bis zum heutigen Tage umstritten. Viele pharmakologische wie toxikologische Untersuchungen mit isolierten Einzelsubstanzen führten zu der aktuell gültigen und weithin akzeptierten Hypothese, dass Hyperforin (siehe 1.2.2) als hauptsächlich aktive Komponente für die antidepressive Wirkung verantwortlich ist^[91] – allerdings nicht ausschließlich, sondern im Beisein weiterer aktiver Sekundärstoffe aus den Johanniskraut-Extrakten^[190]. Weitere Indikationsgebiete wie nervöse Unruhe-/Spannungszustände und psychovegetative Beschwerden (prämenstruell, klimakterisch) ergeben sich ebenfalls aus der zentralnervösen Wirkweise. In der Volksmedizin werden Auszüge, Aufgüsse oder ölige Mazerate der Arzneidroge (sog. „Rotöl“) aufgrund ihrer entzündungshemmenden und antimikrobiellen Eigenschaften äußerlich in Form von Einreibungen oder Umschlägen eingesetzt, und zwar bei Sonnenbrand, Stauchungen, Hexenschuss, Gicht und Rheuma, gegen die Ausbildung hypertropher Narben sowie zur Wundheilung von Schnitt-, Schürf- und Brandverletzungen^[209]. Gegen das atopische Ekzem („Neurodermitis“) und verwandte chronisch-entzündliche Hauterkrankungen steht darüber hinaus eine spezielle Johan-



niskraut-haltige, medizinische Hautpflege-Serie (Bedan[®], MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH) gegen trockene, juckende und rissige Haut zur Verfügung^[210].

Johanniskraut-Präparate haben in ihren therapeutischen Anwendungsbereichen – gerade weil sie sowohl als apotheken- als auch verschreibungspflichtige, erstattungsfähige Arzneimittel verfügbar sind – einen großen Stellenwert in der Selbstmedikation sowie der rationellen, evidenzbasierten Medizin. Wegen ihrer guten, wissenschaftlich belegten Wirksamkeit und ihrer allgemein sehr guten Verträglichkeit erfahren sie große Akzeptanz, gerade auch im Hinblick des aktuellen Gesellschaftswandels hin zu einem gesünderen, natürlicheren, bewussteren und insgesamt „grüneren“ Lebensstil. Unterstrichen wird dies dadurch, dass Johanniskraut-Zubereitungen nicht nur auf dem deutschen Arzneimittelmarkt zu den umsatzstärksten Phytopharmaka gehören, sondern dass Johanniskraut selber bzw. seine Arzneidroge weltweit zu den am besten und meistverkauften pflanzlichen Rohstoffen zählt^[208,211]. Bei all den Vorzügen von Johanniskraut-Extrakten muss jedoch immer vor, während und auch noch nach deren Einsatz ihr Interaktionspotential mit parallel verabreichten Medikamenten beachtet werden (Hyperforin-bedingte Enzyminduktion; siehe 1.2.2), um trotz des unter *Hypericum*-Anwendung verstärkten Abbaus bestimmter Arzneistoffe eine sichere Therapie zu gewährleisten.

1.4.2. Großkelchiges Johanniskraut – *Hypericum calycinum* L.

Das Großkelchige Johanniskraut (*Hypericum calycinum* L., Hypericaceae) ist eine immergrüne, in Südosteuropa verbreitete Art der Gattung *Hypericum*, die als Zierpflanze angebaut wird. Diese bodenbedeckende, buschig-krautige Pflanze bildet aus einem Rhizom und unterirdischen Ausläufern vierkantige Stängel mit schmalen Längsleisten. Die kurz gestielten, ganzrandigen, schmalen und eiförmigen Laubblätter sind dicht und gegenständig angeordnet. Im Vergleich zum Echten Johanniskraut kommen deutlich weniger, dafür mit ca. 5 cm Durchmesser sehr viel größere fünfzählige, leuchtend gelbe Blüten mit unzähligen Staubblättern vor, die einzeln an den Zweigenden sitzen. Sie reifen über den ganzen Sommer verteilt heran, verblühen allerdings zumeist innerhalb eines Tages. Aus einem oberständigen Fruchtknoten reift eine ca. 1 cm lange, rotbraune Kapsel Frucht heran^[195].

Als Sekundärstoffe kommen hauptsächlich hydroxylierte Xanثone und Flavonoide (u.a. Quercetin, Hyperosid, Rutin) vor. Außerdem enthält *H. calycinum* (poly-)prenylierte, dearomatisierte APs (Hypercaline) sowie ätherisches Öl von unterschiedlicher Zusammensetzung^[212,213]. PPAPs kommen hingegen im natürlich wachsenden Großkelchigen Johanniskraut genauso wenig vor wie Naphthodianthron, jedoch wurden in Zellkulturen von *H. calycinum* Hyperforin und Adhyperforin gefunden. Zusätzlich wurde über die durch Elicitor-Behandlung induzierte Bildung prenylierter Xanثone wie Hyperxanthon E berichtet^[149,214].



Abbildung 1.17 *Hypericum calycinum* L., Hypericaceae



2 ZIELSETZUNG

Wegen seiner vielfältigen, potenten Wirkqualitäten steigt das Interesse an Hyperforin sowie anderen bioaktiven PPAPs, und somit auch an einer alternativen Quelle neben der Extraktion und Aufreinigung aus pflanzlichen Gesamtextrakten. Als andere Bezugsmöglichkeit bietet sich einerseits die chemisch-synthetische Nachbildung an^[20]. Obwohl in den letzten Jahren der Durchbruch in der äußerst komplexen chemischen Totalsynthese von Hyperforin glückte^[215–217], bietet der Ansatz der organischen Chemiker noch keine Alternative zur ausreichenden Bereitstellung. Minimale Reaktionsausbeuten, modulare Reaktionen über zahlreiche Schritte und finale Syntheseprodukte mit inkorrekt Stereochemie (entscheidend für die Bioaktivität) sind die führenden Gründe, weshalb synthetische Nachbildungen von Hyperforin und anderen PPAPs bisher keinen kommerziellen Einzug in die Industrie finden. Ein anderer, vielversprechender Ansatz zur Gewinnung von Hyperforin bietet hingegen eine „grüne“ Synthese auf biotechnologischem Weg mittels rekombinanter Enzyme in transgenen (Mikro-)Organismen (wenig Chemikalienlast/-verschwendung, umweltschonend, energiesparend). Grundvoraussetzung dafür ist die vollständige **Aufklärung des Hyperforin-Biosyntheseweges**, d.h. es müssen die daran beteiligten Enzyme auf Gen-Ebene identifiziert sowie die Genprodukte biochemisch charakterisiert werden. Aktuell ist im Johanniskraut bereits mit der Entdeckung und funktionellen Untersuchung des Enzyms BUS^[149] die Bildung des AP-Grundgerüsts Phlorisobutyropheon (PIBP) belegt, und ein Protein-Gesamtextrakt aus *H. perforatum* konnte der postulierten Biosynthese entsprechend an dieses PIBP ein Molekül DMAPP kondensieren^[218]. Genetische Informationen zu dieser PT aus dem Proteinextrakt liegen aber genauso wenig vor wie es bisher sonstige Publikationen zu AS-PTs aus Johanniskraut gibt. In unserer Arbeitsgruppe (AG) erarbeiteten jedoch bereits KÜHLE^[219] und MÜLLER^[220] erste Ergebnisse in ihrer molekularen Analyse des Johanniskrauts und legten den Grundstein auf der Suche nach AS-PTs. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen nun PTs aus *H. perforatum*, die vorzugsweise Assoziationen zum Sekundärstoffwechsel zeigen, identifiziert und funktionell charakterisiert werden. Im Speziellen untergliedert sich das Projekt in folgende Einzelschritte:

- Identifizierung von AS-PT-Genen/Genfragmenten aus *H. perforatum* mit anschließender Gen-Vervollständigung und deren Klonierung
- Suche und Etablierung eines geeigneten heterologen Expressionssystems für Membranproteine
- Expressionsanalysen und funktionelle, d.h. qualitative Charakterisierung aktiver, rekombinanter AS-PTs aus *H. perforatum* sowie vier weiterer, heterolog exprimierter AS-PTs (3 aus *H. calycinum*, 1 PT aus *H. perforatum*) aus der Arbeit von MÜLLER^[220]

Der steigenden Nachfrage nach Hyperforin und Johanniskraut-haltigen Arzneimitteln (neue Anwendungsgebiete, Erweiterung der Indikation, erhöhtes gesellschaftliches Interesse an Naturmedizin, generelle Zunahme mentaler Erkrankungen) ist nur schwierig mit rein pflanzlichem Anbau nachzukommen. Anbauflächen sind nur begrenzt vorhanden, und dort angepflanzte Monokulturen unterliegen nicht nur schwankenden Gehalten^[221]. Trotz qualitätskontrollierter Kultivierung (GACP, EMEA/HMPC/246816/2005) kann es bei Anzucht und Ernte immer wieder zu kaum vermeidbaren Verunreinigungen (Beimischungen) kommen, die sich schlimmstenfalls durch Einschleppen von Toxinen in ganze Chargen bemerkbar machen und somit zu saisonalen Produktionsausfällen und Versorgungsengpässen führen können^[222]. Für eine bedarfsgerechte Versorgung sollte daher die **biotechnologische Produktion von Hyperforin** angestrebt werden, mit der nicht nur Hyperforin selber, sondern durch Kombination unterschiedlicher AS-PTs und Substrate nach Baukasten-Prinzip zusätzlich abgeleitete, neue Derivate mit veränderter Bioaktivität bzw. geringerem UAW-/Interaktionspotential gewonnen werden könnten^[223].



3 MATERIALIEN

3.1. Geräte und Hilfsmittel

Allgemein

Analysenwaagen	LA 230 S / ED 124 S	Sartorius AG
Bi-Destillierapparat	GFL-2104	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH
Bruchemaschine	ZBE 70-35	ZIEGRA Eismaschinen GmbH
Einwegmaterialien	6-Loch-Zellkulturplatten	Sarstedt AG & Co. KG
	Halb-Mikro-Küvetten (Polystyrol)	Sarstedt AG & Co. KG
	Kanülen Sterican® (Ø 0,6 x 25 mm)	B. Braun Melsungen AG
	Petrischalen (94 x 16 mm)	Greiner Bio One International GmbH
	Reaktionsgefäße (0,2 / 1,5 / 2 ml)	STARLAB International GmbH
	Spitzen (10 / 200 / 1.000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG
	Spritzen Injekt®-F (1 / 20 ml)	B. Braun Melsungen AG
	Spritzensterilfilter Acrodisc®, Supor® Membran (0,10 / 0,22 µm, 25 mm)	Pall Co.
Zentrifugenröhrchen (15 / 50 ml)	STARLAB International GmbH	
Fraktionensammler	Ultrorac® 7000	LKB-Produkter AG
Gefrierschränke	GS34V420 / GS30D410 (-20 °C)	SEG Hausgeräte GmbH
Gefrierschrank Ultra Low	MDF-U53V (-80 °C)	SANYO Electric Co., Ltd.
Gefriertrocknung	Gamma 1-20	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH
Glasflaschen	SCHOTT Duran® (50 / 100 / 250 / 500 ml)	SCHOTT AG
Glasgeräte	Bechergläser, Erlenmeyerkolben, Pasteurpipetten, Rundkolben, Trichter	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co. KG
Heizblock	Techne Dri-Block® DB 3D	Bibby Scientific Limited
	TH 21	HLC BioTech
Inkubationsschüttler	Infors HT Multitron Standard	Infors AG
	Innova 4300	New Brunswick Scientific, Eppendorf Inc.
Kühlschränke	TP 1760 Premium	Liebherr-International Deutschland GmbH
	VS 164.1	C. Bomann GmbH
Labor-pH-Meter	pH 325	WTW GmbH
Lichtmikroskop	Leitz Laborlux® 11	Hexagon Metrology GmbH
Magnetrührer	MR Hei-Standard	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
	RET basic	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Mikropipetten	Serie Research® Plus (10 / 100 / 1.000 µl)	Eppendorf AG
	Serie Proline (10 / 20 / 100 / 200 / 1.000 µl)	Sartorius Biohit Liquid Handling Oy
Präzisionswaagen	2254	Sartorius AG
	Kern 572-33	KERN & SOHN GmbH
Reinraumwerkbank	LaminAir® HLB 2472	Heraeus Holding GmbH
Reinstwasseranlage	arium® 611	Sartorius AG
Schwenk-Inkubator	Inkubator 1000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Silikon-Septum	Stopfen mit umstülpbarem Rand (für NS 29)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Standautoklav	VX-120	Systec GmbH
Tischschüttler	Infors HT Labtron	Infors AG
Tischzentrifuge	Sigma 1-15 K	Sigma Laborzentrifugen GmbH
	Allegra® X-30R	Beckman Coulter, Inc.
	Biofuge® pico	Heraeus Holding GmbH
	Universal 32 R 1610	Andreas Hettich GmbH & Co. KG
Ultraschallbad	Sonorex TK 30	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG



3 | Materialien

Ultraschall-Homogenisator	Sonifier® 250	Branson Ultrasonics Co.
Ultrazentrifuge	Avanti™ J-30I (Rotor: JA-30.50 Ti)	Beckman Coulter, Inc.
UV-Spektrophotometer	Ultrospec 1.000 / Ultrospec 3.100 <i>pro</i> UVmini-1240	Amersham Biosciences Europe GmbH Shimadzu Co.
Vakuum-Rotationsverdampfer	LVS 110 / Laborata 4000-efficient	Ilmvac GmbH / Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Vortexmischer	VF2 Vortex-Genie 2	IKA®-Werke GmbH & CO. KG Scientific Industries, Inc.
Wärme-/Trockenschrank	T5050	Heraeus Holding GmbH
Wasserbad	MW 4	JULABO GmbH
Zentrifugenbecher	Polycarbonat-Schraubdeckel-Gefäße (50 ml)	Beckman Coulter, Inc.

Chromatographie und Analytik

DC-Fertigplatten	0,1 mm Cellulose (20 x 20 cm)	Merck Millipore Co.
	0,2 mm Kieselgel 60 F ₂₅₄ (20 x 20 cm)	Merck Millipore Co.
	0,2 mm Nano-Sil C ₁₈ -100 UV ₂₅₄ (10 x 10 cm)	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
DC-Mikropipetten	Blaubrand® intraMARK (5 µl)	BRAND GMBH & CO. KG
Derivatisierungsöfen	GC 5890 A	Hewlett-Packard Company
HPLC	1260 Infinity Quaternary LC System: G1329B 1260 ALS / G1315D 1260 DAD VL / G1311C 1260 Quat Pump VL / G1316A 1260 TCC / Agilent ZORBAX Eclipse Plus C ₁₈ Rapid Resolution (4,6 x 100 mm, 3,5 µm)	Agilent Technologies, Inc.
	Hitachi LaChrom Elite®: Autosampler L-2.200 / DAD L-2455 / Pumpe L-2130 / Entgaser Model 2005 / Phenomenex HyperClone™ 5 µm ODS (C ₁₈) 120 Å (4,6 x 150 mm, 5 µm)	VWR International GmbH
NMR-Spektrometer	Avance II 600, 5 mm TCI CryoProbe	Bruker Co.
Massenspektrometer	3200 Q Trap LC/MS/MS System	AB SCIEX Germany GmbH
Probengefäße	1,5 ml KGW-Flasche (32 x 11,6 mm, Kl. 1) / 0,1 ml Mikroinsert (31 x 6 mm) / 9 mm PP-SK, Silicon weiß/PTFE rot (1 mm)	VWR International GmbH
Probenkonzentrator	Techne Probenkonzentrator	Bibby Scientific Limited
UV-Betrachtungskasten	UV-Kabinett	CAMAG

Fluoreszenzmikroskopische Messungen

Konfokales Laser Scanning Mikroskop	System Serie A1: 60 x Ölimmersionsobjektiv (Plan Apo VC 60 x Oil DIC N2, NA 1,4; 0,40 µm/px) / Melles Griot® Argon-Laser 457–514 nm 40 mW	Nikon Instruments Europe BV
Multiwellplatten	24 Well SensoPlate™ mit Glasboden	Greiner Bio One International GmbH

Molekularbiologische Arbeiten

Absaugsystem	VACUSAFE comfort	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH
Brutschrank	Modell BD 53	BINDER GmbH
	Stabilitherm	Thermo Fisher Scientific Inc.
Gelkammer Agarose-Gel	(Wide) Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Glaskugeln	Glass beads, acid-washed (425–600 µm)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Mikrowelle	OptiQuick Compact Y52	Krupps GmbH
Schüttelinkubator	KF-4	Infors AG
	Excella® E24	New Brunswick Scientific, Eppendorf Inc.
Spannungs-/Stromquelle	PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Thermocycler	TPersonal / TProfessional Basic Gradient	Biometra GmbH



Transilluminator	Infinity™ 3000 Blue LED Transilluminator	Vilber Lourmat Deutschland GmbH Nippon Genetics Europe GmbH
Vakuumpkonzentrator	SpeedDry RVC 2-18 CD	Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH

Biochemische Arbeiten

Gelkammer PAGE	Mini-PROTEAN® system	Bio-Rad Laboratories, Inc.
Glucose-Teststreifen	Combina 11 S	HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH
Kleinschüttler	VXR basic Vibrax®	IKA®-Werke GmbH & CO. KG
Spannungs-/Stromquelle	Standard Power Pack P25	Biometra GmbH

3.2. Chemikalien, (Bio-)Reagenzien und Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und (Bio-)Reagenzien wurden, bis auf einzeln unten aufgelistete Ausnahmen, von den Firmen AppliChem GmbH, Carl Roth GmbH + Co. KG, Fisher Scientific GmbH (inkl. Acros Organics), Merck Millipore Co. und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (inkl. Fluka und Riedel-de Haën) bezogen und sind wegen einzelner verfügbarkeits- und angebotsbedingter Lieferantenwechsel nicht im Detail aufgelistet. Der Reinheitsgrad aller Substanzen für chemische Synthesen betrug mindestens „zur Synthese“, für molekularbiologische und biochemische Arbeiten „rein/reinst“ bzw. „zur Analyse“ bei Lösemitteln und für die instrumentelle Analytik fanden „ultrareine“ Lösemittel Anwendung.

Chemikalien und (Bio-)Reagenzien

Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamid : Bisacrylamid 37,5:1)	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bacto Casaminosäuren	Becton Dickinson GmbH
Cellulosepulver MN 2100	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG
Midori Green DNA Stain	NIPPON Genetics EUROPE GmbH
peqGOLD Universal Agarose	PeqLab, VWR International GmbH
Polyclar® AT (PVP)	SERVA Electrophoresis GmbH
TRIzol®	Ambion®, Thermo Fisher Scientific Inc.

Enzyme

Reverse Transkriptasen	M-MuLV Reverse Transcriptase	New England Biolabs, Inc.
	RevertAid™ H Minus Reverse Transcriptase	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.
	SMARTScribe™ Reverse Transcriptase	Clontech Laboratories, Inc., Takara Bio Co.
DNA-Polymerasen	OneTaq® DNA Polymerase	New England Biolabs, Inc.
	peqGOLD Taq-DNA-Polymerase	PeqLab, VWR International GmbH
	Phusion® Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	Finnzymes, Thermo Fisher Scientific Inc.
	Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Inc.
	Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs, Inc.
Restriktionsendonukleasen	BamHI (G↓GATCC)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	(FastDigest) EcoRI (G↓AATC)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	HindIII (A↓AGCTT)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	KpnI (GGTAC↓C)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	NotI (GC↓GGCCGC)	New England Biolabs, Inc.
	PacI (TTAAT↓TAA)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	XbaI (T↓CTAGA)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	XhoI (C↓TCGAG)	Thermo Fisher Scientific Inc.



<i>Weitere Enzyme</i>	DNase I (RNase-free)	Thermo Fisher Scientific Inc.
	FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Fisher Scientific Inc.
	RiboLock™ RNase Inhibitor	Thermo Fisher Scientific Inc.
	RNase A	Thermo Fisher Scientific Inc.
	Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.
	T4 DNA Ligase	Thermo Fisher Scientific Inc.

3.3. Reagenziensysteme

Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System	Invitrogen™, Life Technologies GmbH
Cellfectin® II Reagent	Invitrogen™, Life Technologies GmbH
GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit	Thermo Fisher Scientific Inc.
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena AG
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	PeqLab, VWR International GmbH
RNeasy® Plant Mini Kit	QIAGEN GmbH
S.c. EasyComp™ Transformation Kit	Invitrogen™, Life Technologies GmbH
SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech Laboratories Inc., Takara Bio Inc.

3.4. Puffer und Lösungen

Alle im Folgenden aufgelisteten Puffer und Lösungen wurden mit demineralisiertem Reinstwasser angesetzt, sofern nicht anders angegeben. Der gewünschte pH-Wert wurde jeweils mit einer geeigneten Säure bzw. Base in den Zielbereich abgesenkt oder angehoben. Mit Ausnahme der Reagenzien für die chemischen Synthesen wurden alle Puffer und Lösungen vor dem erstmaligen Gebrauch autoklaviert (121 °C und 2 bar für 20 min) und thermolabile Zusatzstoffe (wie z.B. Antibiotika), die in Lösung gebracht und sterilfiltriert wurden, im Anschluss unter aseptischen Bedingungen hinzugefügt.

Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

<i>RNA-Extraktionspuffer (pH 8,0)</i>	CTAB	20,0	mg/ml
	EDTA	25,0	mM
	NaCl	2,0	M
	PVP	20,0	mg/ml
	Spermidin	0,5	mg/ml
	TRIS-HCl	100,0	mM
	direkt vor Gebrauch hinzufügen: β-Mercaptoethanol	20,0	ml/l
<i>SSTE-Puffer (pH 8,0)</i>	EDTA	1,0	mM
	NaCl	1,0	M
	SDS	5,0	mg/ml
	TRIS-HCl	10,0	mM
<i>TAE-Puffer (pH 8,0)</i>	EDTA	1,0	μM
	TRIS-Acetat	40,0	mM
<i>6x DNA-Ladepuffer (pH 7,6)</i>	Bromphenolblau	0,3	mg/ml
	EDTA	60,0	mM
	Glycerin	0,6	ml/ml
	Xylencyanol	0,3	mg/ml
	TRIS-HCl	10,0	mM
<i>Agarose-Trenngel (1%)</i>	TAE-Puffer (pH 8,0) + Agarose	10,0	mg/ml
	Midori Green DNA Stain	0,025	μl/ml



<i>Puffer 1 (pH 8,0)</i>	EDTA	10,0	mM
	TRIS-HCl	50,0	mM
	direkt vor Gebrauch hinzufügen: RNase A	10,0	µg/ml
<i>Puffer 2</i>	NaOH	200,0	mM
	SDS	10,0	mg/ml
<i>Puffer 3 (pH 5,5)</i>	Kaliumacetat	3,0	M
	Essigsäure	120,0	ml/l
<i>Puffer P_y (pH 8,0)</i>	EDTA	1,0	mM
	NaCl	100,0	mM
	SDS	10,0	mg/ml
	TRIS-HCl	10,0	mM
	Triton X-100	20,0	µl/ml

Lösungen für biochemische Arbeiten

<i>TEK-Puffer (pH 7,4)</i>	EDTA	1,0	mM
	KCl	100,0	mM
	TRIS-HCl	50,0	mM
<i>TES-B-Puffer (pH 7,4)</i>	EDTA	1,0	mM
	Sorbitol	0,6	M
	TRIS-HCl	50,0	mM
<i>TEG-Puffer (pH 7,4)</i>	EDTA	1,0	mM
	Glycerin	0,2	ml/ml
	TRIS-HCl	50,0	mM
<i>Sonication-Puffer (pH 7,5)</i>	EDTA	1,0	mM
	Glycerin	0,1	ml/ml
	TRIS-HCl	50,0	mM
<i>Puffer A (pH 7,5)</i>	Glycerin	0,1	ml/ml
	NaCl	300,0	mM
	TRIS-HCl	50,0	mM
<i>Bradford-Reagenz</i>	Coomassie-Brillant-Blau G-250	100,0	mg/l
	Ethanol 96% (V/V)	50,0	ml/l
	Phosphorsäure 85%	100,0	ml/l
<i>SDS-PAGE-Sammelgel (4%)</i>	Rotiphorese® Gel 30	0,65	ml
	dH ₂ O	3,05	ml
	SDS (100 mg/ml)	50,0	µl
	0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	1,25	ml
	direkt vorm Gießen hinzufügen: APS (100 mg/ml)	30,0	µl
	und TEMED	20,0	µl
<i>SDS-PAGE-Trenngel (12%)</i>	Rotiphorese® Gel 30	2,2	ml
	dH ₂ O	1,65	ml
	SDS (100 mg/ml)	50,0	µl
	1,5 M TRIS-HCl (pH 8,8)	1,25	ml
	direkt vorm Gießen hinzufügen: APS (100 mg/ml)	30,0	µl
	und TEMED	20,0	µl

3x SDS-PAGE-Probenpuffer	Bromphenolblau	21,0	mg
	Glycerin	5,0	ml
	dH ₂ O	4,4	ml
	SDS	1,0	g
	0,5 M TRIS-HCl (pH 6,8)	6,25	ml
direkt vor Gebrauch hinzufügen:	DTT	75,0	mg
SDS-PAGE-Laufpuffer	Glycin	14,4	g/l
	SDS	1,0	g/l
	TRIS	3,03	g/l
Coomassie-Färbelösung	Coomassie-Brillant-Blau R-250	0,5	g/l
	Essigsäure	100,0	ml/l
	Methanol	500,0	ml/l
Coomassie-Entfärbelösung	Essigsäure	50,0	ml/l
	Ethanol	165,0	ml/l

Lösungen für chemische Synthesen

Ionenaustausch-Puffer	2-Propanol	20,0	ml/l
	Ammoniumhydrogencarbonat	2,0	g/l
Cellulose-Chromatographie-Puffer	2-Propanol	500,0	ml/l
	Acetonitril	250,0	ml/l
	Ammoniumhydrogencarbonat	4,0	g/l
Sprühreagenz-Lösung I (vor Gebrauch frisch herstellen)	5-Sulfosalicylsäure	1,0	g
	Ethanol	60,0	ml
	dH ₂ O	40,0	ml
Sprühreagenz-Lösung II (vor Gebrauch frisch herstellen)	Eisen(III)-chlorid	0,2	g
	Ethanol	80,0	ml
	dH ₂ O	20,0	ml

3.5. Pflanzen (-zellkultur)

Hypericum calycinum L.

Zellsuspensionskultur	AG Beerhues (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig)
-----------------------	--

Hypericum perforatum L.

Blätter / Blüten / Früchte / Knospen	Arzneipflanzengarten (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig)
→ auf Eis gesammelt, in flüssigem Stickstoff gefroren und direkt weiterverarbeitet bzw. bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert	

3.6. Klonierungs- und Expressionsorganismen

Bakterienstämme

DH5α Competent <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	<i>F'</i> Φ 80 δ lacZ Δ M15 end A1 rec A1 hsdR17(<i>rk⁻ mk⁺</i>) supE44 thi-1 λ ⁻ gyrA96 relA1 Δ (lacZYA-argFV169) deoR
MAX Efficiency® DH10Bac™ Competent <i>E. coli</i>	<i>F</i> <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 endA1 araD139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 galU galK λ ⁻ rpsL nupG/ bMON14272/ pMON7124
NEB 5α Competent <i>E. coli</i> (High Efficiency)	<i>fhuA2 D</i> (argF-lacZ)U169 <i>phoA glnV44 f80D</i> (lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17



Hefestamm zur Expression

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S. cerevisiae</i>) INVSc1	MAT α his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52 MAT α his3D1 leu2 trp1-289 ura3-52
---	---

Insektenzellstamm zur Expression

<i>Spodoptera frugiperda</i> (<i>S. frugiperda</i>) Gibco® Sf9	Invitrogen™, Life Technologies GmbH
--	-------------------------------------

3.7. (Zell-)Kulturmedien

Alle unten aufgelisteten Kulturmedien wurden wie unter 3.4 beschrieben angesetzt, eingestellt und für den Einsatz vorbereitet.

Medien für Bakterienkulturen

LB-Agar (pH 7,0)	LB-Medium (pH 7,0) + Agar	15,0	g/l
LB-Medium (pH 7,0)	Hefeextrakt	5,0	g/l
	NaCl	10,0	g/l
	Pepton aus Casein	10,0	g/l
SOC-Medium	Glucose	20,0	mM
	Hefeextrakt	5,0	g/l
	KCl	10,0	mM
	MgCl ₂	10,0	mM
	MgSO ₄	10,0	mM
	NaCl	10,0	mM
	Pepton aus Casein	20,0	g/l

Medien für Hefekulturen

SGI-Agar	SGI-Medium + Agar	20,0	g/l
SGI-Medium	Adenin	0,04	g/l
	Bacto Casaminosäuren	1,0	g/l
	Glucose	20,0	g/l
	Histidin	0,03	g/l
	Leucin	0,03	g/l
	Tryptophan	0,02	g/l
	Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren	6,7	g/l
YPGA-Agar	YPGA-Medium + Agar	20,0	g/l
YPGA-Medium	Adenin	0,04	g/l
	Glucose	20,0	g/l
	Hefeextrakt	10,0	g/l
	Pepton aus Casein	10,0	g/l
YPGE-Medium	Ethanol	30,0	ml/l
	Glucose	5,0	g/l
	Hefeextrakt	10,0	g/l
	Pepton aus Casein	10,0	g/l

Medien für Insektenzellkulturen

Grundmedium	Sf-900™ II SFM	Invitrogen™, Life Technologies GmbH	
Sf9-Medium	Sf-900™ II SFM + Fetales Rinderserum Penicillin / Streptomycin	100,0	g/l
		10,0	g/l

Medium für Zellsuspensionskulturen

<i>LS-Medium (pH 6,0-6,3)</i>			
1-Naphthylessigsäure	0,186	mg/l	
2,4-Dichlorphenoxyessigsäure	0,22	mg/l	
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	440,0	mg/l	
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025	mg/l	
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025	mg/l	
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	27,8	mg/l	
H ₃ BO ₃	6,2	mg/l	
KH ₂ PO ₄	170,0	mg/l	
KI	0,83	mg/l	
KNO ₃	1900,0	mg/l	
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	370,0	mg/l	
MnSO ₄ · H ₂ O	19,9	mg/l	
myo-Inositol	100,0	mg/l	
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	41,3	mg/l	
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0,25	mg/l	
NH ₄ NO ₃	1650,0	mg/l	
Saccharose	30,0	g/l	
Thiamin-HCl	0,4	mg/l	
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	10,6	mg/l	

3.8. DNA: Oligonukleotide und Plasmide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden bei den Firmen Eurofins Genomics GmbH oder Microsynth AG synthetisiert, lyophilisiert ausgeliefert und in demineralisiertem Reinstwasser zu 100 µM gelöst. Das Designen aller Oligonukleotide wurde entsprechend der allgemein gültigen Empfehlungen durchgeführt^[224]. Expressionsprimer wurden zusätzlich zu ihrer komplementären Nukleinsäure-Sequenz am 5'-Ende um eine geeignete Restriktionsschnittstelle ergänzt, welche sich auch im jeweiligen Expressionsvektor wiederfindet. Daran anschließend wurden drei weitere, zufällig gewählte Nukleobasen angehängt, welche die Erkennungssequenz der Restriktionsendonukleasen (REs) vor einem möglichen unspezifischen Abbau bewahren.

Degenerierte Oligonukleotide stellen Gemische von sequenzähnlichen Oligonukleotiden dar, die sich durch eine oder mehrere variierende Nukleobasen an definierten Positionen auszeichnen. Je mehr Nukleobasen variabel sind, desto höher der Degenerationsgrad (= Produkt aller möglichen austauschbaren Positionen im Oligonukleotid), d.h. desto mehr unterschiedliche Einzel-Oligonukleotide liegen in einem Gemisch in gleicher Menge vor. Dabei ist zu beachten, dass mit steigendem Degenerationsgrad die Spezifität sinkt, weshalb ein Wert von ≤256 nicht überschritten werden sollte, um in einer PCR noch eine ausreichend hohe Menge an spezifischem Oligonukleotid zu gewährleisten. Mit der Verwendung der neutralen Base Desoxyinosin, die mit allen vier Nukleobasen hybridisieren kann, ist es beim Designen von degenerierten Oligonukleotiden mit komplett variablen Positionen dennoch möglich den Degenerationsgrad niedrig zu halten, da an Stelle des Faktors vier für jede einzelne Nukleobase nur der Faktor eins für das Desoxyinosin eingerechnet werden muss.

Degenerierte Oligonukleotide

M = A/C, Y = C/T, W = A/T, R = A/G, I = Desoxyinosin

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>
BIG_DEGEN_FOR	5'- GAAMYWGAYARGATWAAAYAARCC -3'
BIG_DEGEN_REV	5'- ATCTCCITYIRYRTCWGRWAIATC -3'



Oligonukleotide für PTs aus *H. perforatum*

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3', Restriktionsschnittstellen unterstrichen)</u>
10745_BamHI_for	nach Publikation in der wissenschaftlichen Fachpresse verfügbar!
10745_KpnI_rev	nach Publikation in der wissenschaftlichen Fachpresse verfügbar!
15746_BamHI_for	5'- AAT <u>GGATCC</u> ATGGAGACCTTTCGCTTCCCTC -3'
15746_XhoI_rev	5'- AAT <u>CTCGAG</u> TAAATGAATGGAAACAGCAAAATTTGGACAAG -3'
2013053_BamHI_for	5'- AAT <u>GGATCC</u> ATGGACGTTTCCAGTGCTGCTTTCAC -3'
2013053_XhoI_rev	5'- AAT <u>CTCGAG</u> CTAGAGGAATAGAAGCGTGATAAACTGCAG -3'
2095043_BamHI_for	5'- AAT <u>GGATCC</u> ATGGATCTCTCTCCACCACCTTCTTC -3'
2095043_XhoI_rev	5'- AAT <u>CTCGAG</u> CTAGATAAAAATAAATAAAGCGTACTCCGCACG -3'
4472_for1	5'- CTAAGGCTTCTACTTTTGGAGCTCC -3'
4472_for2	5'- CAAGCAGTTTTGGGAGTCCCTTTTCG -3'
4472_rev1	5'- CCATACATGCGGGGTCTCAACC -3'
4472_rev2	5'- GCTTCACTTTTCTCGGATGTTTCAGG -3'
470_pFastBac_For	5'- ATT <u>GAATTC</u> ATGGAGATCTCTGCTTTCCTTCATCTGC -3'
470_pFastBac_Re	5'- ATT <u>CTCGAG</u> CTAGATGAAGGGAAGTAGGATTAAGTGGGC -3'
9259_for_BamHI	nach Publikation in der wissenschaftlichen Fachpresse verfügbar!
9259_rev_KpnI	nach Publikation in der wissenschaftlichen Fachpresse verfügbar!
gnl_10745_5-rev	5'- CGTCCAGCAAATCCGACAAGG -3'
hpa_8393_for	5'- AAT <u>GGATCC</u> ATGGAGCTCTCCATTTTCCCGTCTCTC -3'
hpa_8393_rev	5'- AAT <u>CTCGAG</u> TAGATGAAAGGGAAGAGGGCGTACTCGG -3'
PR.V6_FOR	5'- GTACGCGGGACACAAAGCAATTGG -3'
PR.V6_11.3,19.3	5'- CCTCCGGAATTACTTAGAACTTGTGC -3'
PT4472_F1	5'- CTCAACTCCGATGGAAATCTCC -3'
PT4472_F2	5'- GATTGCCTTCGTCTGCTCTG -3'
PT4472_F_EX	5'- AAT <u>GGATCC</u> ATGGAAATCTCCCGATTGC -3'
PT4472_R_EX	5'- AAT <u>GGTACC</u> CTAAATAAACGGGAACAATAAAGTTTG -3'
PTF-1_cut_for	5'- ATT <u>GGATCC</u> ATGTCAAGCACGGGCTCAGGAGG -3'
Tex_for_BamHI	5'- ATT <u>GGATCC</u> ATGGACGTTTCCAGTTCTGCTTTCACAC -3'
Tex_rev_KpnI	5'- ATT <u>GGTACC</u> CTAGAGGAATGGAAGCGTGATAAACTGC -3'
To_PL.V6_3'R1	5'- CAGTTTGGTTATAGCTGGAGCTCTG -3'
To_PL.V6_3'R2	5'- CCTTCCGCTTTAAGGCGTCCACC -3'
To_PL.V6_5'R1	5'- CCTGGCTGGTTGAAAATATGGTGG -3'
To_PL.V6_5'R2	5'- GCCAATGGTGGACGCCTTAAAGC -3'
To_PL.V6_5'R3	5'- GGAAAGGGGAACGGAATATACC -3'

Oligonukleotide für PTs aus *H. calycinum*

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3', Restriktionsschnittstellen unterstrichen)</u>
290_pFastBac_For	5'- ATT <u>GAATTC</u> ATGGAGCTCTCCCGGATGC -3'
290_pFastBac_Re	5'- ATT <u>CTCGAG</u> CTAAACGAAAGGAAGCAGAATATACTGC -3'
339_pFastBac_For	5'- ATT <u>GAATTC</u> ATGGAGGTTTCTCGATTGCCATCG -3'
339_pFastBac_Re	5'- ATT <u>AAGCTT</u> CTAGATGAAGGGGAGCAAGATAAATTGC -3'
HcPT-1_KpnI_rev	5'- AAT <u>GGTACC</u> CTAAATAAAAAGGAAATATGGCCCACTCTGC -3'
HcPT-1_XhoI_for	5'- AAT <u>CTCGAG</u> ATGGATAATCTATCCCTCTCCCTTCC -3'
HcPT-2_GFP_rev	5'- AA <u>ATCTAG</u> AAACGAAAGGAAGCAGAATATACTGC -3'
HcPT-2_oT_for	5'- AAT <u>GAATTC</u> ATGGCCACTCCCGCCGTTTCGTACC -3'
HcPT-2_oT_GFP_rev	5'- AA <u>ATCTAG</u> AAACGAAAGGAAGCAGAATATACTGCACAACG -3'
HcPT-2_oT_rev	5'- AAT <u>TAAATTA</u> ACTAAACGAAAGGAAGCAGAATATACTGCACAACGTAGAC -3'

**Oligonukleotide für RACE-Anwendungen**

V = A/C/G, N = A/C/G/T

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>
3'-RACE CDS Primer A	5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN -3'
5'-RACE CDS Primer A	5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN -3'
RACE long	5'- CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT -3'
RACE short	5'- CTAATACGACTCACTATAGGGC -3'
SMARTer II™ A Oligo	5'- AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG -3'

Oligonukleotide zum Sequenzieren

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3')</u>
GAL 1-for	5'- ATTTTCGGTTTGTATTACTTC -3'
GAL 1-rev	5'- GTTCTTAATACTAACATAACT -3'
GAL 10-for	5'- GGTGGTAATGCCATGTAATATG -3'
GAL 10-rev	5'- GGCAAGGTAGACAAGCCGACAAC -3'
M13 uni (forward)	5'- TGTA AAAACGACGGCCAGT -3'
pFB1_Seq_for	5'- CTAGTGGTTGGCTACGTATACTC -3'
pFB1_Seq_rev	5'- GCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGG -3'
SP6 (reverse)	5'- ATTTAGGTGACACTATAGAA -3'

Sonstige Oligonukleotide

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5'→3', Restriktionsschnittstellen unterstrichen)</u>
pFB1_GFP_F	5'- AAT <u>CTCGAG</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG -3'
pFB1_GFP_R	5'- AATA <u>AAGCT</u> TTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC -3'

Vektoren

pESC-URA	Hefe-Expressionsvektor	Stratagene, Agilent Technologies, Inc.
pET-52b(+)-eGFP	eGFP-Donorplasmid	AG Wittstock (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig)
pFastBac™ 1	Insektenzell-Transfervektor	Invitrogen™, Life Technologies GmbH
pGEM®-T easy	T-Überhang-Klonierungsvektor	Promega GmbH

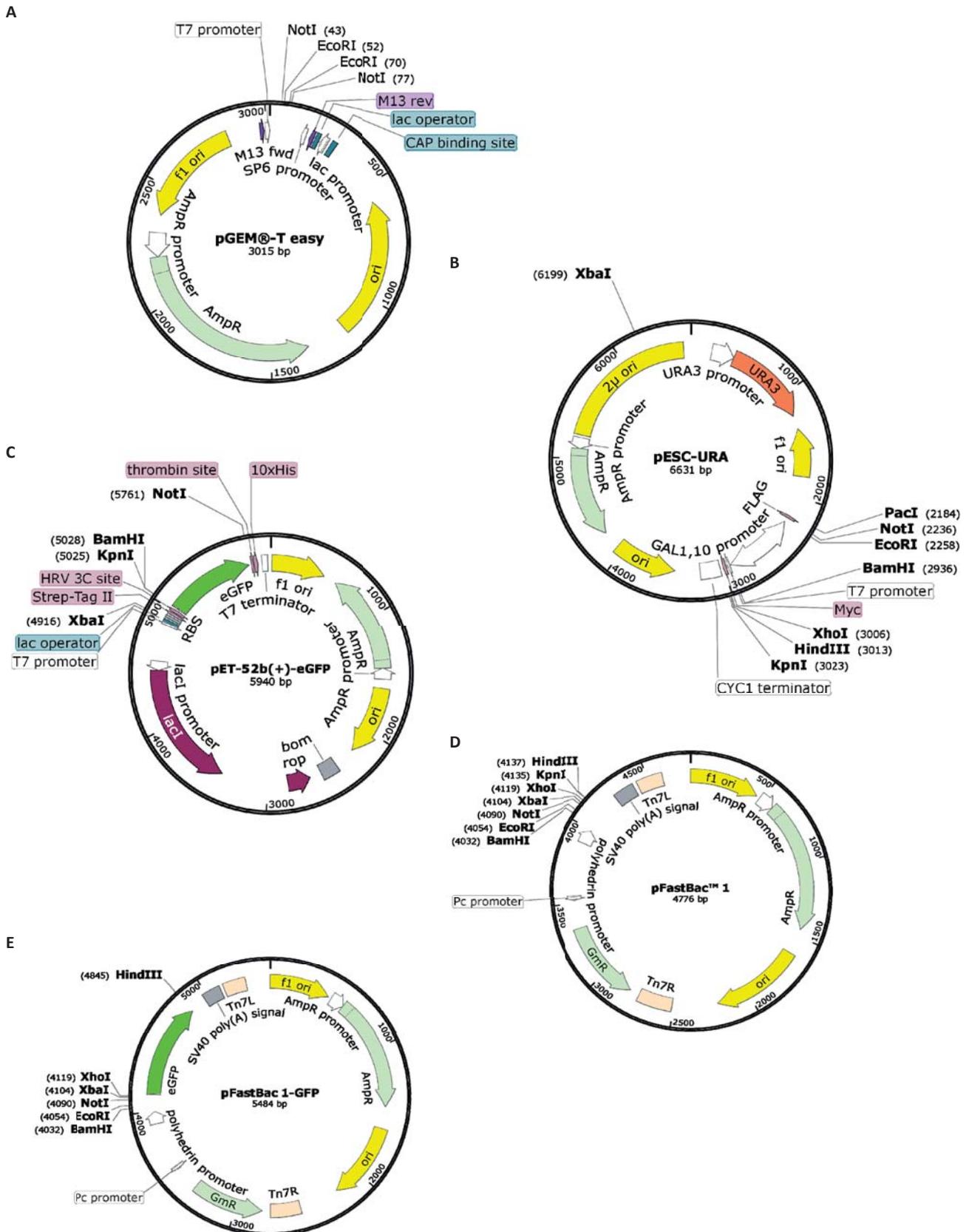


Abbildung 3.1 Vektorkarten verwendeter Klonierungs-/Expressionsplasmide mit spezifischen Plasmid-Eigenschaften (A–E; erstellt mit SnapGene® Viewer)

3.9. Verwendete Software und Online-Tools

Desktop-Software

Agilent ChemStation for LC 3D systems Rev. B.04.03(16)	Agilent Technologies, Inc.
Analyst Software 1.6.2	AB SCIEX Germany GmbH
BioEdit version 7.2.5	Tom Hall, Isis Pharmaceuticals Inc.
ChemBioDraw Ultra 12.0	Cambridge Soft, PerkinElmer Inc.
FastPCR 4.0	Ruslan Kalendar, PrimerDigital Ltd.
GENTle 1.9.4	Magnus Manske – http://gentle.magnusmanske.de/
Hyper32 1.0.0	John S. Easterby – http://homepage.ntlworld.com/john.easterby/hyper32.html
Infinity Capt 15.06	Vilber Lourmat Deutschland GmbH
IrfanView 4.36	Irfan Skiljan – http://irfanview.com/
Mega 6.06	Koichiro Tamura, Glen Stecher, Daniel Peterson, Sudhir Kumar – http://megasoftware.net/mega.php
Microsoft Office 2010	Microsoft Co.
NIS-Elements Microscope Imaging Software/Viewer 4.20	Nikon Instruments Europe B.V.
SnapGene® Viewer 2.8.2	GSL Biotech LLC.

Online-Software

(Alle gelisteten URLs wurden letztmals am 11. Juni 2016 positiv auf ihre Aktualität überprüft.)

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (NCBI-BLAST)	http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
BLAST for 1.000 Plants (Transkriptom)	https://bioinfodata.org/Blast4OneKP/home
Calculation of protein isoelectric point	http://isoelectric.ovh.org/
ChloroP 1.1 Server	http://cbs.dtu.dk/services/ChloroP/
DoubleDigest Calculator	https://thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html
ExpASy ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
ExpASy Translate	http://web.expasy.org/translate/
iPSORT	http://ipsort.hgc.jp/index.html
Medicinal Plants Genomics Resource (Transkriptom)	http://medicinalplantgenomics.msu.edu/index.shtml
MultAlin	http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/
MWG Primer-Überprüfung	http://ecom2.mwgdna.com/services/oligo/appl-oligos.tcl?ot=OLIGO_PCR
Oligo Calc	http://basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html
PhytoMetaSyn (Transkriptom)	http://phytometasyn.ca/
Predotar	https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html
PROTEIN CALCULATOR v. 3.4	http://protcalc.sourceforge.net/
SIAS (Sequence Identity And Similarity)	http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html
SOSUI Prediction of Membrane Proteins	http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/
TargetP 1.1 Server	http://cbs.dtu.dk/services/TargetP/
TMHMM Server v. 2.0	http://cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
ViroBLAST (Transkriptom)	http://webblast.ipk-gatersleben.de



4 METHODEN

4.1. Kultivierung und Elicitor-Behandlung von Zellsuspensionskulturen

Die Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum*, angezogen in LS-Medium (siehe 3.7)^[225], waren bei Antritt der Forschungsarbeiten bereits in unserer Arbeitsgruppe (AG) etabliert^[149]. Sie wurden als 50 ml-Proben in 250 ml-Erlenmeyerkolben bei 22 °C und 125 min⁻¹ auf einem Tischschüttler im Dunkeln kultiviert und nach jeweils zwei Wochen auf frisches LS-Medium überimpft. Dabei wurden unter sterilen Bedingungen die Zellen durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt und je 3 g in 50 ml frischem LS-Medium suspendiert.

Um die Zellsuspensionskulturen zur Expression induzierbarer PTs und Bildung von prenylierten Sekundärstoffen anzuregen, wurden ihnen sterile Hefeextrakt-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3 g/l hinzugefügt, und parallel wurde eine Vergleichskultur als Negativkontrolle in gleicher Weise mit sterilem dH₂O statt Elicitor-Lösung angefertigt. Entweder 8 h oder 24 h nach Elicitor-Behandlung wurden die Zellen für eine anschließende Extraktion von RNA oder gebildeten Sekundärstoffen durch Vakuumfiltration vom Medium getrennt, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.



Abbildung 4.1 Kulturkolben mit Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* im Tischschüttler

4.2. Chemische Synthesen

4.2.1. Synthese von Dimethylallyldiphosphat

Das Trisammoniumsalz von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) wurde, wie bereits in unserer AG beschrieben^[220], in Anlehnung an eine Methode zur Synthese von Geranyldiphosphat^[226] synthetisiert, wobei Schritt A – die Bereitstellung eines reaktiven Prenylchlorids – aufgrund der kommerziellen Verfügbarkeit der Substanz 1-Chlor-3-methylbut-2-en übersprungen wurde. Für den wasserfreien Reaktionsablauf wurden in einem über Nacht hitzetrockneten 100 ml-Rundkolben mit Rührfisch 5,64 mmol Tris-(tetrabutylammonium)-hydrogendiphosphat in 20 ml trockenem Acetonitril suspendiert, der Kolben mit Stickstoffgas evakuiert und mit einem Silikon-Septum verschlossen. Mit Hilfe einer Kanüle wurden 2,91 mmol 1-Chlor-3-methylbut-2-en durch das Septum in den Kolben gegeben und der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur für 2 h gerührt. Anschließend wurde das Lösemittel am Vakuumrotationsverdampfer (VRV) bei 40 °C und 150 mbar vollständig abgezogen und der blassgelbe, viskose Rückstand in 3 ml Ionenaustausch-Puffer (siehe 3.4) gelöst. Diese Lösung wurde auf eine Ionenaustauscher-Säule (DOWEX® AG 50W-X8, 100–200 mesh,

vorbereitet als NH_4^+ -Form gemäß Original-Vorschrift) geladen und mit Ionenaustausch-Puffer (360 ml, Tropfgeschwindigkeit: ca. 10 ml/min) über die Säule geführt. Nachdem das Eluat mittels Lyophilisierung für ca. 28 h vollständig getrocknet worden war, wurde der Rückstand in 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung wieder aufgenommen und die Synthesemischung mehrmals extrahiert. Dazu wurden 20 ml eines Gemisches von 2-Propanol und Acetonitril (1:1, V/V) dazugegeben, mittels Vortexen gut gemischt und ein ausfallender Niederschlag bei 1.000 x g für 5 min abzentrifugiert, wobei der klare Überstand anschließend vorsichtig abgenommen wurde. Dieser Schritt wurde wiederholt sowie drei weitere Extraktionen mit 2 ml 50 mM NH_4HCO_3 -Lösung und 8 ml des 1:1-Gemisches 2-Propanol : Acetonitril (V/V) angefügt. Die vereinten Überstände wurden wie zuvor beschrieben am VRV auf ca. 5 ml eingengt und mit 5 ml Cellulose-Chromatographie-Puffer (siehe 3.4) versetzt. Das Gemisch wurde vollständig auf eine Cellulose-Säule (Cellulosepulver MN 2100, vorbehandelt gemäß Original-Vorschrift) geladen. Unter Verwendung von Cellulose-Chromatographie-Puffer als mobile Phase wurden nach einem Vorlauf eines Säulenvolumens Fraktionen zu je 15 ml Eluat gesammelt. Die Kontrolle der einzelnen Fraktionen auf DMAPP erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) unter Verwendung von Cellulose-DC-Fertigplatten (siehe 3.1) als stationäre und Cellulose-Chromatographie-Puffer als mobile Phase. Zur Detektion diente ein Reaktionsgemisch aus Sprühreagenz-Lösung I und Sprühreagenz-Lösung II, welche – nacheinander auf die entwickelten DC-Platten gesprüht – phosphathaltige Verbindungen als weiße Banden auf rosa-gefärbtem Hintergrund sichtbar machten (siehe Anhang 10.1). DMAPP enthaltende Fraktionen wurden vereint, am VRV eingengt und mittels Lyophilisierung vollständig getrocknet. Das gereinigte Syntheseprodukt wurde in methanolischer Lösung mittels Massenspektrometrie (MS; siehe 4.8) auf DMAPP kontrolliert, anschließend in einem Gemisch aus Methanol und 10 mM NH_4OH -Lösung (7:3, V/V) zu einer 50 mM Lösung aufgenommen und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

Geranyldiphosphat (GPP) wurde in unserer AG entsprechend der obigen Vorschrift – unter Verwendung von 2,91 mmol *trans*-1-Chlor-3,7-dimethylocta-2,6-dien als Ausgangsreagenz – von MOHAMED NAGIA synthetisiert und unter gleichen Bedingungen aufgereinigt und gelagert.

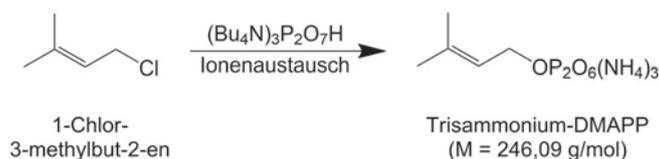


Abbildung 4.2 Reaktionsschema der Synthese von Dimethylallyldiphosphat

4.2.2. Synthese von Phlorisobutyrophenon

Das Acylphloroglucin-Derivat Phlorisobutyrophenon (PIBP, 2-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-propan-1-on) wurde in Anlehnung an die Methode von VAN KLINK *et al.*^[227] mittels einer Friedel-Crafts-Acylierung synthetisiert. Für den wasserfreien Reaktionsablauf wurden in einen über Nacht hitzegetrockneten 250 ml-Dreihalskolben mit Rührfisch 25 mmol trockenes Phloroglucin und 6,67 g trockenes AlCl_3 gefüllt und der Kolben luftdicht verschlossen. Unter Rühren im Eisbad wurde der Kolben mit Argon als Schutzgas geflutet, um eventuelle Restfeuchte aus der Luft zu vertreiben, und für das weitere Vorgehen dauerhaft unter Argon-Atmosphäre gehalten. Mit Hilfe einer Kanüle wurden 25 ml POCl_3 und anschließend, zum Starten der Reaktion, äquimolar zum Phloroglucin 2-Methylpropionsäure durch das Septum in den Kolben gegeben. Die Reaktionsmischung rührte zuerst bei 0°C für 8 h und danach bei 4°C für weitere 40 h. Die In-Prozess-Kontrolle des Reaktionsfortschritts erfolgte nach frei gewählten Zeitabständen durch Abnahme von je zwei Tropfen des Ansatzes, die mit 1 ml dH_2O und 0,2 ml Dichlormethan gemischt wurden, wonach die resultierende Dichlormethan-Phase für eine Übersichts-DC abgenommen wurde. Unter Verwendung von Kieselgel-DC-Fertigplatten (siehe 3.1) als stationäre Phase, einem Gemisch aus Dichlormethan und Petrolether (1:1,

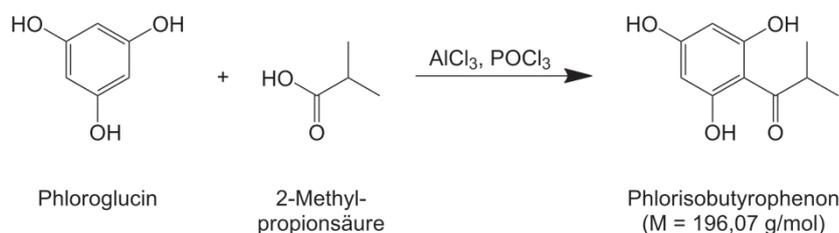


Abbildung 4.3 Reaktionsschema der Synthese von PIBP

V/V) als mobile Phase sowie Phloroglucin und PIBP (aus einer früheren Synthese) als Referenzsubstanzen wurden die Proben aufgetrennt und unter UV₂₅₄ detektiert.

Die Reaktion wurde durch Übergießen des Reaktionsansatzes über 100 g zerstoßenes Eis gestoppt und der Kolben mit Eiswasser und einer Portion Dichlormethan nachgespült. Mit Dichlormethan (1/3 Volumen der wässrigen Phase) wurde das Reaktionsgemisch 4 x extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter NaHCO₃-Lösung (96 g/l) gewaschen (2 x 200 ml, 1 x 100 ml) und über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet. Anschließend wurde die filtrierte Lösung am VRV bei 40 °C und 800 mbar auf ca. 3 ml eingengt und auf einer Kieselgel-Säule (Kieselgel 60, 0,04–0,063 mm) aufgereinigt. Nach 50 ml Vorlauf wurden mit Dichlormethan und Petrolether (1:1, V/V) als mobile Phase 50 Fraktionen zu je 10 ml Eluat gesammelt und anschließend mit Dichlormethan und Methanol (10:1, V/V) als Fließmittel die gleiche Menge an Fraktionen erneut aufgefangen. Die Kontrolle der einzelnen Fraktionen auf PIBP erfolgte mittels DC unter Verwendung von Kieselgel-DC-Fertigplatten als stationäre Phase und u.a. einem Gemisch aus Petrolether und Ethylacetat (7:3, V/V) als Fließmittel, wobei geeignete Zusammensetzungen empirisch ermittelt wurden (Tabelle 4.1). Die Detektion von PIBP erfolgte bei UV₂₅₄. PIBP enthaltende Fraktionen wurden vereint und am VRV bis zur Trockne eingengt. Die Identität des gereinigten Syntheseproduktes wurde anschließend in methanolischer Lösung durch HPLC (siehe 4.7) und MS (siehe 4.8) bestätigt, das PIBP in Methanol zu einer 10 mM Lösung aufgenommen und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Tabelle 4.1 Getestete DC-Fließmittel zur Untersuchung und Identifizierung von PIBP

1.	Dichlormethan	1 T	:	1 T	Petrolether
2.	Dichlormethan	7 T	:	3 T	Petrolether
3.	Cyclohexan	5 T	:	1 T	Ethylacetat
4.	Dichlormethan	1 T	:	1 T	Ethylacetat
5.	Dichlormethan	4 T	:	1 T	Ethylacetat
6.	Dichlormethan	7 T	:	3 T	Ethylacetat
7.	Dichlormethan	10 T	:	1 T	Methanol
8.	Petrolether	1 T	:	1 T	Ethylacetat
9.	Petrolether	7 T	:	3 T	Ethylacetat

4.2.3. Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon

Das Substrat 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon (1,3,6,7-THX, 1,3,6,7-Tetrahydroxy-9H-xanthen-9-on) wurde in einer Zwei-Schritt-Synthese zu einem Teil synthetisch und zum anderen Teil biotechnologisch hergestellt. In einem ersten Schritt wurde die Zwischenstufe 1,3,7-Trihydroxyxanthon (1,3,7-THX, 1,3,7-Trihydroxy-9H-xanthen-9-on) nach Vorschrift von GENOUX-BASTIDE *et al.*^[228] synthetisiert. Für den wasserfreien Reaktionsablauf wurden in einem über Nacht hitzegetrockneten 100 ml-Rundkolben mit Rührfisch 1,98 g P₂O₅ in 25 ml Methansulfonsäure suspendiert, der Kolben luftdicht mit einem Silikon-Septum verschlossen und die Mischung in einem Silikonölbad bei 85 °C gerührt, bis das P₂O₅ komplett gelöst war. Anschließend wurden



dem Ansatz 3,25 mmol Phloroglucin und 3,25 mmol 2,5-Dihydroxybenzoesäure hinzugefügt und die Reaktion bei 85 °C für mindestens 1 h weitergerührt. Die In-Prozess-Kontrolle auf eine vollständig abgelaufene Reaktion erfolgte nach 1 h durch Abnahme von zwei Tropfen des Ansatzes, die mit 1 ml dH₂O und 0,2 ml Ethylacetat gemischt wurden, wonach die resultierende Ethylacetat-Phase für eine Übersichts-DC abgenommen wurde. Unter Verwendung von Kieselgel-DC-Fertigplatten (siehe 3.1) als stationäre Phase, einem Gemisch aus Petrolether und Ethylacetat (7:3, V/V) als mobile Phase sowie Phloroglucin, 2,5-Dihydroxybenzoesäure und 1,3,7-THX (aus einer früheren Synthese) als Referenzsubstanzen wurden die Proben aufgetrennt und bei UV₂₅₄ detektiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde tropfenweise dH₂O zum Ansatz pipetiert, bis dieser nicht mehr sprudelte. Unter Nachspülen des Kolbens wurde das Reaktionsgemisch 3 x mit Ethylacetat extrahiert, die vereinigten organischen Phasen über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und die filtrierte Lösung am VRV bei 40 °C und 240 mbar auf ca. 3 ml eingengt. Die Aufreinigung von 1,3,7-THX erfolgte auf einer Kieselgel-Säule (Kieselgel 60, 0,04–0,063 mm), wobei die Zusammensetzung der mobilen Phase aufgrund einer verwendeten Gradienten-Elution wechselte – von einem anfänglichen Gemisch von Petrolether und Ethylacetat im Verhältnis 4:1 (V/V) bis zum Verhältnis 7:3 (V/V). Nach 50 ml Vorlauf wurden 20 Fraktionen zu je 50 ml Eluat gesammelt und nach dem Wechsel des Elutionsmittels nochmal 130 Fraktionen zu je 15 ml. Die Kontrolle der einzelnen Fraktionen auf 1,3,7-THX erfolgte mittels DC unter Verwendung von Kieselgel-DC-Fertigplatten als stationäre Phase und einem Fließmittelgemisch aus Petrolether und Ethylacetat (7:3, V/V). Die Detektion von 1,3,7-THX erfolgte bei UV₂₅₄. Alle 1,3,7-THX enthaltenden Fraktionen wurden vereint, am VRV eingengt, das Produkt mittels Lyophilisierung vollständig getrocknet und in methanolischer Lösung massenspektrometrisch analysiert (siehe 4.8).

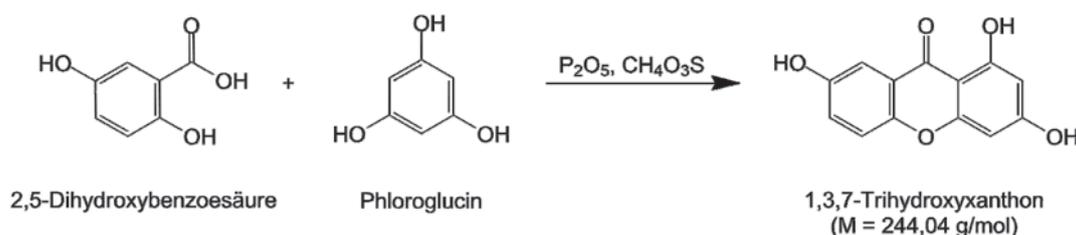


Abbildung 4.4 Reaktionsschema der Synthese von 1,3,7-Trihydroxyxanthon

Der zweite Syntheseschritt umfasste eine enzymatische Umwandlung von 1,3,7-THX in 1,3,6,7-THX durch die Xanthon 6-Hydroxylase-Aktivität einer Cytochrom P450-Monooxygenase aus unserer AG^[229]. Eine Hefesuspension (200 ml) eines gentechnisch modifizierten *S. cerevisiae*-Stammes (fähig zur Expression der Xanthon 6-Hydroxylase) in YPGE-Medium (siehe 3.7; OD₆₀₀ = 1,5–2,0) wurde mit 22,5 ml Galactose-Lösung (200 g/l) induziert (siehe 4.4.1.2), zeitgleich mit 10 mg 1,3,7-THX versetzt und bei 30 °C und 250 min⁻¹ für 24 h inkubiert. Die Zellen wurden vom Medium abgetrennt und der Überstand mit Ethylacetat (3 x 200 ml) extrahiert. Anschließend wurden die vereinigten organischen Phasen über wasserfreiem Na₂SO₄ getrocknet und die filtrierte Lösung am VRV bei 40 °C und 240 mbar auf ca. 3 ml eingengt. Die Aufreinigung erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel-DC-Fertigplatten (siehe 3.1; Nano-Sil C₁₈) mit Umkehrphase (*engl. reverse phase*, RP) und einer mobilen Phase aus dH₂O und Methanol (3:2, V/V). Die aufzureinigende Lösung wurde bandenförmig komplett auf mehrere DC-Platten aufgetragen und alle Chromatogramme wurden entwickelt. Nach Detektion bei UV₃₆₅ wurden diejenigen Banden, die 1,3,6,7-THX enthielten, samt RP-Kieselgel vom DC-Plattenträger abgekratzt, die stationären Phasen vereint und wiederholt mit mehreren Portionen zu je 20 ml Acetonitril unter Schütteln extrahiert. Die vereinten Lösemittel-Extrakte wurden im Kaltluftstrom zur Trockne gebracht und anschließend lyophilisiert. Das Syntheseprodukt 1,3,6,7-



THX wurde in Methanol zu einer 10 mM Lösung aufgenommen, die Identität durch HPLC (siehe 4.7) und MS (siehe 4.8) bestätigt und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

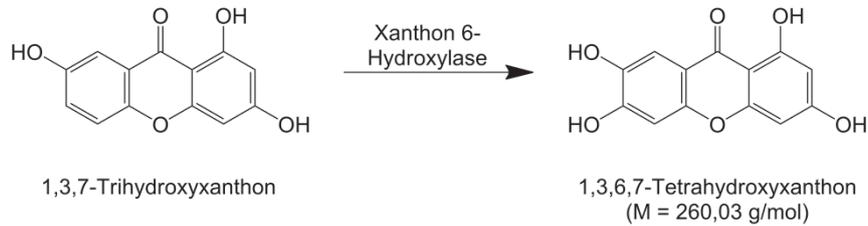


Abbildung 4.5 Reaktionsschema der enzymatischen C-6-Hydroxylierung von 1,3,7-Trihydroxyxanthon

4.3. Molekularbiologische Untersuchung von Prenyltransferase-Genen

4.3.1. Transkriptom-Analysen

Der Begriff Transkriptom beschreibt die Gesamtheit aller Gene, die in einem Zelltyp zu einem definierten Zeitpunkt von DNA in RNA transkribiert werden, d.h. das Transkriptom zeigt eine Momentaufnahme des zu einem bestimmten Zeitpunkt vorliegenden RNA-Pools eines Zelltyps. Alle Gene werden dabei erfasst, die kontinuierlich exprimiert oder zum Aufnahme-Zeitpunkt des Transkriptoms induziert exprimiert werden, wobei diejenigen Gene, die zum gewählten Zeitpunkt inaktiv sind, nicht als Teil des Transkriptoms auftauchen. Die Aktivität der Genexpression kann dabei einerseits gewebespezifisch analysiert werden, indem man eine differenzierte Analyse von einzelnen Geweben oder Zelltypen vornimmt. Andererseits ist es möglich die Expressionsstärke einzuordnen mit Hilfe des FPKM-Wertes (*engl. fragments per kilobase of transcript per million mapped reads*) als Maß des Expressionsgrades, der die Anzahl an gleichen bzw. isoformen Transkripten pro eine Million erfasster Transkripte angibt^[230].

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde sich die Information von vier verschiedenen Online-Transkriptomen (siehe 3.9) von *H. perforatum* zunutze gemacht – die Transkriptome des Medicinal Plant Genomics Resource (MPGR)^[231,232], des PhytoMetaSyn-Projektes^[233,234], des IPK Gatersleben (ViroBLAST; durch freundliche Unterstützung von DR. LOTHAR ALTSCHMIED und DR. TIMOTHY SHARBEL zur Verfügung gestellt) und des 1000-Pflanzen-Konsortiums (*engl. 1KP project*)^[235,236]. Diese vier Datenbanken wurden mittels BLAST-Analysen (*engl. basic local alignment search tool*)^[237] auf Fragmente oder Volllänge-cDNAs neuer AS-PT-Sequenzen untersucht.

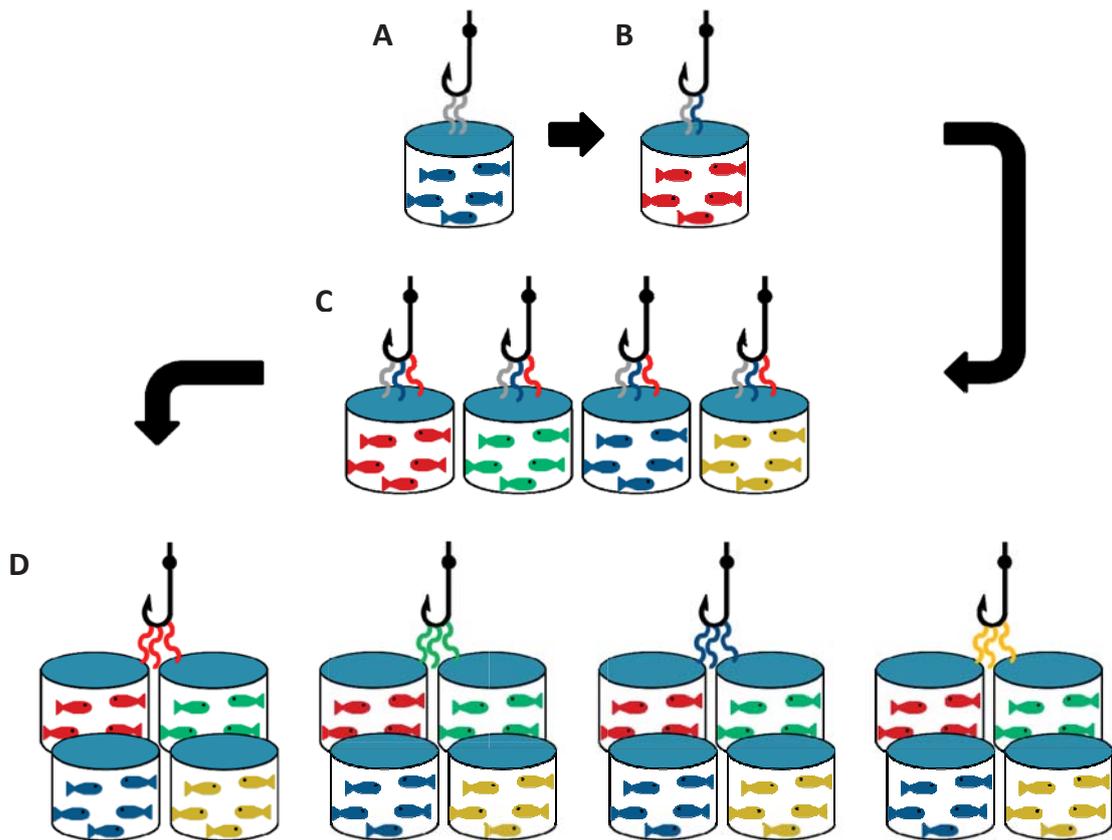


Abbildung 4.6 Übersicht der nacheinander geschalteten Schritte zum „Fischen“ von cDNA-Sequenzen in den Transkriptom-Analysen. **A:** BLAST-Suche mit bekannten Sequenzen in ViroBLAST (vorläufig). **B:** Suche mit bekannten Sequenzen und Hits aus A in MPGR. **C:** Suche mit bekannten Sequenzen und Hits aus A und B in allen vier Transkriptomen. **D:** Suche mit allen Hits aus A–C in allen vier Transkriptomen. Blau: ViroBLAST; grün: PhytoMetaSyn; orange: 1KP; rot: MPGR

Alle BLAST-Untersuchungen wurden mit den jeweils voreingestellten Standard-Einstellungen der jeweiligen Online-Suchwerkzeuge unter Verwendung unterschiedlicher BLAST-Modi (tblastx oder blastn) durchgeführt. In einer ersten Untersuchungsrunde wurden die erste klonierte Volllänge-cDNA („HpPT-1“) und die Sequenz des bedeutsamen Referenz-PT-Gens „HIPT-1“^[238] (siehe 5.2.3.1) als BLAST-Abfrage für Untersuchungen einer vorläufigen, unveröffentlichten Version des IPK Gatersleben-Transkriptoms eingesetzt. Dieselben beiden PT-Sequenzen plus die aussichtsreichsten Treffer aus Runde 1 dienten in einer späteren Analyserunde als Ausgangspunkt für eine Sequenzsuche innerhalb des MPGR-Transkriptoms, die wie von MÜLLER^[220] zuvor beschrieben angegangen wurde. Eine dritte, sehr ausführliche Analyserunde mit einer Verknüpfung der Sequenzinformationen aller vier Transkriptome startete zeitlich versetzt mit dem Referenz-Gen „HIPT-1“, zwischenzeitlich gewonnenen PT-Volllänge-cDNAs („HpPT-1–4“) sowie den Sequenzen „HcPT“, „HcPT-2“ und „HpPT-9“^[220] (siehe Tabelle 5.4) als Suchanfrage. Die genannten acht Sequenzen wurden in allen vier Datenbanken geblastet und anschließend alle PT-ähnlichen Sequenzen, die sich durch eine Mindestlänge von ≥ 300 Nukleobasen (≥ 50 Nukleobasen bei ViroBLAST) und $\geq 50\%$ Sequenz-Gleichheit zur Abfrage-Sequenz als vielversprechend erwiesen, in einen Sequenzkatalog aufgenommen. In einer nachgeschalteten Detail-Analyse wurde nun jeder Treffer erneut gegen das Transkriptom, dem er selbst entstammte, aber auch gegen die drei verbliebenen Transkriptome geblastet (für neue Treffer galt: ≥ 50 Nukleobasen Mindestlänge, $\geq 90\%$ Sequenzgleichheit) und anschließend alle übrigen Sequenzen in einer 1:1-Analyse mittels Alignment miteinander verglichen. Einerseits konnten so weitere PT-Fragmente – behandelt nach gleichen Auswahlkriterien wie zuvor – in den Sequenzkatalog mit aufgenommen werden. Andererseits wurden durch den exakten Sequenzvergleich mehrfach auftretende Sequenzen, die sich ausschließ-



lich aufgrund alternativer Längen oder abweichender Benennung (von Transkriptom zu Transkriptom verschiedene Sequenz-IDs) voneinander unterschieden, aus der Sequenzensammlung eliminiert und die Trefferliste ausgedünnt. Innerhalb dieses Sequenzkataloges wurden im Anschluss noch diejenigen cDNAs für weitere Klonierungsarbeiten herausgesucht, die hauptsächlich in Hyperforin-reichen Geweben^[132] auftauchten und dort hoch exprimiert waren – sofern denn Informationen über ihre Gewebeverteilung und Expression in Form von FPKM-Werten vorlagen. Dadurch sollte die Wahrscheinlichkeit erhöht werden, mögliche PTs mit Beteiligung an der Hyperforin-Biosynthese zu identifizieren.

Ausgewählte, extrahierte Sequenzen aus den Transkriptomen wurden zur Vervollständigung von PT-Genen als Matrize für die RACE-Klonierung (siehe 4.3.4.2; 4.3.5.4) eingesetzt. Volllänge-Sequenzen wurden in Expressionsvektoren integriert (siehe 4.3.7.4) und anschließend für nachfolgende Enzymaktivitätstests überexprimiert (siehe 4.4).

4.3.2. Extraktion von Gesamt-RNA

Die Isolierung von RNA aus Pflanzenmaterial wurde mit verschiedenen Verfahren durchgeführt, da nicht jede Methode universell geeignet war. Die Prinzipien der Isolierung beruhten auf dem Verfahren der Zwei-Phasen-Extraktion, bei der sich sowohl unterschiedliche Löslichkeiten von Biomolekülen und Zellbestandteilen zunutze gemacht wurden, als auch die selektive Fällung von RNA durch Alkoholzugabe oder hohe Salzkonzentrationen. Bei dem Einsatz kommerzieller Kits mit Extraktionssäulen (*engl.* spin column) konnte zusätzlich die spezifische Adsorption von ausgefallenen Nukleinsäuren an eine selektive Membran/Matrix (meist aus Kieselgel oder DEAE-Dextran, selten Glasfaserfilter) über polare bzw. ionische Molekül-Interaktionen genutzt werden. Alle angewendeten Extraktionsverfahren wurden mit besonderer Sorgfalt durchgeführt, um die wegen ihres einzelsträngigen Aufbaus sowie des ubiquitären Vorkommens von RNasen und oxidierenden Pflanzensekundärstoffen leicht zu degradierende RNA dennoch in ausreichend hoher Menge und Qualität zu gewinnen. Isolierte RNA wurde quantifiziert (siehe 4.3.3) und bei ausreichend hoher Qualität, die mittels Gelelektrophorese (siehe 4.3.6.2) kontrolliert wurde, direkt für die cDNA-Synthese (siehe 4.3.4) verwendet oder bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

4.3.2.1. RNA-Extraktion mit kommerziellen Kits

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Elicitor-behandelten Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* (siehe 4.1) wurde Qiagens RNeasy® Plant Mini Kit mit dem Protokoll für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe nach Herstellerangaben verwendet, z.T. ergänzt um einen DNase-Nukleinsäure-Verdau auf der Extraktionssäule zur Entfernung von störender, genomischer DNA. Zu analysierende Pflanzenteile von *H. perforatum* (siehe 3.5) wurden ebenfalls mit dem RNeasy® Plant Mini Kit oder mit Thermo Scientific GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit unter Berücksichtigung des Protokolls für polyphenolreiches Ausgangsmaterial nach Anweisungen des Herstellers untersucht.

4.3.2.2. RNA-Extraktion mit TRIzol®-Reagenz

Gesamt-RNA aus *H. perforatum* wurde, basierend auf der Methode von CHOMCZYNSKI & SACCHI^[239], durch Extraktion des Pflanzenmaterials mit dem Reagenz TRIzol®, einem Gemisch von Guanidiniumthiocyanat, Phenol und Chloroform, extrahiert. Während dieser Flüssigextraktionsmethode sammelten sich nach Zelllyse durch die chaotrope Eigenschaft des Guanidiniumthiocyanats denaturierte Proteine zusammen mit lipophilen Pflanzenbestandteilen in einer organischen Unterphase, DNA hielt sich in der aufliegenden Interphase und die gesuchte RNA fand sich mit weiteren hydrophilen Stoffen in der wässrigen Oberphase wieder. Nach Abtrennung dieser Oberphase wurde die darin gelöste RNA selektiv durch eine alkoholische Nukleinsäure-Fällung gewonnen und aufgereinigt.

In flüssigem Stickstoff wurden je ca. 100 mg tiefgefrorene Zellen von *H. calycinum* (siehe 4.1) oder Pflanzenmaterial von *H. perforatum* (siehe 3.5) zu einem feinen Pulver gemörsert, anschließend sofort mit 1 ml TRIzol®-Reagenz bei Raumtemperatur versetzt, durch manuelles Schütteln gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jeder Probe wurden danach 200 µl Chloroform gegeben und nach gründlichem Mischen mittels Vortexen bei Raumtemperatur für weitere 2:30 min inkubiert. Nach Abtrennung der Oberphase durch Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g für 15 min wurde das gleiche Volumen an Chloroform dazupipettiert und wie im vorigen Extraktionsschritt gemischt und zentrifugiert. Die abgetrennte wässrige Phase wurde mit 0,5 Volumenteilen 2-Propanol vorsichtig vermischt und 10 min bei Raumtemperatur ruhen gelassen. Während der Zentrifugation bei 4 °C und 10.000 x g für 10 min präzipitierte die RNA. Nach Abnahme des 2-Propanols wurde 2 x mit 500 µl Ethanol 75% (V/V) gewaschen und jeweils bei 4 °C und 7.500 x g für 5 min die RNA gefällt. Die RNA wurde nach Abnahme des Ethanols bei Raumtemperatur an der Luft getrocknet und in 40 µl RNase-freiem dH₂O aufgenommen.

4.3.2.3. RNA-Extraktion mittels Lithiumchlorid-Fällung

Zur RNA-Extraktion aus den besonders phenolreichen Pflanzengeweben von *H. perforatum*^[132], vornehmlich Knospen, Blüten und unreife Früchte, wurde auf Grundlage einer Methode von JAAKOLA *et al.*^[240] ein modifiziertes Protokoll entwickelt, wie KÜHLE^[219] und MÜLLER^[220] es ähnlich beschrieben. Nach Zellaufschluss und Homogenisieren in flüssigem Stickstoff wurden zehn Proben zu je ca. 100 mg Pflanzenmaterial mit jeweils 750 µl RNA-Extraktionspuffer (siehe 3.4) versetzt und bei 65 °C für 10 min inkubiert, was alle 2 min durch Homogenisieren mittels Vortexen kurz unterbrochen wurde. Dabei dienten CTAB als Detergens zur Abtrennung von Polysacchariden, EDTA als Komplexbildner, β-Mercaptoethanol als Antioxidans und PVP als Stabilisator und Adsorbens von Polyphenolen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde bei 4 °C und 10.000 x g für 10 min zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde abgenommen und 2 x nacheinander jeweils mit dem gleichen Volumen eines Gemisches von Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) gründlich gemischt und die Phasen bei 18.000 x g für 10 min wieder getrennt. Zur abgetrennten hydrophilen Oberphase wurden 0,25 Volumenteile 10 M Lithiumchlorid (LiCl)-Lösung pipettiert, und nach vorsichtigem Mischen durch Invertieren präzipitierte die RNA bei 4 °C für 16–20 h über Nacht. Die RNA wurde bei 4 °C und 18.000 x g für 20 min abgetrennt, anschließend 2 x nacheinander mit je 500 µl Ethanol 70% (V/V) gewaschen und in je 100 µl SSTE-Puffer (siehe 3.4) wieder aufgenommen. Nach Vereinigung von je fünf Proben folgten zwei weitere Extraktionen durch Zugabe von jeweils gleichem Volumen eines Gemisches von Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (125:24:1) sowie eines Gemisches von Chloroform und Isoamylalkohol (24:1) zum Entfernen eventueller Reste von DNA-Kontamination. Bei -20 °C für 2 h präzipitierte die RNA aus der wässrigen Oberphase und doppeltem Volumen reinen Ethanols und wurde bei 4 °C und 18.000 x g für 20 min pelletiert. Ein finaler Waschschrift der RNA mit je 500 µl eiskaltem Ethanol 70% (V/V) lieferte reine Gesamt-RNA, die nach Abnahme des Überstandes bei 37 °C für 30 min in einem Vakuumkonzentrator (siehe 3.1) trocknete und in 30–50 µl RNase-freiem dH₂O aufgenommen wurde.

4.3.3. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Gesamt-RNA und Plasmid-DNA wurde spektrophotometrisch bestimmt. In wässrigen Verdünnungen von 1:100 bzw. 1:50 wurde bei $\lambda = 260$ nm die Absorption der Nukleinsäure-Lösungen in einer Quarzküvette gemessen und mit Hilfe der jeweiligen Vergleichswerte (Tabelle 4.2) ihre Konzentration berechnet^[241]. Zusätzlich war es möglich – aufgrund der Absorptionsmaxima von DNA/RNA und Proteinen bei unterschiedlichen Wellenlängen – durch Bildung des Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} die Reinheit von Nukleinsäure-Lösungen zu ermitteln, wobei Werte zwischen 1,7–2,0 angestrebt wurden, welche eine qualitativ hochwertige und reine Nukleinsäure-Präparation indizierten.


Tabelle 4.2 Standard-Konzentrationen von Nucleinsäuren (für Absorption $A_{260} = 1,000$ und Schichtdicke $d = 1,000$ cm)

Konzentration	Nucleinsäure
50 µg/ml	doppelsträngige DNA (dsDNA)
33 µg/ml	einzelsträngige DNA (ssDNA)
20–30 µg/ml	Oligonucleotide
40 µg/ml	RNA

4.3.4. cDNA-Synthese durch reverse Transkription

4.3.4.1. Reverse Transkription

Um extrahierte Gesamt-RNA (siehe 4.3.2) für anschließende Klonierungen in dazu komplementäre cDNA umzuschreiben, wurde zur cDNA-Synthese eine RNA-abhängige DNA-Polymerase^[242] eingesetzt – eine sogenannte reverse Transkriptase (RT), die sich als mutierte Variante von einer natürlich vorkommenden RT aus dem murinen Leukämievirus (*engl. Moloney murine leukemia virus*, M-MuLV) ableitet. In der reversen Transkription wurde durch den Einsatz eines Oligo(dT)-Primers, der auf die polyadenylierte Sequenz am 3'-Ende jedes mRNA-Moleküls bindet, spezifisch die mRNA aus der Gesamt-RNA transkribiert und als Matrize für Vervielfältigungen und weitere Klonierungen gewonnen.

Für die cDNA-Synthese zur Suche neuer Prenyltransferase (PT)-Fragmente mittels degenerierter Primer (siehe 3.8) sowie zur Klonierung vollständiger PT-Gene wurden Thermo Scientifics RevertAid™ oder NEBs M-MuLV RT nach Anweisung der Hersteller angewendet. Reaktionsansätze mit RNA wurden wie unten angegeben (Tabelle 4.3) zusammenpipettiert, zur initialen Denaturierung von Sekundärstrukturen kurzzeitig erhitzt und nach kurzem Inkubieren auf Eis mit Mastermix (MM) versetzt. Die Reaktion wurde nach vollständigem Ablauf durch Hitzeinaktivierung der RT gestoppt. Die so gewonnene cDNA wurde direkt als Matrize für die PCR (siehe 4.3.5) herangezogen oder bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Tabelle 4.3 Standard-Protokoll zur reversen Transkription

RevertAid™ H Minus RT			M-MuLV RT		
Gesamt-RNA	5 µg		Gesamt-RNA	2 µg	
Oligo(dT)-Primer (10 µM)	1 µl		Oligo(dT)-Primer (10 µM)	2 µl	
dH ₂ O ad	12,5 µl		dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl	
			dH ₂ O ad	16 µl	
Protokoll:	↓ 65 °C für 5 min auf Eis für 2 min		Protokoll:	↓ 65 °C für 5 min auf Eis für 2 min	
MM:	5x Reaktionspuffer	4 µl	MM:	10x Reaktionspuffer	2 µl
	RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl		RNase-Inhibitor (40 U/µl)	1 µl
	dNTP-Mix (je 10 mM)	2 µl		M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl
	RevertAid RT (200 U/µl)	1 µl			
Protokoll:	↓ 42–50 °C für 60–90 min 70 °C für 10 min		Protokoll:	↓ 42–45 °C für 60–90 min 90 °C für 10 min	

4.3.4.2. Reverse Transkription für RACE-geeignete cDNA

Für die Identifizierung von unbekanntem 3'- und 5'-Enden von PT-Genen, d.h. für die beidseitige Verlängerung von unvollständigen cDNA-Fragmenten bis in den untranslatierten Bereich (3'-UTR/5'-UTR) fand Clontechs SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit^[243] Anwendung. Bei der reversen Transkription dieser

RACE-Anwendung (*engl.* rapid amplification of cDNA ends) wurde der cDNA-Strang während der Synthese gleichzeitig um eine bekannte Ankersequenz am 3'- oder 5'-Ende ergänzt, was in einer nachgeschalteten RACE-PCR das Amplifizieren unbekannter cDNA-Sequenzen zwischen bekanntem Mittelfragment und jeweiliger Ankersequenz erlaubte. Bei der 3'-RACE geschah dies wie unter 4.3.4.1 beschrieben unter Verwendung eines Oligo(dT)-Primers mit einer zusätzlichen, bekannten Sequenz an dessen 5'-Ende (3'-RACE CDS Primer A; siehe 3.8), welches nach Anlagern des Primers am komplementären Poly(A)-Schwanz der mRNA das 3'-Ende des neu entstehenden cDNA-Stranges markierte. Die reverse Transkription für die 5'-RACE erforderte neben einem genspezifischen oder einem Oligo(dT)-Primer (5'-RACE CDS Primer A; siehe 3.8) eine besondere RT mit eingebauter terminaler Transferase-Aktivität (SMARTScribe™ RT). Nach Ablesen und Erreichen des 5'-Endes der mRNA-Matrize addierte diese spezielle RT einige Nukleotide an das 3'-Ende des neu synthetisierten cDNA-Stranges, an das ein zusätzliches, zum terminalen Überhang komplementäres Oligonukleotid mit bekannter Ankersequenz (SMARTer II™ A Oligo; siehe 3.8) binden konnte. Die RT erkannte diesen einzelsträngigen Überhang, wechselte die Matrize (*engl.* SMART-RACE = switching mechanism at 5' end of RNA transcript) von mRNA auf den SMARTer II™ A Oligo und führte so den Anker in die RACE-fertige cDNA ein.

Das SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit wurde nach Herstellerangaben eingesetzt. Reaktionsansätze mit RNA wurden wie unten angegeben (Tabelle 4.4) zusammenpipettiert, zur initialen Denaturierung von Sekundärstrukturen kurzzeitig erhitzt und nach kurzem Inkubieren auf Eis mit MM versetzt. Die Reaktion wurde nach vollständigem Ablauf durch Hitzeinaktivierung der SMARTScribe™ RT gestoppt. Die so gewonnene cDNA wurde direkt als Matrize für die RACE-PCR (siehe 4.3.5.4) herangezogen oder bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert.

Tabelle 4.4 Standard-Protokoll zur reversen Transkription (3'-RACE-/5'-RACE)

3'-RACE-cDNA-Synthese			5'-RACE-cDNA-Synthese		
	Gesamt-RNA	3,75 µl		Gesamt-RNA	2,75 µl
	3'-CDS Primer A (10 µM)	1 µl		5'-CDS Primer A (10 µM)	1 µl
Protokoll:	↓ 72 °C für 3 min 42 °C für 2 min		Protokoll:	↓ 72 °C für 3 min 42 °C für 2 min	
MM:	5x Reaktionspuffer	2 µl	MM:	5x Reaktionspuffer	2 µl
	DTT (20 mM)	1 µl		DTT (20 mM)	1 µl
	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl		dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
	RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl		SMARTer II™ A Oligo (12 µM)	1 µl
	SMARTScribe™ RT (100 U/µl)	1 µl		RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,25 µl
				SMARTScribe™ RT (100 U/µl)	1 µl
Protokoll:	↓ 42 °C für 90 min 70 °C für 10 min		Protokoll:	↓ 42 °C für 90 min 70 °C für 10 min	

4.3.5. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (*engl.* polymerase chain reaction, PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur exponentiellen *in vitro*-Vervielfältigung von DNA-Abschnitten^[244]. In Wiederholungen von drei jeweils nacheinander geschalteten Einzelschritten wird die Menge an ursprünglicher Ausgangs-DNA (sog. Matrize, Template oder Amplicon) von Zyklus zu Zyklus verdoppelt. Im ersten dieser Schritte werden die komplementären Einzelstränge der Matrize, die aus cDNA, genomischer DNA oder Plasmid-DNA bestehen kann, durch Hitze voneinander getrennt. Als Zweites lagern sich kurze DNA-Fragmente (sog. Oligonukleotide oder Primer), die Amplicon-spezifisch und komplementär zu einem bekannten Bereich der Matrizen-



Stränge gewählt werden, bei reduzierter Temperatur (*engl.* annealing temperature, T_A) an das Amplicon an. Der dritte Schritt umfasst die Elongation der Oligonukleotid-Kette: Beim jeweiligen Temperatur-Optimum bindet eine DNA-abhängige, thermostabile DNA-Polymerase an den gebundenen Primer und knüpft an das freie 3'-Ende des Einzelstranges schrittweise neue Desoxynukleotide, bis ein neuer, komplementärer Gegenstrang zur Matrize entstanden ist. Dieser dreigeteilte Amplifizierungsschritt kann sich innerhalb einer einzigen PCR bei ausreichender Bereitstellung aller benötigten Synthese-Komponenten bis zu 50 x wiederholen und somit in kurzer Zeit große Mengen an DNA generieren.

4.3.5.1. Standard-PCR

Verschiedene PCR-Anwendungen unterschieden sich durch die eingesetzten Temperatur-Programme, Additiva und v.a. durch die verwendeten DNA-Polymerasen. Jeder PCR-Ansatz enthielt neben dem Template ein Oligonukleotid-Paar (1 x vorwärts, 1 x rückwärts gerichtet – diese legten den Ablesestart auf den beiden Template-Einzelsträngen spezifisch fest und begrenzten somit den zu amplifizierenden Bereich zwischen sich). Darüber hinaus beinhaltete er noch dNTPs als Synthese-Bausteine und einen Mg^{2+} -haltigen Puffer, der für optimale Umgebung und Aktivität des verwendeten Enzyms sorgte. In Standard-PCRs fand NEBs OneTaq® oder PeqLabs peqGOLD Taq DNA-Polymerase Anwendung (siehe 3.2), eine rekombinante Version der aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnenen, hitzebeständigen Taq-Polymerase. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C wurden Taq-Polymerase und dNTPs im MM zu jedem Ansatz pipettiert. Es folgten mehrere Zyklen, in denen die DNA jeweils kurz denaturiert, dann die Primer bei ihrer jeweiligen T_A (für Taq-Polymerase ca. 5 °C unterhalb ihrer Schmelztemperatur T_M) angelagert und die DNA bei 72 °C vermehrt wurden.

Eine Besonderheit der Taq-Polymerase besteht darin, dass sie nach beendetem Ablesen des Matrizenstranges an den von ihr neu synthetisierten DNA-Gegenstrang ein zusätzliches Molekül Desoxyadenosin an das 3'-Ende anknüpft. Mit diesem sogenannten A-Überhang kann das erhaltene PCR-Produkt direkt für eine Ligation in einen T-Überhangvektor eingesetzt werden (siehe 4.3.7.4).

Tabelle 4.5 Standard-Protokoll für die PCR mit Taq-Polymerase

	Matrizen-DNA	0,5–2 µl
	for-Primer (10 µM)	1 µl
	rev-Primer (10 µM)	1 µl
	dH ₂ O ad	15 µl
Protokoll:	↓ 95 °C für 3 min	
MM:	10x Reaktionspuffer	2,5 µl
	dNTP-Mix (je 10 mM)	1 µl
	Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25 µl
	dH ₂ O ad	10 µl
Protokoll:	↓ 95 °C für 30–45 s	} 30 x
	T_M -5 °C für 30–45 s	
	72 °C für 1:30–2:30 min	
	72 °C für 8:30 min	

4.3.5.2. Proofread-PCR

Ein Nachteil der Taq-Polymerase bestand darin, dass sie bei der Gegenstrang-Synthese zufälligerweise fehlerhaft eingebaute dNTPs, welche nicht dem Bindungspartner auf dem Matrizen-Strang entsprechen, nicht erkennen und ausbessern kann, was zu Mutationen in der Sequenz des PCR-Produktes führt. Für Klo-

nierungen, bei denen es auf höchste Genauigkeit in der PCR ankam (z.B. Vervielfältigung von Expressionsgenen), wurde daher mit Finnzymes' Phusion® Hot Start II High-Fidelity oder NEBs Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase gearbeitet. Diese Enzyme besitzen mit ihrer 3'→5'-Exonuklease-Aktivität eine zusätzliche Korrektur-Funktion (*engl.* proof reading), mit der es möglich ist unpassende dNTPs direkt während der PCR zu identifizieren, automatisch auszutauschen und somit die Anzahl an ungewollten Mutationen im PCR-Produkt sehr gering zu halten (50–100 x geringer als bei *Taq*-Polymerase laut Herstellerinformation). Die doppelt so hohe Synthese-Geschwindigkeit und erhöhte Stabilität bei hohen Temperaturen sind weitere Vorteile, welche die PCR-Produkt-Qualität verbessern und das PCR-Protokoll erheblich verkürzten.

Tabelle 4.6 Standard-Protokoll für die PCR mit Proofread-DNA-Polymerasen (Pipettier-Reihenfolge beachten!)

Phusion® Hot Start II			Q5® (Hot Start)				
	dH ₂ O ad	20 µl		dH ₂ O ad	25 µl		
	5x Reaktionspuffer	4 µl		5x Reaktionspuffer	5 µl		
	dNTP-Mix (je 10 mM)	0,4 µl		dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5 µl		
	for-Primer (10 µM)	1 µl		for-Primer (10 µM)	1,25 µl		
	rev-Primer (10 µM)	1 µl		rev-Primer (10 µM)	1,25 µl		
	Matrizen-DNA	1–2 µl		Matrizen-DNA	1–2 µl		
	DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl		DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,25 µl		
Protokoll:	↓ 98 °C für 30 s 98 °C für 10 s T _M +3 °C für 10–30 s 72 °C für 1–1:30 min 72 °C für 10 min		35 x	Protokoll:	↓ 98 °C für 30 s 98 °C für 10 s T _M +3 °C für 10–30 s 72 °C für 1–1:30 min 72 °C für 2 min		35 x

4.3.5.3. Touchdown-PCR

Für das Vermehren von DNA-Sequenzen mit nicht ausreichend spezifisch bindenden oder degenerierten Oligonukleotiden wurde mit einem speziellen Temperatur-Programm gearbeitet, um die Menge an gewünschtem PCR-Produkt im Vergleich zu ungewollten DNA-Replikaten aus dem Ansatz zu erhöhen. Dazu wurde für den ersten Synthese-Zyklus eine T_A gewählt, die 5 °C oberhalb der empfohlenen T_A lag und somit den Primern nur ein teilweises, dafür äußerst spezifisches Binden ermöglichte. In den nächsten neun Zyklen wurde dann die T_A um jeweils 0,5 °C herabgesetzt, so dass die Primer sich immer unspezifischer anlagern konnten. Durch die ersten PCR-Zyklen war die Anzahl an spezifischen DNA-Sequenzen, die als Template für die 25 unveränderten Folgezyklen dienten, bereits groß genug, um eine übermäßige Synthese unspezifischer DNA-Replikate zu unterbinden. Die *Touchdown*-PCR kam sowohl in Standard- als auch Proofread-PCR-Anwendungen zum Einsatz.

Tabelle 4.7 Temperatur-Programm für die *Touchdown*-PCR

<i>Touchdown</i> -Standard-PCR	<i>Touchdown</i> -Proofread-PCR
Protokoll: ↓ 95 °C für 3 min 95 °C für 30 s T _A +5 °C – 0,5 °C/Zyklus für 30 s 72 °C für 2 min 95 °C für 30 s T _A für 30 s 72 °C für 2 min 72 °C für 8:30 min	Protokoll: ↓ 98 °C für 30 s 98 °C für 10 s T _A +5 °C – 0,5 °C/Zyklus für 20 s 72 °C für 1:30 min 98 °C für 10 s T _A für 20 s 72 °C für 1:30 min 72 °C für 10 min
} 10 x	} 10 x
} 25 x	} 25 x

4.3.5.4. Verlängerung von cDNA-Fragmenten: RACE-PCR

cDNA-Sequenzen, denen das 3'-Ende und/oder das 5'-Ende fehlte, konnten mit Hilfe der RACE-Technik^[245] zum Erhalt der Volllänge-cDNA verlängert werden. Während der reversen Transkription wurde jeweils eine bekannte Ankersequenz hinter das unbekannte Ende des synthetisierten cDNA-Stranges fusioniert (siehe 4.3.4.2). Auf diese künstlichen cDNA-Enden konnten spezielle RACE-Primer binden, die sich spezifisch an diesen Ankersequenzen anlagerten. In Kombination mit einem genspezifischen Primer (GSP), abgeleitet von einem bekannten Sequenzstück der untersuchten Matrizen-cDNA, war es somit möglich in einer PCR den zwischen GSP und RACE-Primer liegenden, unbekanntem Sequenzabschnitt abzulesen, in einen Klonierungsvektor zu ligieren und nach Vermehrung die Sequenzinformation durch DNA-Sequenzierung zu erhalten. In der Praxis wurde in getrennten PCRs das cDNA-Template entweder in Richtung des 3'- oder des 5'-Endes (3'-RACE-PCR/5'-RACE-PCR) amplifiziert. Dabei verlängerte der in einer ersten PCR eingesetzte RACE long-Primer (siehe 3.8) die Ankersequenz bei der DNA-Synthese mit einem GSP. Dieses PCR-Produkt diente als Matrize für eine zweite RACE-PCR, bei welcher der Primer RACE short (komplementär zur verlängerten Ankersequenz von RACE long; siehe 3.8) mit einem GSP kombiniert wurde, der näher innerhalb der bekannten cDNA-Sequenz aus der ersten PCR (*downstream* des ersten Primers) am jeweiligen gesuchten Ende lag. Auf diese Weise wurde sowohl die Ausbeute als auch die Spezifität von RACE-PCR-Produkten stark erhöht. Die RACE-Technik wurde gleichwohl mit Standard-, Proofread- und *Touchdown*-PCR-Anwendungen kombiniert, um die fehlenden cDNA-Enden zu identifizieren.

4.3.6. Agarose-Gelelektrophorese

4.3.6.1. DNA-Gelelektrophorese

DNA-Moleküle konnten mit der Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und darauf folgend analysiert und aufgereinigt werden. Durch Aufkochen von Agarose (10 g/l) in TAE-Puffer (siehe 3.4) wurde die flüssige Gelmatrix erzeugt, der nach Abkühlen auf ca. 50 °C der DNA-markierende Farbstoff Miodori Green zugesetzt wurde. Diese Lösung wurde zum Aushärten zu einem Agarose-Trenngel (siehe 3.4) auf einen Gelschlitten mit Probentaschenkamm gegossen. Zu untersuchende Proben wurden mit 1/3 Volumen 6x DNA-Ladepuffer (siehe 3.4) gemischt und das Agarose-Trenngel in einer mit TAE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer (siehe 3.1) mit ihnen beladen. Als Größenstandard zur Bestimmung der Länge von DNA-Fragmenten wurde Thermo Scientifics GeneRuler DNA Ladder Mix mit auf das Gel geladen. Im elektrischen Feld bei 120–150 V und 400 mA erfolgte für 30–45 min die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Moleküle, die aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste größenabhängig in Richtung Anode wanderten. Dokumentiert wurden die durch den interkalierenden Farbstoff fluoreszierenden DNA-Banden entweder mit einem UV-Transilluminator bei UV₃₆₅ oder einem LED-Transilluminator (siehe 3.1).

4.3.6.2. RNA-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle, ob extrahierte RNA intakt und nicht während der Aufreinigung degradiert war, wurde eine RNA-Probe wie unter 4.3.6.1 mit 6x DNA-Ladepuffer versetzt und 40 Einheiten eines RNase-Inhibitors (siehe 3.2) addiert. Nach elektrophoretischer Trennung auf einem Agarose-Trenngel wurde wie bei den DNA-Proben detektiert und das Ergebnis dokumentiert.

4.3.6.3. Isolierung von DNA aus Agarose-Trenngelen

Die Banden von DNA-Fragmenten, die in Agarose-Trenngelen detektiert und für weitere Klonierungsanwendungen benötigt wurden, konnten mittels Ausschneiden/Ausstanzen aus dem Gel wiedergewonnen und anschließend aus der Matrix aufgereinigt werden. Dazu diente Analytik Jenas innuPREP DOUBLEpure Kit, das in Verbindung mit dem Herstellerprotokoll zur DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen Anwendung fand. Nach Auflösen der zu extrahierenden Gelbanden unter Wärmeeinwirkung wurden DNA-Moleküle in einem Ethanol-haltigen Puffer gefällt (vgl. 4.3.2) und an einer Kieselgel-Membran adsorbiert, mit Ethanol-haltiger Waschlösung gereinigt und letztlich in einem alkoholfreien Puffer von der Membran eluiert.

4.3.7. Ligations-Vorbereitungen und Ligation von DNA

4.3.7.1. T/A-Klonierung

Vor der Ligation in einen T-Überhangvektor (siehe 4.3.7.4) mussten an diejenigen PCR-Produkte, die von einer DNA-Polymerase ohne eigene Fähigkeit der Generierung von A-Überhängen gewonnen wurden (siehe 4.3.5.2), die überzähligen 3'-Desoxyadenosine noch extra angefügt werden – durch einen zusätzlichen Inkubationsschritt mit *Taq*-Polymerase in Anwesenheit von dATP^[246].

Tabelle 4.8 Protokoll zum Erzeugen von A-Überhängen am DNA-3'-Ende zur T/A-Klonierung

10x Reaktionspuffer (mit MgCl ₂)	1 µl
Aufgereinigte DNA	7,5 µl
dATP (2 mM)	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,5 µl
Protokoll:	↓ 72 °C für 15–30 min

4.3.7.2. Enzymatischer Restriktionsverdau von DNA

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (REs) vom Typ II lässt sich doppelsträngige DNA (dsDNA) innerhalb einer spezifischen, palindromischen Erkennungssequenz, die aus einer für jedes Restriktionsenzym individuellen Nukleotid-Abfolge besteht, gezielt schneiden. Mit dieser molekularbiologischen Technik war es einerseits möglich Plasmide nach deren Isolierung auf DNA-Inserts zu kontrollieren (siehe 4.3.10). Andererseits konnten zur Vorbereitung von Ligationen sowohl DNA-Fragmente, die mit Expressions-Oligonukleotiden vervielfältigt wurden, verdaut als auch die dazugehörigen Expressions-Plasmide zum zielgerichteten Einbau der Inserte linearisiert werden. Alle Restriktionsenzyme (siehe 3.2) wurden nach Vorgaben der jeweiligen Hersteller angewendet und, sofern eine Kombination aus zwei Restriktionsenzymen indiziert war, nach den empfohlenen Reaktionsbedingungen von Thermo Scientifics DoubleDigest Calculator (siehe 3.9) eingesetzt. Nach dem Restriktionsverdau wurden die Endonukleasen durch Hitzeinkubation inaktiviert oder mit Analytik Jenas innuPREP DOUBLEpure Kit, das in Verbindung mit dem Herstellerprotokoll zur PCR-Produkt-Aufreinigung Anwendung fand, aus den Ansätzen entfernt. Die DNA-Lösungen wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.3.6.1) untersucht oder zur nachfolgenden Ligation verwendet.



Tabelle 4.9 Protokolle zum Restriktionsverdau von DNA

Einzel-Plasmidverdau		Doppel-Plasmidverdau	
10x Reaktionspuffer	2 µl	10x Reaktionspuffer	2–4 µl
Plasmid-DNA	2 µl	Plasmid-DNA	2 µl
Restriktionsenzym (10 U/µl)	0,5 µl	Restriktionsenzym 1 (10 U/µl)	0,5 µl
dH ₂ O ad	20 µl	Restriktionsenzym 2 (10 U/µl)	0,5–2 µl
		dH ₂ O ad	20 µl
Protokoll:	↓ 37 °C für 1–16 h 65–80 °C für 20 min	Protokoll:	↓ 37 °C für 60 min 80 °C für 20 min

Doppel-Plasmidverdau zur Ligation		Doppel-Insertverdau zur Ligation	
10x Reaktionspuffer	2–4 µl	10x Reaktionspuffer	1–2 µl
Restriktionsenzym 1 (10 U/µl)	0,5 µl	Restriktionsenzym 1 (10 U/µl)	0,5 µl
Restriktionsenzym 2 (10 U/µl)	0,5–2 µl	Restriktionsenzym 2 (10 U/µl)	0,5–2 µl
Aufgereinigte Plasmid-DNA ad	20 µl	Aufgereinigte Plasmid-DNA ad	10 µl
Protokoll:	↓ 37 °C für 60 min 80 °C für 20 min	Protokoll:	↓ 37 °C für 60 min 80 °C für 20 min

4.3.7.3. Dephosphorylierung von DNA

Die Effizienz einer Ligation konnte durch eine Behandlung des linearisierten Vektors mit Thermo Scientifics Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) oder FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (FastAP) erhöht werden. Diese Phosphatasen entfernen Phosphatreste von freien 5'-Enden der Plasmid-DNA, so dass die beiden freien Plasmid-Enden nicht mit sich selbst, d.h. ohne ein phosphathaltiges Insert, religieren können und somit mehr Plasmid-DNA für die Ligation zur Verfügung steht.

Tabelle 4.10 Protokoll zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA

SAP		FastAP	
10x Reaktionspuffer	2 µl	10x Reaktionspuffer	2 µl
dH ₂ O	11 µl	dH ₂ O	13 µl
Linearisierte Vektor-DNA	5 µl	Linearisierte Vektor-DNA	4 µl
SAP (1 U/µl)	2 µl	FastAP (1 U/µl)	1 µl
Protokoll:	↓ 37 °C für 30 min 65 °C für 15 min	Protokoll:	↓ 37 °C für 10 min 75 °C für 5 min

4.3.7.4. Ligation von DNA

Frei vorliegende DNA-Enden können enzymatisch unter Verbrauch von ATP miteinander verknüpft werden, indem die Hydroxylgruppe am 3'-Ende eines DNA-Stranges mit der Phosphatgruppe am 5'-Ende eines anderen DNA-Stranges durch DNA-Ligasen kovalent gebunden werden. Mit diesem molekularbiologischen Werkzeug ist es möglich DNA-Fragmente in linearisierte Klonierungs- oder Expressionsvektoren stabil einzubringen und diese Plasmide gleichzeitig wieder zu cyclisieren. Dabei unterscheidet man zwischen der Ligation von DNA mit glatten Enden (*engl.* blunt ends) oder klebrigen Enden (*engl.* sticky ends), wobei nur letztere in dieser Arbeit Anwendung fand.

Tabelle 4.11 Pipettierschema und Protokoll zur DNA-Ligation

Standard-Ligation		Mini-Ligation	
10x Reaktionspuffer	1 µl	2x Reaktionspuffer	2,5 µl
Linearisierte Vektor-DNA	1–2,5 µl	Linearisierte Vektor-DNA	0,125 µl
Vorbehandelte Insert-DNA	5–7,5 µl	Vorbehandelte Insert-DNA	1,5 µl
T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	0,25–0,5 µl	T4 DNA-Ligase (5 U/µl)	0,5 µl
dH ₂ O ad	10 µl	dH ₂ O ad	5 µl
PEG-4.000, 50% (m/V)	1 µl		
Protokoll:	↓ 22 °C für 60 min <i>oder</i> 4 °C für 18 h über Nacht 65 °C für 10 min	Protokoll:	↓ 22 °C für 30 min 4 °C für 16 h über Nacht 65 °C für 10 min

Zur Klonierung und anschließenden Sequenzierung von PT-Fragmenten und PT-Genen wurde mit Promega T-Überhangvektor pGEM®-T easy gearbeitet. Dieses linearisierte Plasmid besitzt an den 3'-Enden seiner beiden komplementären DNA-Einzelstränge jeweils ein überzähliges Desoxythymidin, wodurch es möglich ist aufgereinigte PCR-Produkte, die durch *Taq*-Polymerase gewonnen wurden (siehe 4.3.5.1), direkt und ohne vorgegebene Insertionsrichtung in den Polylinker (*engl. multiple cloning site*, MCS) des Vektors zu ligieren. Da diese MCS mitten innerhalb des *lacZ*-Gens (unter Kontrolle der flankierenden T7- und SP6-RNA-Polymerasepromotoren) auf dem Plasmid liegt, wird bei Ligation von Fremd-DNA in den Polylinker der ORF (*engl. open reading frame*, offener Leserahmen) dieses Gens unterbrochen und die Fähigkeit zur Bildung des codierten Enzyms β -Galactosidase geht verloren. Dieses Enzym kann auf Select-LB-Agarplatten (Tabelle 4.12) nach Induktion durch IPTG das Substrat X-Gal zu einem blauen, wasserunlöslichen Farbstoff verstoffwechseln. Die positive Transformation und Ligation von *E. coli*-Zellen (siehe 3.6) mit pGEM-T® easy, das als weiteren Selektionsmarker ein Ampicillin-Resistenzgen trägt, kann demnach mittels Blau-Weiß-Selektion durch Wachstum auf Ampicillin-haltigem Medium in weißen Bakterienkolonien detektiert werden^[247].

In den Vektor pESC-URA – ausgestattet mit zwei Polylinkern (MCS 1 und MCS 2) zum gerichteten Einführen von restriktionsverdauter Fremd-DNA – wurden PT-Gene für Expressionsuntersuchungen in Hefezellen kloniert. Dank eines Ampicillin-Resistenzgens und des Replikationsursprungs pUC ori auf dem Plasmid konnten die Konstrukte in *E. coli*-Zellen auf Ampicillin-haltigem Selektionsmedium vermehrt und aufgereinigt werden. Nach anschließender Plasmid-Transformation in *S. cerevisiae*-Zellen wurden diese Konstrukte von dem vektorständigen 2µ ori ausgehend repliziert. Als Selektionsmarker zur Kontrolle der erfolgreichen Plasmid-Aufnahme in Hefezellen brachte pESC-URA ein Uracil-Synthese-Gen mit, welches dem verwendeten Hefe-Stamm fehlte und nur Plasmid-tragenden Zellen das Wachstum auf SGI-Medium (siehe 3.7) ermöglichte. Die Proteinexpression wurde von den reprimierbaren GAL1- und GAL10-Promotoren reguliert^[248].

Für Untersuchungen in Insektenzellen wurden PT-Gene und das Gen für ein verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (*engl. enhanced green fluorescent protein*, eGFP) nach Restriktionsverdau in die Polylinker-Region – unter Kontrolle des AcMNPV-Polyhedrin-Promotors – des ebenfalls vorverdauten Transfervektors pFastBac™ 1 ligiert (nach Anweisungen von Invitrogens Bac-to-Bac® Baculovirus Expression Systems; siehe 3.3). Durch die Selektionsmarker Ampicillin- und Gentamicin-Resistenz sowie den Replikationsursprung pUC ori auf dem Plasmid war eine Selektion und Vermehrung transformierter *E. coli*-Zellen auf Antibiotika-haltigen Medien möglich. Nach Plasmid-Isolierung aus den Bakterien (siehe 4.3.10.1) und Kontrolle des Konstruktes durch DNA-Sequenzierung (siehe 4.3.11) wurden pFastBac™ 1-Konstrukte zur Anzucht von Baculoviren für die spätere Infektion von Insektenzellen herangezogen (siehe 4.4.2.2).



4.3.8. Transformation (Bakterien und Hefe)

4.3.8.1. Präparation chemisch kompetenter Bakterien

Um freie DNA aus dem umgebenden Medium aufnehmen zu können, wurden *E. coli* (DH5 α /NEB 5 α)-Zellen (siehe 3.6) mit der Calciumchlorid-Methode^[249] vorbehandelt und erlangten somit chemische Kompetenz. Eine einzelne Bakterien-Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium (siehe 3.7) überführt und bei 37 °C und 220 min⁻¹ über Nacht inkubiert. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde anschließend eine Hauptkultur von 50 ml LB-Medium angeimpft und solange weiter bei 37 °C und 220 min⁻¹ inkubiert, bis die optische Dichte der Suspension bei ca. OD₆₀₀ = 0,5 lag. Die Bakterienzellen wurden anschließend bei 8.000 min⁻¹ und 4 °C für 10 min vom Medium getrennt. Das Bakterienpellet wurde auf Eis in 50 ml einer eiskalten 50 mM CaCl₂-Lösung mittels Rührstab vorsichtig resuspendiert und unter gleichen Bedingungen wie zuvor zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das Pellet unter Einsatz von 20 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung wieder suspendiert und direkt für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Bakterienpellet in 2 ml 50 mM CaCl₂-Lösung aufgenommen, der Ansatz weitere 15 min auf Eis ruhen gelassen und mit eiskaltem Glycerin (150 μ l/ml) vorsichtig gemischt. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden aliquotiert zu je 50 μ l, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert. Vor Gebrauch wurde die Kompetenz der jeweiligen Charge mittels Transformation (siehe 4.3.8.2) mit dem zirkulären Plasmid pGEM[®]-T easy (siehe 3.8) oder Wasser als Negativkontrolle überprüft.

Kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes DH10Bac[™] (siehe 3.6) wurden nicht selbst vorbereitet, sondern direkt transformationsfertig vom Hersteller bezogen.

4.3.8.2. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Chemisch kompetente *E. coli* (DH5 α /NEB 5 α)-Zellen (siehe 4.3.8.1) wurden zum Auftauen 30 min lang auf Eis ruhen gelassen und anschließend mit je 5–10 μ l Plasmid-DNA aus Ligationsansätzen (siehe 4.3.7) vorsichtig vermischt. Nach weiteren 30 min Inkubation auf Eis, in denen bereits ein Teil der Plasmid-DNA in die Bakterien transformiert werden konnte, wurde die Aufnahme von Plasmid-DNA durch das kurzzeitige Aussetzen der Proben von Wärme erhöht^[250]. Diese sogenannte Hitzeschock-Methode umfasste ein Einbringen der Transformationsansätze in ein auf 42 °C aufgeheiztes Wasserbad für 45–60 s mit direkt anschließender Abkühlung durch Inkubation auf Eis für 2:30 min. Nach Zugabe von je 250 μ l SOC-Medium (siehe 3.7) wurden die Bakterien zur Regeneration bei 37 °C und 220 min⁻¹ für 60–90 min inkubiert und im Anschluss je 200 μ l der Transformationsansätze auf Petrischalen mit LB-Agar (siehe 3.7) und weiteren Zusätzen (Tabelle 4.12) ausplattiert. Transformierte Bakterien, die aufgrund einer auf dem jeweiligen aufgenommenen Plasmid codierten Antibiotika-Resistenz einen Selektionsvorteil besaßen, wuchsen über Nacht bei 37 °C für 18–24 h.

Kompetente *E. coli* (DH10Bac[™])-Zellen (siehe 4.3.8.1) wurden bis zum Hitzeschock genauso wie die DH5 α /NEB 5 α -Zellen behandelt. Nach diesem Schritt wurde den Bestimmungen von Invitrogens Bac-to-Bac[®] Baculovirus Expression System folgend verdünnt, inkubiert, eine Verdünnungsreihe angefertigt und diese Bakteriensuspensionen auf TraPo-Agarplatten (Tabelle 4.12) ausgestrichen. Transformierte Bakterien mit dazugewonnenem Selektionsvorteil wuchsen bei 37 °C für 48 h.


Tabelle 4.12 Zusammensetzung und Anwendung von LB-Agarplatten zur Anzucht von *E. coli*-Zellen

	Ampicillin-LB-Agarplatten	Select-LB-Agarplatten	TraPo-Agarplatten
Medium	LB-Agar (pH 7,0) +	LB-Agar (pH 7,0) +	LB-Agar (pH 7,0) +
Zusätze	Ampicillin (100 µg/ml)	Ampicillin (100 µg/ml) IPTG (12 µg/ml) X-Gal (80 µg/ml)	Gentamicin (7 µg/ml) Kanamycin (50 µg/ml) Tetracyclin (10 µg/ml) IPTG (40 µg/ml) Bluo-Gal (100 µg/ml)
Funktion	Selektion transformierter <i>E. coli</i> (DH5α/NEB 5α)-Zellen	Selektion transformierter <i>E. coli</i> (DH5α/NEB 5α)-Zellen + Blau-Weiß-Selektion auf positive Ligation	Selektion transformierter <i>E. coli</i> (DH10Bac™)-Zellen + Blau-Weiß-Selektion auf positive Transposition

4.3.8.3. Präparation kompetenter Hefezellen

Zur Herstellung kompetenter *S. cerevisiae* (INVSc1)-Zellen (siehe 3.6) wurde mit Invitrogens *S. c.* Easy-Comp™ Transformation Kit – basierend auf der Methode von DOHMEN *et al.*^[251] – und leichten Abwandlungen des Herstellerprotokolls gearbeitet, was bereits aus unserer AG heraus beschrieben wurde^[220]. Von einer Petrischale mit YPGA-Agar (siehe 3.7) und ausgestrichenen Hefezellen wurde eine einzelne Kolonie in 10 ml YPGA-Medium (siehe 3.7) überführt. Nach Inkubation bei 30 °C und 250 min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ = 3,0–5,0 wurde die Zellsuspension mit frischem YPGA-Medium auf eine OD₆₀₀ = 0,2–0,4 verdünnt. Nach erneuter Vermehrung der Hefezellen bei 30 °C und 250 min⁻¹ bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6–1,0 wurden die Zellen bei 1.500 min⁻¹ für 5 min vom Medium getrennt und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 10 ml Solution 1 resuspendiert. Anschließend wurde bei gleichen Bedingungen wie zuvor wieder zentrifugiert und das Pellet dieses Mal in 1 ml Solution 2 aufgenommen. Die erhaltenen kompetenten Zellen wurden aliquotiert zu je 50 µl und nach langsamem Einfrieren bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

4.3.8.4. Transformation kompetenter Hefezellen

Kompetente *S. cerevisiae*-Zellen (siehe 4.3.8.3) wurden unter Zuhilfenahme von Invitrogens *S. c.* Easy-Comp™ Transformation Kit ähnlich der Vorschrift von MÜLLER^[220] transformiert. Für jede Transformation wurde ein Aliquot von 50 µl kompetenten Hefezellen bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut und mit 1–2 µl Plasmid-DNA (Stammvektor: pESC-URA; siehe 3.8) aus Ligationsansätzen (siehe 4.3.7) und 500 µl Solution 3 versetzt. Nach gründlichem Mischen mittels Vortexen wurde der Transformationsansatz in einem Wasserbad bei 30 °C für 60 min inkubiert, was alle 15 min durch erneutes Vortexen zur Erhöhung der Transformationseffizienz kurz unterbrochen wurde. Vom Ansatz wurden anschließend 200 µl auf eine Petrischale mit SGI-Agar (siehe 3.7) ausplattiert und diese bei 30 °C für 3–4 Tage inkubiert. Ausschließlich transformierte Hefezellen, die zur Produktion der Nukleobase Uracil durch Aufnahme des auf pESC-URA vorhandenen Biosynthesegens befähigt waren, wuchsen dabei auf dem Uracil-freiem SGI-Agar durch ihren Selektionsvorteil als Kolonien heran.

4.3.9. Anzucht und Lagerung als Dauerkulturen

4.3.9.1. Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von *E. coli*

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA in *E. coli* wurde eine Über-Nacht-Kultur (ÜN-Kultur) angelegt. In 5 ml LB-Medium, das die gleichen Antibiotika wie das jeweils zuvor verwendete feste Kulturmedium auf den Selektionsplatten enthielt, wurde eine einzelne Bakterienkolonie bei 37 °C und 220 min⁻¹ für 16–24 h über



Nacht inkubiert. Diese ÜN-Kultur wurde dann entweder zur Isolierung von Plasmid-DNA (siehe 4.3.10.1) verwendet und/oder es wurden – zur Lagerung von transformierten *E. coli*-Zellen – 700 µl Bakteriensuspension mit 300 µl sterilem Glycerin vorsichtig homogen vermischt und bei -80 °C gelagert.

4.3.9.2. Anzucht und Anlegen von Dauerkulturen von *S. cerevisiae*

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA in *S. cerevisiae* wurde eine einzelne transformierte Hefekolonie (siehe 4.3.8.4) von einer Petrischale mit dem Selektionsmedium SGI-Agar in 5 ml SGI-Medium (siehe 3.7) überführt und zur Anzucht einer ÜN-Kultur bei 30 °C und 250 min⁻¹ für 24 h wachsen gelassen. Diese ÜN-Kultur wurde dann entweder zur Isolierung von Plasmid-DNA (siehe 4.3.10.2) verwendet und/oder es wurden – zur Lagerung von transformierten *S. cerevisiae*-Zellen – 250 µl Hefesuspension mit 300 µl YPGA-Medium (siehe 3.7) und 400 µl sterilem Glycerin vorsichtig homogen vermischt und bei -80 °C gelagert.

4.3.10. Extraktion von Plasmid-DNA

4.3.10.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Plasmid-DNA aus Bakterienzellen wurde entweder mit PeqLabs peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I den Herstellerangaben folgend gewonnen oder nach der Methode der alkalischen Lyse^[252]. Bei Letzterer denaturierte im stark alkalischen Milieu selektiv hochmolekulare DNA (Bakterienchromosom), die nach Neutralisieren als unlöslicher Niederschlag ausfiel und zusammen mit der in hoher Kaliumacetat-Konzentration ausgefallenen Proteinfraction abgetrennt werden konnte. Plasmid-DNA als niedermolekulares, kovalent geschlossenes, zirkuläres Nukleinsäure-Molekül präzipitierte dabei nicht, sondern blieb dauerhaft gelöst und konnte nach Waschschritten mit Chloroform durch eine Alkohol-fällung aus der wässrigen Lösung erhalten werden.

Zur Extraktion wurden 1,8–2,7 ml einer ÜN-Kultur (siehe 4.3.9.1) bei 5.000 min⁻¹ für 3 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterienpellet durch Mischen mittels Vortexen in 320 µl Puffer 1 (siehe 3.4) resuspendiert. Nach Zugabe von 320 µl Puffer 2 wurde durch vorsichtiges Invertieren gemischt und der Ansatz inkubiert bei Raumtemperatur für 5 min, wobei das ionische Detergens Natriumlaurylsulfat (*engl.* sodium dodecyl sulfate, SDS) die Bakterienzellen lysierte, die RNase A störende Ribonukleinsäuren abbaute und der stark alkalische pH-Wert für die Denaturierung chromosomaler DNA sorgte. Gestoppt wurden die alkalische Lyse und der RNA-Verdau anschließend durch Zugabe von 320 µl Puffer 3. Während 20 min Inkubation auf Eis fielen denaturierte DNA-Aggregate und Protein-SDS-Komplexe aus dem Ansatz aus und wurden danach bei 14.000 min⁻¹ für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit gleichem Volumen Chloroform versetzt, die Phasen durch gründliches Mischen mittels Vortexen homogenisiert und bei 14.000 min⁻¹ für 10 min wieder voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde dann mit 0,7 Volumenteilen 2-Propanol gründlich vermischt und während der Zentrifugation bei 14.000 min⁻¹ für 30–45 min präzipitierte die Plasmid-DNA, die anschließend mit 500 µl Ethanol 70% (V/V) durch vorsichtiges Invertieren und 14.000 min⁻¹ für 10 min gewaschen wurde. Nach Abnahme des Überstandes trocknete die Plasmid-DNA bei 37 °C für 30 min in einem Inkubator oder einem Vakuumkonzentrator (siehe 3.1) und wurde in 30 µl dH₂O aufgenommen. Die Plasmid-Lösung wurde quantifiziert (siehe 4.3.3) und direkt weiterverwendet oder bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert. Auf diese Weise gewonnene Plasmide wurden mittels PCR (siehe 4.3.5) oder Restriktionsverdau (siehe 4.3.7.2) auf ihr eingebautes Insert kontrolliert. Wenn die DNA-Fragmente nach Kontrolle mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.3.6) die erwartete Größe zeigten, wurden sie zur DNA-Sequenzierung (siehe 4.3.11) geschickt und bei positivem Sequenzierergebnis zur erneuten Transformation (siehe 4.3.8) herangezogen.

4.3.10.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *S. cerevisiae*

Da Zellen von *S. cerevisiae* im Vergleich zu *E. coli*-Zellen eine festere Zellwand und somit eine höhere Stabilität gegenüber einem Zellaufschluss mittels alkalischer Lyse besaßen, ließ sich die Extraktionsmethode für Bakterien nicht auf die Hefezellen übertragen. Stattdessen wurde eine abgewandelte Methode von HOFFMAN & WINSTON^[253] verwendet, wie sie bereits zuvor in unserer AG beschrieben wurde^[220].

Zur Extraktion wurden 2,0 ml einer ÜN-Kultur (siehe 4.3.9.2) bei 5.000 min⁻¹ für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Abnahme des Überstandes wurden dem Pellet 200 µl Puffer P_y (siehe 3.4), 200 µl eines Gemisches von Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (125:24:1) sowie 300 mg säuregewaschene Glaskugeln (siehe 3.1) hinzugefügt und die Hefezellen durch gründliches Homogenisieren mittels Vortexen für 2 min aufgeschlossen. Bei 14.000 min⁻¹ für 10 min wurden alle unlöslichen Bestandteile sowie die erste Chloroform-Fraktion abgetrennt und der wässrige Überstand mit gleichem Volumen Chloroform versetzt. Ab diesem Schritt wurden die zu extrahierenden Hefe-Proben wie unter 4.3.10.1 beschrieben weiterbehandelt und die erhaltene Plasmid-Lösung ebenfalls quantifiziert und bei -20 °C bis zum Gebrauch gelagert. Auch diese Plasmide wurden mittels PCR auf ihr eingebautes Insert kontrolliert, bei DNA-Fragmenten von erwarteter Größe sequenziert und bei positivem Sequenzierergebnis für die Expression in Hefezellen (siehe 4.4.1) erneut in *S. cerevisiae*-Zellen transformiert und als Dauerkultur gelagert (siehe 4.3.9.2).

4.3.11. DNA-Sequenzierung und Auswertung

Die DNA-Sequenzen von aufgereinigten Plasmiden/DNA-Konstrukten wurden von den auswärtigen Firmen Eurofins MWG Operon oder GATC Biotech AG im Auftrag kontrolliert. Proben wurden entsprechend den Anforderungen der Dienstleister mit dH₂O auf eine Konzentration von ca. c = 100 ng/µl gebracht und, falls gefordert, mit den zum jeweiligen Plasmid passenden Sequenzierprimern (siehe 3.8) vorgemischt.

Durch Invertieren/Übersetzen, theoretischen Restriktionsverdau, Sequenzvergleich, Suche nach bestimmten Sequenzelementen sowie letztlich Datenbank-Abgleichen mit verschiedenen Software-Anwendungen (siehe 3.9) wurden die erhaltenen Sequenzierergebnisse bioinformatisch aufgearbeitet und ausgewertet.

4.3.12. Phylogenie

Zur systematischen bzw. funktionellen Einordnung der neu klonierten PTs in den entwicklungsgerichteten Kontext wurde nach bereits optimierten Vorgaben (siehe MÜLLER, Kapitel „III 4.22“)^[220] ein phylogenetischer Baum erstellt. Dabei wurde das zugrunde liegende Diagramm aromatischer PTs (siehe MÜLLER, „Kapitel IV 3.8, Abb. 33“)^[220] einerseits um die PTs des Vitamin E-Stoffwechsels sowie die Fragmente aus *H. perforatum* ausgedünnt, andererseits wurden dafür zwischenzeitlich publizierte (vgl. MUNAKATA *et al.*, „Abbildung 3“)^[169] und die eigenen Volllänge-Sequenzen aus Johanniskraut addiert (siehe 5.2.3.4). Verwurzelt wurde der phylogenetische Baum ebenso wie in der Vorlage beschrieben mit der aliphatischen PT aus dem Säuger *Rattus norvegicus*^[254]. Die Vorbereitung erfolgte in Form von Alignments durch das Programm BioEdit^[255] (auf Grundlage des ClustalW-Algorithmus^[256]). Die Software Mega 6.06^[257] berechnete anschließend anhand dieser Alignments den phylogenetischen Verwandtschaftsbaum nach der Neighbour-Joining-Methode (Bootstrap: 1.000) in Verbindung mit dem Poisson-Modell.

4.4. Proteinexpression

Die gentechnische Herstellung von eukaryotischen (und besonders membrangebundenen) Proteinen in nicht-natürlichen Wirtszellen ist eine große Herausforderung, da viele dieser eukaryotischen Proteine co- bzw. posttranslationale Modifikationen und/oder co- bzw. posttranslationalen Proteintransport durchlau-



fen. Gerade Bakterien wie der weitverbreitete Modellorganismus *E. coli* (BL21(DE3); Lemo21(DE3)) sind aufgrund ihres prokaryotischen Zellaufbaus nicht Expressionswirt der ersten Wahl und für die meisten Modifizierungen sowie die korrekte Proteinfaltung, v.a. beim Einbau nicht-löslicher Proteine in Organell-/Zellmembranen, ungeeignet. Daher wurden im Verlaufe dieser Arbeit als eukaryotische Expressionswirte Hefezellen getestet und anschließend Insektenzellen als Produktionssystem der Wahl identifiziert, weil diese die meisten Voraussetzungen für die korrekte Expression und Herstellung rekombinanter Proteine einschließlich fast aller an der Proteinbiosynthese beteiligten Modifikationen erfüllen. Das Insektenzell-Baculovirus-Expressionssystem (siehe 4.4.2), repräsentiert durch Invitrogens Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (siehe 3.3) und Gibco® Sf9-Zellen (siehe 3.6), erwies sich dabei als das geeignetste – nicht nur wegen der schnellen und effizienten Proteinherstellung in großen Mengen, sondern weil es als einziges getestetes System die Produktion von aktiven PTs aus Johanniskraut ermöglichte.

4.4.1. Proteinexpression in Hefezellen

4.4.1.1. Kultivierung von genetisch modifizierten Hefezellen

Genetisch modifizierte *S. cerevisiae*-Zellen (siehe 4.3.8.4) wurden in YPGA-Medium als Dauerkultur bei -80 °C gelagert (siehe 4.3.9.2) und erst direkt zur Genexpression, die in Anlehnung an MÜLLER^[220] auf Grundlage von POMPON *et al.*^[258] erfolgte, aufgetaut und kultiviert. Dazu wurde eine Dauerkultur auf einer Petrischale mit SGI-Agar (siehe 3.7) ausgestrichen und bei 30 °C für 36–48 h angezogen. Durch Überführen einer einzelnen gewachsenen Hefe-Kolonie in 5 ml SGI-Medium (siehe 3.7) wurde eine ÜN-Kultur angelegt, die bei 30 °C und 250 min^{-1} für 24 h inkubierte. Mit 1 ml dieser ÜN-Kultur wurden 150 ml YPGE-Medium (siehe 3.7) angeimpft und bei 30 °C und 250 min^{-1} weiter wachsen gelassen bis zu einer Zelldichte von $OD_{600} = 1,5\text{--}2,0$. Da die Proteinexpression von den GAL1- und GAL10-Promotoren reguliert wurde, die in Anwesenheit von Glucose gehemmt und durch Vorhandensein von Galactose induziert wurden^[248], wurde nach ausreichender Vermehrung der Hefekultur mit Hilfe eines Glucose-Teststreifens (siehe 3.1) die Konzentration an verbliebener Glucose im Medium kontrolliert. War noch Glucose im Medium nachweisbar, so wurde die Hefekultur entweder weiter unter zuvor beschriebenen Bedingungen wachsen gelassen oder – bei noch hoher Restglucose-Konzentration – die Kultur bei 3.000 min^{-1} für 3 min in Zellen und überstehendes Medium aufgetrennt. Die pelletierten Hefezellen konnten anschließend in 150 ml Glucose-freiem YPGE-Medium resuspendiert und die neue Hefekultur für die folgende Induktion verwendet werden.

4.4.1.2. Induktion von Hefezellen

Nachdem ausgeschlossen wurde, dass die Transkription durch Anwesenheit von Glucose im Medium inhibiert werden konnte, wurden die induzierbaren Promotoren GAL1 und GAL10 durch Zugabe von 17,5 ml steriler Galactose-Lösung (200 g/l) pro 150 ml Hefekultur zur Transkription angeregt. Dadurch ausgelöst folgte die Genexpression während der Inkubation bei 30 °C und 250 min^{-1} für 16 h und lieferte die gewünschten Prenyltransferasen, die aus den Hefezellen extrahiert (siehe 4.5.1) und für *in vitro*-Enzymuntersuchungen herangezogen wurden (siehe 4.5.5).

4.4.2. Proteinexpression im Insektenzell-Baculovirus-System

4.4.2.1. Kultivierung von Sf9-Zellen

Als Wirtssystem diente die immortalisierte Insektenzelllinie Sf9 (siehe 3.6), die aus Ovarzellen des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda* stammt. Sf9-Zellen können leicht mit dem Baculovirus *Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus* (AcMNPV) infiziert werden, was sich sehr gut eignet für die Expression von Proteinen auf Basis von rekombinanten Bacmiden/Baculoviren.

Die Sf9-Zellen wurden als 50–500 ml-Proben in Sf9-Medium (siehe 3.7) bei 27 °C und 140 min⁻¹ in einem Schüttelinkubator unter sterilen Bedingungen kultiviert und nach jeweils 3–4 Tagen durch Verdünnen der Zellsuspension mit frischem Sf9-Medium bei einer Zelldichte zwischen 1 x 10⁶–10 x 10⁶ Zellen/ml gehalten.

4.4.2.2. Herstellung von rekombinanten Bacmiden

Der Startpunkt für die Herstellung eines Baculovirus war das jeweilige rekombinante DNA-Konstrukt des Transfervektors pFastBac™ 1 (siehe 4.3.7.4). Unter Einsatz von Invitrogens Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System (siehe 3.3) erfolgte daraus im Folgenden die Anzucht eines rekombinanten Bacmids. Dabei wurde zuerst das aufgereinigte Vektor-Konstrukt nach Herstellerangaben in einen weiteren *E. coli* (DH10Bac™)-Stamm transformiert. DH10Bac™-Zellen besitzen ein sogenanntes Helferplasmid (pMON7124; 13,2 kb), auf dem eine Tetracyclin-Resistenz und Transpositionsproteine codiert waren, sowie einen Baculovirus-Transportvektor (Bacmid bMON14272; 136 kb), auf dem sich ein Kanamycin-Resistenzgen und die fusionierte Tn7-Transposon-Anlagerungsstelle *lacZ*-mini-*att*Tn7 befindet. An diese Anlagerungsstelle kann ein pFastBac™ 1-ständiges Transposon-Element binden. Dieses mini-Tn7-Transposon setzt sich aus einer linken Transposon-Region (Tn7L), der Expressionskassette des transformierten Vektors – bestehend aus dem AcMNPV-Polyhedrin-Promotor, der MCS (inkl. der zu exprimierenden DNA-Sequenz) und einem SV40-Polyadenylierungssignal – sowie dem Gentamicin-Resistenzgen und einem rechten Transposon-Bereich (Tn7R) zusammen. Zwischen *lacZ*-mini-*att*Tn7 und mini-Tn7 Transposon kam es nach der Transformation unter Mitwirkung des exprimierten Helferplasmids zur Transposition (homologe Rekombination), wobei die Expressionskassette zielgerichtet in den Baculovirus-Transportvektor integriert wurde und so eine rekombinante Bacmid-DNA entstand^[259]. Erfolgreiche Transposition unterbrach dabei das β -Galactosidase-Gen innerhalb des *lacZ*-mini-*att*Tn7-Elements, so dass mittels Blau-Weiß-Selektion (siehe Ligation in pGEM®-T easy; siehe 4.3.7.4) Bakterien mit rekombinantem Bacmid durch Wachstum auf TraPo-Agarplatten (Tabelle 4.12) in weißen Kolonien (Lac⁻) identifiziert werden konnten. Nach Inkubation der Agarplatten bei 37 °C für 48 h wurde jeweils eine einzelne weiße Bakterien-Kolonien in 5 ml LB-Medium, das zusätzlich Gentamicin (7 μ g/ml), Kanamycin (50 μ g/ml) und Tetracyclin (10 μ g/ml) enthielt, überführt und bei 37 °C und 220 min⁻¹ für 16–24 h über Nacht inkubiert. Aus dieser ÜN-Kultur wurde dann die rekombinante Bacmid-DNA wie zuvor beschrieben isoliert (siehe 4.3.10.1), quantifiziert (siehe 4.3.3) und bei -20 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

4.4.2.3. Herstellung von rekombinanten Baculoviren

Zur Anzucht von Baculoviren wurden Sf9-Zellen (siehe 4.4.2.1) mit dem Grundmedium Sf-900™ II SFM (siehe 3.7) bis zu einer Zelldichte von 0,4 x 10⁶ Zellen/ml verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 2 ml in eine 6-Loch-Kulturplatte überführt und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Gleichzeitig wurden einzeln einerseits 8 μ l Cellfectin® II Reagenz – eine kationische Lipid-Formulierung, die als DNA-Träger bei der Transfektion (hier: Lipofektion) von Insektenzellen diente – und andererseits 1 μ g der aufgereinigten, rekombinanten Bacmid-DNA mit jeweils 100 μ l Grundmedium vorsichtig gemischt. Bacmid- und Cellfectin® II-Lösung wurden vereint, vorsichtig miteinander vermischt und auch bei Raumtemperatur für 15–30 min stehen gelassen. Dabei kam es zur Komplexbildung und Bindung der anionischen Bacmid-DNA mit den kationischen Lipiden, was zu einem Einschluss in bzw. einer Adsorption an den vorliegenden Liposomen führte. Die Bacmid-Liposomen-Mischung wurde anschließend nach und nach auf die Sf9-Zellen aufgetropft und bei 27 °C für 3–5 h inkubiert, damit die Liposomen mittels Endozytose mit der Zellmembran der Sf9-Zellen fusionierten und so die Bacmid-DNA in die Insektenzellen transfizierten. Nach erfolgter Transfektion wurde die überstehende Bacmid-Liposomen-Mischung von den Sf9-Zellen abgenommen, durch 2 ml Sf9-Medium (siehe 3.7) ersetzt und der Ansatz bei 27 °C für 3–5 Tage zur ersten Baculoviren-Produktion inkubiert. Nach beginnendem Absterben der infizierten Sf9-Zellen aus der 6-Loch-Kulturplatte wurden diese bei 4 °C und 4.000 min⁻¹ für 2 min vom Medium getrennt. Der Baculovirus-haltige Überstand diente zum Infizieren von



100 ml neuen Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml, die zur Vermehrung der Baculoviren bei 27°C und 140 min^{-1} für 5–7 Tage kultiviert wurden. War die Zellviabilität der Sf9-Zellen nach dieser Inkubationszeit bereits niedriger als 40%, so wurden Zellen und Baculoviren erneut durch Zentrifugation bei 4°C und 4.000 min^{-1} für 10 min getrennt und der virenhaltige Überstand durch einen Spritzenfilter ($0,22 \mu\text{m}$ Porengröße) sterilfiltriert. Zur weiteren Vermehrung der Baculoviren folgte eine neue Amplifikationsrunde, bei der 500 ml neue Sf9-Zellen (Zelldichte: 1×10^6 Zellen/ml) mit 5 ml Baculovirus-Lösung infiziert und wie zuvor beschrieben inkubiert, abzentrifugiert und sterilfiltriert wurden.

4.4.2.4. Infektion von Insektenzellen

Zu unterschiedlichen Volumina an Sf9-Flüssigkultur mit einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml wurden zwecks Infizierung und Start der Proteinexpression jeweils 10% (V/V) Baculovirus-Überstand aus den Amplifikationen (siehe 4.4.2.2) dazupipettiert und die Ansätze bei 27°C und 140 min^{-1} für 72–96 h in einem Schüttelinkubator inkubiert. Ausgehend vom viralen AcMNPV-Polyhedrin-Promotor wurde das eingeführte, rekombinante Gen bei der Virus-Replikation stark exprimiert und lieferte nach Transkription und Translation die gewünschten Prenyltransferasen, die aus den Sf9-Zellen extrahiert und für *in vitro*-Enzymuntersuchungen herangezogen wurden.

4.5. Biochemische Methoden

4.5.1. Proteinextraktion aus Hefezellen

Die Isolierung von Protein-Fractionen aus Hefezellen geschah in Anlehnung an eine Methode von POMPON *et al.*^[258]. Inkubationskolben mit Hefekulturen, die rekombinante PTs exprimierten (siehe 4.4.1), wurden bei 4°C und 3.000 min^{-1} für 3 min in Zellen und überstehendes Medium aufgetrennt und das erhaltene Pellet in je 10 ml TEK-Puffer (siehe 3.4) vorsichtig zum Waschen resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden 5 ml TEK-Puffer zum Rückstand addiert, vorsichtig resuspendiert und bei Raumtemperatur für 5 min ruhen gelassen. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die pelletierten Hefezellen vorsichtig in 3 ml TES-B-Puffer (siehe 3.4) aufgenommen, mit 3 g säuregewaschenen Glaskugeln (siehe 3.1) versetzt und durch kräftiges Schütteln bei 4°C für 20 min aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wurde durch lichtmikroskopische Kontrolle bestätigt und die Suspension bei 4°C und 3.000 min^{-1} für 3 min zentrifugiert, um feste Zellrückstände abzutrennen. Nach Überführung des Überstandes in Ultrazentrifugen-Gefäße wurde der feste Rückstand zwei weitere Male mit je 3 ml TES-B-Puffer versetzt, vorsichtig gewaschen, abzentrifugiert und alle drei Überstände schließlich vereint für einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14.000 min^{-1} für 10 min. Der nun klare Überstand (Protein-Rohextrakt) wurde in Ultrazentrifugen-Gefäße pipettiert, mit TES-B-Puffer verdünnt und in einer vorgekühlten Ultrazentrifuge bei $2-6^\circ\text{C}$ und $100.000 \times g$ für 60 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurde dem Rückstand 1 ml eiskalter TEG-Puffer (siehe 3.4) hinzugefügt und das Pellet durch langsames Aufziehen und Ablassen mittels Spritze mit Kanüle oder Pasteurpipette vorsichtig auf Eis resuspendiert. Die so gewonnene Mikrosomen-Fraktion wurde quantifiziert (siehe 4.5.3), die Expression und Reinheit der Extrakte mittels SDS-PAGE kontrolliert (siehe 4.5.4) und die rekombinanten Enzyme direkt für Aktivitätsuntersuchungen weiterverwendet (siehe 4.5.5) oder bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

4.5.2. Proteinextraktion aus Insektenzellen

Exprimierte PTs aus infizierten Sf9-Zellen (siehe 4.4.2.4) wurden in Anlehnung an ein Extraktionsprotokoll von OHARA *et al.*^[260] isoliert. Nach Überführung der Suspension in Zentrifugenröhrchen wurden die Insektenzellen bei 4°C und 5.000 min^{-1} für 5 min pelletiert und in 5 ml Sonication-Puffer (siehe 3.4) durch

Auf- und Abpipettieren vorsichtig resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte auf Eis mit Hilfe von Bransons Ultraschall-Homogenisator Sonifier® 250, eingestellt auf Duty Cycle = 15 und Output Control = 1,5. Es wurde 3 x 1 min lang sonifiziert, unterbrochen von je 30 s Ruhepause. Die optische Kontrolle des Zellaufschlusses erfolgte mikroskopisch nach Anfärben eines 50 µl-Aliquots mit Trypanblau-Lösung. Zellrückstände wurden bei 4 °C und 5.000 min⁻¹ für 5 min abzentrifugiert und der Überstand (Protein-Rohextrakt) in Ultrazentrifugen-Gefäße überführt, mit Sonication-Puffer verdünnt und in einer vorgekühlten Ultrazentrifuge bei 2–6 °C und 100.000 x g für 60 min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden dem Rückstand 2 ml eiskalter Puffer A (siehe 3.4) hinzugefügt und das Pellet durch langsames Aufziehen und Ablassen mittels Spritze mit Kanüle vorsichtig auf Eis resuspendiert. Die so gewonnene Mikrosomen-Fraktion wurde quantifiziert (siehe 4.5.3), die Expression und Reinheit der Extrakte mittels SDS-PAGE kontrolliert (siehe 4.5.4) und die erhaltenen rekombinanten Enzyme direkt für Aktivitätsuntersuchungen weiterverwendet (siehe 4.5.5) oder bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

4.5.3. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration von Proteinen in wässriger Lösung wurde spektrophotometrisch mit dem sogenannten Bradford-Test ermittelt^[261]. Ausschlaggebend bei dieser Quantifizierungsmethode war der Effekt, dass der Farbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 im Bradford-Reagenz (siehe 3.4) durch unspezifische Bindung an Proteine von seiner roten, kationischen Form in seine blaue, anionische Form überführt wurde, was mit einer Verschiebung seines UV-Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm einherging. Dadurch konnte die Proteinkonzentration einer mit Bradford-Reagenz versetzten Proteinlösung über den Anstieg ihrer Absorption A₅₉₅ im Vergleich zu einer proteinfreien Referenz-Lösung (Nullabgleich) bestimmt werden. Zur Quantifizierung wurde mit Hilfe des Standardproteins Rinderserumalbumin eine Kalibriergerade aufgenommen und daraus ein Faktor für das Bradford-Reagenz errechnet, der in die Berechnungsformel der Proteinkonzentration (Formel 4.1) mit einging.

Tabelle 4.13 Protokoll des Bradford-Tests

Untersuchungslösung	Nullabgleich
Puffer der Proteinlösung ad 100 µl	Puffer der Proteinlösung 100 µl
Proteinlösung 2–5 µl	
Bradford-Reagenz 900 µl	Bradford-Reagenz 900 µl
Protokoll: ↓ 5 min Inkubation A ₅₉₅ (als Messwert)	Protokoll: ↓ 5 min Inkubation A ₅₉₅ (als Nullwert)

Formel 4.1 Berechnung der Proteinkonzentration

$$c_{Probe} = \frac{A_{595}}{F_B \cdot V}$$

c Konzentration [µg/µl]
 A₅₉₅ Absorption bei λ = 595 nm
 F_B Faktor des Bradford-Reagenzes
 V Volumen der Untersuchungslösung

4.5.4. Denaturierende Gelelektrophorese von Proteinen

Aus Expressionsorganismen extrahierte Protein-Fractionen wurden mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*engl.* sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) aufgetrennt, um auf exprimierte PTs zu testen. Durch das Detergens SDS in den verwendeten Puffern und der Gelmatrix wurden die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen zerstört – was teilweise durch zusätzliche



Inkubation bei 95 °C für 15 min sichergestellt wurde – und zusätzlich SDS-Protein-Komplexe gebildet, die alle eine gleiche Protein-Oberflächenladung aufwiesen und gewährleisteten, dass bei der Elektrophorese ausschließlich eine Auftrennung nach Molekülgröße stattfand.

Die verwendeten SDS-PAGE-Gele bestanden aus einem kleinmaschigen 12%igen Trenngel und einem aufgesetzten, großporigen 4%igen Sammelgel (siehe 3.4), in dessen Auftragsaschen die jeweiligen Proben geladen wurden. Zur Probenvorbereitung wurden je 10–20 µl (ca. 10 µg) der zu analysierenden Proteinfractionen, zum Teil nach vorheriger Quantifizierung (siehe 4.5.3), mit je 1/3 Volumen an 3x SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe 3.4) gemischt und ggf. aufgekocht. Nach dem Beladen der Gele erfolgte der Trennlauf in einer mit SDS-PAGE-Laufpuffer (siehe 3.4) gefüllten Elektrophorese-Apparatur (siehe 3.1) bei einer angelegten Stromstärke von 40 mA für ca. 45 min, wobei sich die Proben nach Durchlaufen des Sammelgels am Übergang in das dichtere Trenngel aufkonzentrierten und im Trenngel als scharfe Proteinbanden erschienen (sog. diskontinuierliche SDS-PAGE). Als Größenstandard zur Bestimmung der Masse von Proteinen wurde Thermo Scientifics PageRuler™ Protein-Leiter (Prestained oder Unstained) mit auf das Gel geladen. Die fertigen SDS-PAGE-Gele wurden nach dem Trennlauf zum Anfärben für ca. 1 h in Coomassie-Färbelösung (siehe 3.4) eingelegt und anschließend durch Transfer in Coomassie-Entfärbelösung (siehe 3.4) bzw. dH₂O zum Waschen teilentfärbt, so dass nur noch der Größenmarker und die Proteine als blaue Banden auf durchsichtigem Hintergrund sichtbar blieben.

4.5.5. *In vitro*-Aktivitätsuntersuchungen

Die erfolgreiche Expression und die Aktivität von untersuchten PTs wurden mit Enzymassays *in vitro* kontrolliert. Der zugrundeliegende Reaktionsablauf dieser Untersuchungen war die Enzym-vermittelte Übertragung von Prenyleinheiten auf aromatische Akzeptor-Moleküle und der anschließende Nachweis prenylierter Produkte, die sich durch größere Hydrophobie von ihren Substraten unterscheiden, mittels HPLC. Dabei wurde auf Grundlage vorheriger Standard-Enzymassays aus unserer AG^[220,262] mit einer weiterentwickelten Methode, u.a. modifiziert nach OHARA *et al.*^[260], gearbeitet.

Für einen Standard-Reaktionsansatz (Tabelle 4.14) wurden die Bestandteile des Assays in 100 mM TRIS-HCl-Puffer, pH 8 zum finalen Reaktionsvolumen von 250 µl gemischt. Dazu zählten DMAPP als Prenyldonor und MgCl₂-Lösung als PT-Cofaktor, da divalente Kationen für die Aktivität pflanzlicher AS-PTs unerlässlich waren^[162], sowie Dithiothreitol (DTT) als Protein-konservierendes Antioxidans, das die eingesetzten Enzyme vor unspezifischer Inaktivierung schützte. Unter diesen Bedingungen wurden im Arbeitsverlauf bis zu 18 verschiedene Aromaten aus unterschiedlichen Stoffgruppen (Abbildung 4.7), jeder als 10 mM methanolische Stammlösung vorbereitet, auf ihre Eignung als PT-Substrat getestet und dem jeweiligen Ansatz adaptiert. Die Zugabe von je 100 µg Protein aus Mikrosomen-Fractionen (siehe 4.5.1; 4.5.2) startete die Reaktion, die bei 30 °C im Wasserbad oder einem Schwenkinkubator (50 min⁻¹) für 30 min inkubierte.

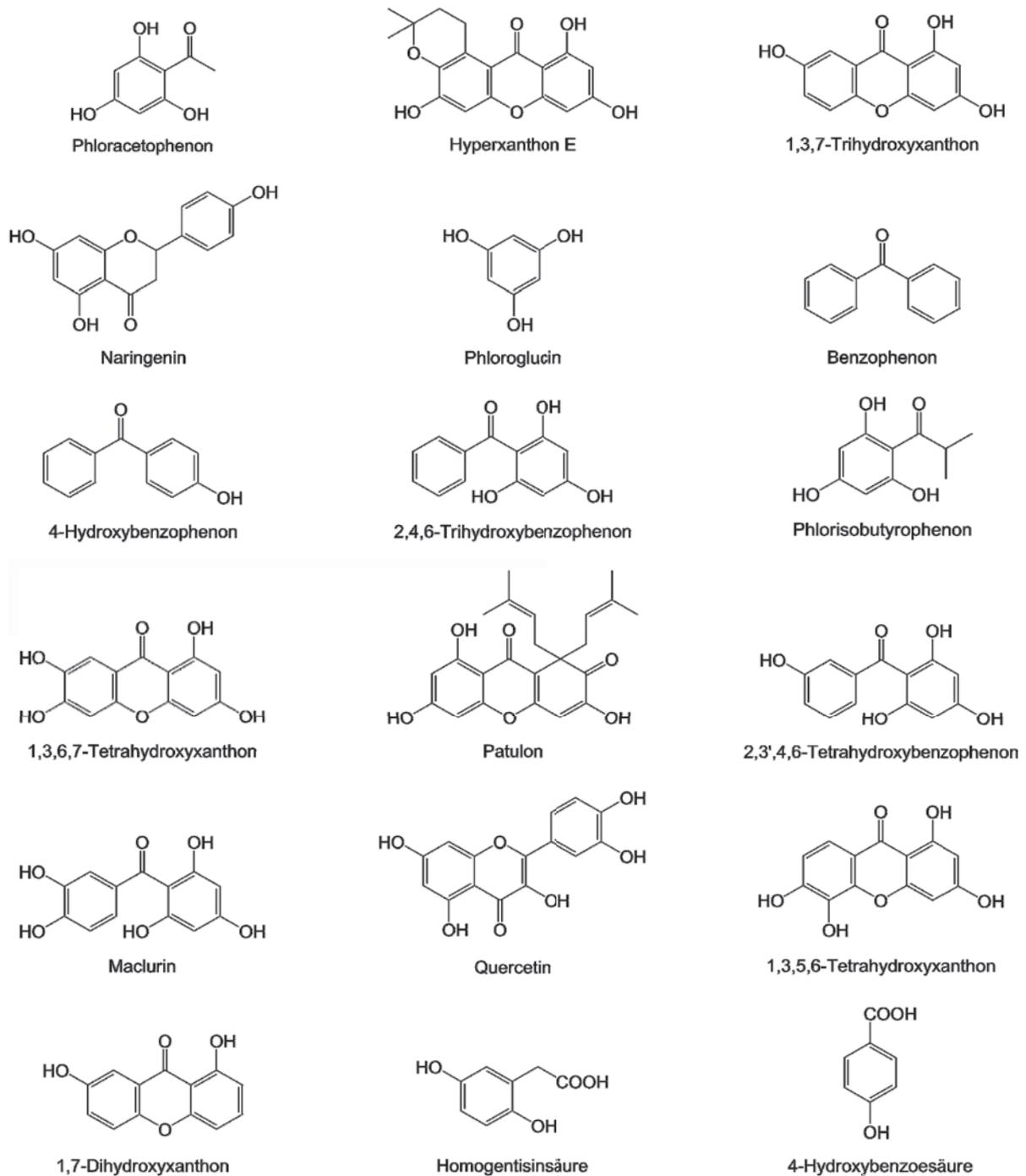


Abbildung 4.7 Strukturformeln eingesetzter, getesteter aromatischer Substrate

In manchen Situationen – gerade wenn die Menge des zur Verfügung stehenden Enzyms oder Substrates stark limitiert war – wurde das Reaktionsvolumen des Standard-Assays auf 125 μl halbiert, und aus gleichen Gründen wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht jedes Substrat mit jeder PT kombiniert und getestet. Eine parallele Negativkontrolle wurde jeweils mit Protein aus derselben Mikrosomen-Fraktion durchgeführt, das vor der Zugabe jedoch bei 95 $^{\circ}\text{C}$ für 20 min mit mehrfachem Vortexen zwischendurch denaturiert wurde. Bei gefundener Aktivität im Standardansatz wurden weitere Negativkontrollen hinzugezogen – Inkubation mit extrahierten Mikrosomen aus einer Leervektor-Kontrolle, ein komplett enzymfreier Assay ohne Protein oder Assays ohne den Prenyldonor DMAPP bzw. den Cofaktor Mg^{2+} –, um eine enzymunabhängige chemische Reaktion innerhalb der Reaktionsmischung definitiv ausschließen zu können.


Tabelle 4.14 Zusammensetzung und Variation des Standard-Enzymaktivitäts-Assays (250 μ l)

Komponente	Eingesetzte Menge	Konzentration im Ansatz
TRIS-HCl-Puffer, pH 8 (100 mM) / K ₃ PO ₄ -Puffer, pH 7,5 (100 mM)	ad 250 μ l	
Mg ²⁺ (100 mM)	10 μ l	4 mM
DTT (100 mM)	1,25–2,5 μ l	0,5–1 mM
Substrat (10 mM)	2,5–10 μ l	0,1–0,4 mM
DMAPP (50 mM)	1–5 μ l	0,2–1 mM
Protein (Mikrosomen-Fraktion)	100 μ g	0,4 mg/ml
Protokoll:	Inkubation bei 30–40 °C für 30–120 min	

Nach abgelaufener Inkubationszeit wurden 10% des Assay-Volumens von einem Gemisch aus Essigsäure und Methanol (1:4, V/V) dazupipettiert, die Reaktion durch gründliches Mischen mittels Vortexen abgestoppt und bei 14.000 min⁻¹ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 500 μ l Ethylacetat versetzt, die Phasen nach gründlichem Mischen bei 14.000 min⁻¹ für 10 min wieder voneinander getrennt und 400 μ l der organischen Phase abgenommen. Der Rückstand wurde ein weiteres Mal mit 250 μ l Ethylacetat wie zuvor extrahiert und 250 μ l organische Phase wieder abgenommen. Die vereinten Ethylacetat-Phasen wurden im Luftstrom zur Trockne gebracht, der Rückstand in 80 μ l Methanol gelöst und jeweils 20 μ l des Extraktes mittels HPLC (siehe 4.7) auf neu entstandene Produkte untersucht. Positive Aktivitätsbefunde wurden in drei oder mehr voneinander unabhängigen Experimenten bestätigt.

4.5.5.1. Charakterisierung der Prenyltransferase HcPT aus *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen

Um Informationen über optimierte Reaktionsbedingungen von „HcPT“ zu erhalten, wurde diese in Sf9-Zellen exprimierte PT charakterisiert. Anhand einzelner veränderter Parameter des Standard-PT-Assays wurde deren Einfluss auf die Aktivität des Enzyms untersucht^[263]. Der pH-Wert wurde über den Bereich von pH 5–11 in Schritten von 0,5 pH-Einheiten analysiert, und zwar mit verschiedenen Puffersystemen (Tabelle 4.15), da kein System alleine die gesamte Spanne abdeckte. Die Inkubationstemperatur wurde von 20–70 °C in Abständen von 10 °C variiert und unterschiedliche divalente Kationen (Ca²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺, EDTA zur Negativkontrolle) wurden als PT-Cofaktor getestet. Nacheinander wurden die finalen Konzentrationen von DMAPP (5–500 μ M) und 1,3,6,7-THX (20–1.000 μ M) verändert, um mittels Auftragung nach nicht-linearer Regression (in Anlehnung an die Theorie nach MICHAELIS & MENTEN^[264,265]) ihre Michaeliskonstante K_m bestimmen zu können (Microsoft Excel und Hyper 32; siehe 3.9).

Tabelle 4.15 pH-Wert-abhängige Puffersysteme zur Charakterisierung von HcPT

pH-Bereich	Puffersystem	
5,0–7,0	100 mM	MES
5,0–8,0	50–400 mM	K ₃ PO ₄
7,0–7,5	100 mM	K ₂ CO ₃
7,0–7,5	100 mM	Na ₃ PO ₄
7,5–11,0	50–100 mM	TRIS-HCl

4.5.5.2. Enzymatische Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon für die NMR-Spektroskopie

Weil für die NMR-Spektroskopie größere Mengen von enzymatisch generiertem 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon (1,3,6,7-TH8PX) benötigt wurden, erfolgte eine um mehr als 200-fach hochskalierte Inkubation eines Standard-Enzymaktivitäts-Assays (Tabelle 4.14)^[263]. Die Substrate 1,3,6,7-THX (siehe 4.2.3;

Abbildung 4.7) und DMAPP wurden äquimolar in 50 mM K_3PO_4 -Puffer, pH 7,5 in Anwesenheit von DTT vereint und die Prenylierung des Aromaten durch Zugabe der Mikrosomen-Fraktion von „HcPT“ aus Sf9-Zellen gestartet. Die Inkubation lief in einem Schwenkinkubator (50 min^{-1}) bei 40°C über Nacht für 20 h ab. Weil sowohl DMAPP als auch das Protein hitzeanfällig waren, wurde nach 3 h erneut $\frac{1}{4}$ der ursprünglich eingesetzten Menge der beiden Komponenten zum Reaktionsansatz dazupipettiert. Nach dem Stoppen der Reaktion wurde mit Ethylacetat mehrmals extrahiert und die vereinten organischen Phasen im Kaltluftstrom getrocknet, so dass der Rückstand für eine semipräparative Aufreinigung des gewünschten 1,3,6,7-TH8PX herangezogen werden konnte (siehe 4.7.2).

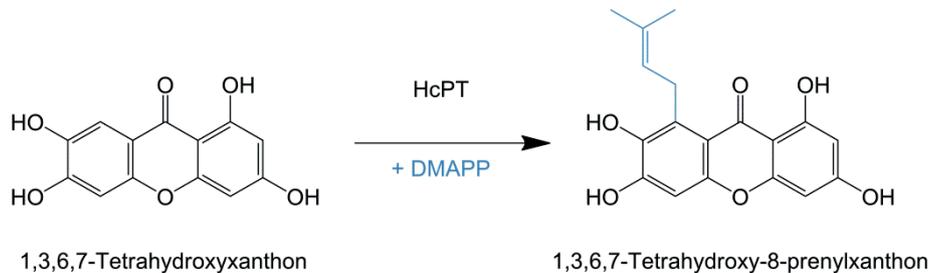


Abbildung 4.8 Reaktionsschema der Prenylierung von 1,3,6,7-THX zum monoprenylierten 1,3,6,7-TH8PX

4.6. Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie (*engl.* confocal laser scanning microscopy, CLSM) werden Proben in der Objektebene mit Hilfe eines fokussierten und somit beugungsbegrenzten Argon-Laser-Mikrostrahls zur Fluoreszenz angeregt. Mittels einer Scanning-Einheit können die Proben nach und nach punktwise, d.h. seriell bestrahlt und vermessen werden sowie die jeweilige Emissionsstrahlung vom abgetasteten Messort pixelweise detektiert werden. Dabei muss die emittierte Fluoreszenzstrahlung vor dem Auftreffen auf einen Sekundärelektronenvervielfacher (*engl.* photomultiplier tube, PMT) eine kreisförmige Lochblende passieren, was ausschließlich der aus der Fokusebene abgegebenen Strahlung möglich ist – je kleiner das Loch in der Lochblende, desto dünner der sogenannte optische Schnitt durch das Präparat. Durch dieses Aussperren von fokusfremden Lichtsignalen werden ein besonders hoher Kontrast und eine besonders scharfe Abbildung der abgerasterten Fokusebene erzielt, die nach Auftreffen auf den PMT digitalisiert und durch pixelweise Darstellung als Bilddatei ausgegeben werden^[266]. Neben einfachen, zweidimensionalen Abbildungen ist es zusätzlich möglich, durch Übereinanderlegen mehrerer optischer Schnitte aus unterschiedlichen Tiefen des Präparates („Bilderstapel“) eine 3D-Darstellung der Probe zu gewinnen.

Zur fluorimetrischen Untersuchung der Lokalisation von PTs in Sf9-Wirtszellen wurde zunächst der Transfervektor pFastBac™ 1 mit dem Reporter-Gen für ein eGFP markiert. Bei der Klonierung dieses Fluoreszenzgens aus dem Donorplasmid „pET-52b(+)-eGFP“ (siehe 3.8) wurde es so in die C-terminale Region der MCS ligiert, dass der Großteil der MCS für Gen-Insertionen am N-Terminus des eGFPs zur Verfügung stand und der neue Transfer-Fusionsvektor pFastBac 1-GFP für die C-terminale Fluoreszenzmarkierung der beiden PTs „HcPT-2“ und „HcPT-2_oT“ zur Verfügung stand (siehe 5.4.3.3). Aus den durch Klonierung in pFastBac 1-GFP erhaltenen, fluoreszenzmarkierten Varianten „HcPT-2-GFP“ und „HcPT-2_oT-GFP“ sowie der Leervektor-Kontrolle wurden Baculoviren präpariert und Sf9-Zellen mit jeweils einem der Gene infiziert (siehe 4.4.2). Diese Insektenzellen wurden dann 24, 48, 72 und 96 h nach Infektion geerntet, jeweils $50 \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $500 \mu\text{l}$ Sf9-Medium (siehe 3.7) in einer 24-Loch-Multiwellplatte gemischt und bei 27°C für weitere 4 h bis zum Absetzen der Zellen inkubiert.



Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen wurden von JOANA BARTELS (Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, TU Braunschweig) mit Nikons konfokalem Laser-Scanning Mikroskop-System A1 (siehe 3.1) mit einem inversen Mikroskop (Eclipse Ti) in Verbindung mit der Steuerungs- und Auswertungssoftware NIS-Elements Microscope Imaging (siehe 3.9) durchgeführt und die Ergebnisse mit ihrer freundlichen Unterstützung zusammen ausgewertet. Zur Erstellung von Schichtaufnahmen wurde das eGFP in den zu untersuchenden Proben bei Raumtemperatur mit Laserlicht der Wellenlänge $\lambda = 488 \text{ nm}$ angeregt und die abgestrahlte Fluoreszenz nach Passage einer Lochblende mit $31,3 \mu\text{m}$ Durchmesser mit einem Bandpass-Emissionsfilter für $525/50 \text{ nm}$ detektiert. Es wurden 190 übereinanderliegende optische Schnitte im Abstand von je $0,1 \mu\text{m}$ aufgenommen, von denen jede Aufnahme des abgetasteten Probenbereichs eine Auflösung von 512×512 Pixeln bei einer optischen Auflösung von $0,01 \mu\text{m}$ hatte.

4.7. Analytik mittels Flüssigchromatographie

Alle Syntheseprodukte, Extrakte aus Enzyminkubationen und Aufreinigungen für weitergehende instrumentelle Analysen wurden mit Hilfe der Flüssigchromatographie (*engl. high performance liquid chromatography*, HPLC) untersucht. Zur Verfügung standen dazu Agilents 1260 Infinity Quaternary LC System und eine VWR LaChrom Elite-Anlage (siehe 3.1).

Bei der HPLC wurden Substanzgemische durch Adsorption an einer stationären C_{18} -Umkehrphase (RP-Säule) aufgetrennt. Aufgrund variierender Hydrophilie/Lipophilie gingen einzelne Komponenten unterschiedlich starke Wechselwirkungen mit der stationären Phase ein und wurden – abhängig von der Elutionskraft des verwendeten Fließmittels – zeitversetzt eluiert. Die Fließmittel-Komponenten, die zur Gradienten-Elution verwendet wurden, waren Methanol und dH_2O (angesäuert mit $80 \mu\text{l/l}$ Ameisensäure), die in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen die Analyten von der Trennsäule wuschen. Detektiert wurde mittels Dioden-Array-Detektor im kurzwelligen UV-Bereich.

4.7.1. Verwendete Fließmittel-Systeme

Vorgegeben durch das Adsorptionsverhalten und die Polarität der aufzutrennenden Substanzen, wurden für die HPLC-Läufe unterschiedliche Methoden verwendet. Die jeweilige Zusammensetzung und der zeitliche Ablauf der Fließmittelgradienten wurden ausgehend von den untersuchten Substanzgruppen gewählt sowie optimiert und sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 4.16 Unterschiedliche HPLC-Methoden zur Analyse von Einzelstoffen und Stoffgemischen

HPLC-Methode 1			HPLC-Methode 2			HPLC-Methode 3		
Zeit [min]	Methanol [%]	dH_2O [%]	Zeit [min]	Methanol [%]	dH_2O [%]	Zeit [min]	Methanol [%]	dH_2O [%]
0–5	50–75	50–25	0–5	40–70	60–30	0–5	40–70	60–30
5–10	75–90	25–10	5–15	70–90	30–10	5–10	70–92	30–8
10–11	90–95	10–5	15–25	90–95	10–5	10–25	92–95	8–5
11–15	95	5	25–30	95	5	25–30	95–40	5–60
15–16	95–50	5–50	30–35	95–40	5–60	30–35	40	60
16–20	50	50						

4.7.2. Semipräparative Isolierung von 1,3,6,7-TH8PX

Besonders reines 1,3,6,7-TH8PX für die NMR-Analytik (siehe 4.9) wurde aus einer im großen Maßstab angesetzten Enzym-Inkubation (siehe 4.5.5.2) von „HcPT“ mit den Substraten 1,3,6,7-THX und DMAPP mittels HPLC-Aufreinigung gewonnen. Dazu wurde der nach Extraktion und vollständiger Trocknung erhaltene



Rückstand in 2 ml Methanol gelöst. In Injektionen von je 50–100 µl wurde die gesamte methanolische Untersuchungslösung auf die Agilent-HPLC (siehe 3.1) geladen und nach HPLC-Methode 1 aufgetrennt. Dabei wurde jeweils der Peak von 1,3,6,7-TH8PX, der ca. bei $R_t = 12,5$ min in den Chromatogrammen erschien, nach der Detektor-Passage aufgefangen. Die vereinten Peaks wurden im Kaltluftstrom zur Trockne gebracht, lyophilisiert und der blassgelbe Rückstand zur MS- (siehe 4.8) und NMR-Analyse eingesetzt.

4.8. Analytik mittels Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Untersuchungen wurden von DR. TILL BEUERLE (Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig) durchgeführt und die Ergebnisse mit seiner freundlichen Unterstützung ausgewertet. Rein massenspektrometrisch zu analysierende Proben wurden unter Verwendung einer systemintegrierten Hamilton Spritzen-Pumpe (5 µl/min) direkt in die Elektrospray-Ionenquelle (ESI, Turbo V) eines Quadrupol-Massenspektrometers 3200 Q Trap LC/MS/MS System (siehe 3.1) geladen. Die verwendeten Methoden wurden durch erfahrungsbasierte Veränderungen an den Geräte- und Messparametern entwickelt und optimiert (Tabelle 4.17). Für potentielle Produktsignale stand die Möglichkeit der weiteren Fragmentierung von Molekül-Ionen mittels MS/MS zur Verfügung (EPI-Modus). Zur Auswertung wurde die Analyst Software 1.6.2 genutzt.

Tabelle 4.17 Einstellungen für die MS-Analytik

Einstellungen	Proben						
	DMAPP (4.2.1)	PIBP (4.2.2)	1,3,7-THX (4.2.3)	1,3,6,7-THX (4.2.3)	Patulon (5.6.3.3)	1,3,6,7- TH8PX (5.6.3.1)	Geranyl- PIBP (5.6.7)
Ionisierungsmodus	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ
Quellenspannung	-4,5 kV	-4,5 kV	-4,5 kV	-4,5 kV	-4,5 kV	5,5 kV	-4,5 kV
Declustering-Potential	-20,00 V	-20,00 V	-20,00 V	-20,00 V	-20,00 V	20,00 V	-20,00 V
Curtain-Gas	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Gas 1	10,00	10,00	10,00	14,00	10,00	14,00	14,00
Gas 2	0	0	0	0	0	0	0
Inertgas zur Kollision	N ₂	N ₂	N ₂	N ₂	N ₂	N ₂	N ₂
Kollisionsenergie	-10,00 V	-10,00 V	-30,00 V	-10,00 V	-10,00 V	10,00 V	-42,00 V

4.9. Analytik mittels Kernspinresonanzspektroskopie

Untersuchungen zur Strukturaufklärung wurden mittels Kernspinresonanzspektroskopie (*engl.* nuclear magnetic resonance, NMR) von PROF. DR. LUDGER ERNST (Zentrales Labor für Kernresonanzspektroskopie, TU Braunschweig) durchgeführt und die Ergebnisse mit seiner freundlichen Unterstützung ausgewertet. Unter Verwendung eines Bruker Avance II 600 Kernspinresonanz-Spektrometers (siehe 3.1) wurden ¹H-NMR-Spektren des in PT-Aktivitätsassays gewonnenen, monoprenylierten 1,3,6,7-TH8PX und des zweifach prenylierten Xanthons Patulon aufgenommen. Beide Proben wurden zur Vermessung in deuteriertem Aceton (Aceton-d₆) gelöst und anschließend bei einer Protonen-Resonanzfrequenz von 600 MHz und einer Temperatur von 20 °C untersucht.



5 ERGEBNISSE

5.1. Chemische Synthesen

5.1.1. Synthese von Dimethylallyldiphosphat

Die Synthese von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) lieferte nach dem Extraktionsschritt ein Volumen von ca. 10 ml Untersuchungslösung, welche mittels Säulenchromatographie an Cellulose fraktioniert wurde (siehe 4.2.1). Die Kontrolle der gesammelten Einzelfractionen auf phosphathaltige Komponenten mit der Dünnschichtchromatographie (DC) fiel positiv aus bei den Fraktionen 33–39 (R_f -Wert 0,95) und 87–135 (R_f -Wert 0,25). Dabei wurde das DMAPP anhand des R_f -Wertes in den Fraktionen 87–135 vermutet, da das gesuchte Produkt aufgrund einer höheren Hydrophilie im Vergleich zum Geranyldiphosphat (GPP) aus der Original-Vorschrift^[226] unterhalb eines R_f -Wertes von 0,35 erwartet wurde. Durch Abziehen der Lösemittel und

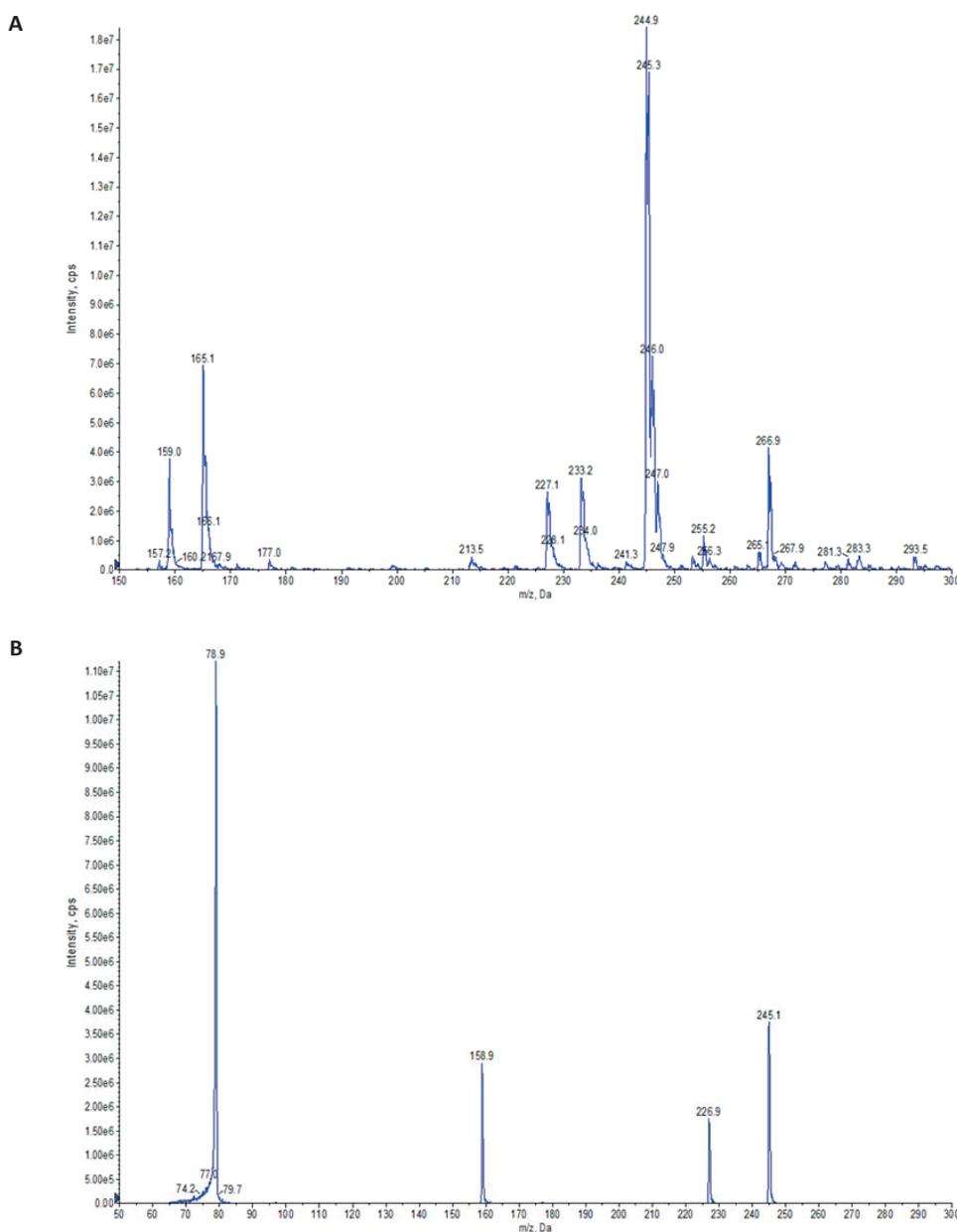


Abbildung 5.1 MS-Analyse des DMAPP-Syntheseproduktes. **A:** Massenspektrum (EMS ESI neg) von DMAPP. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI neg) der Fragmentierung des DMAPP-Signals ($m/z = 245,1$)

Lyophilisierung wurde ein beige-weißer Feststoff erhalten, der massenspektrometrisch analysiert wurde (siehe 4.8). Bei der Vermessung des Produktes DMAPP ($M = 246,09 \text{ g/mol}$) wurde bei einem Signal von $m/z = 244,9$ das erwartete Molekül-Ion $[M-H]^-$ gefunden und durch MS/MS-Kopplung weiter in kleinere Fragment-Ionen aufgespalten (Abbildung 5.1), die mit ihren Massen 78,9 / 158,9 / 226,9 dem bekannten Fragmentierungsmuster von DMAPP entsprachen^[267].

5.1.2. Synthese von Phlorisobutyrophenon

Nachdem auf den Übersichts-DC-Platten – parallel mit fortlaufender Reaktionszeit entwickelt – keine Zunahme an Phlorisobutyrophenon (PIBP; R_f -Wert 0,35; rot-violette Fluoreszenz bei UV_{254}) in der Reaktionsmischung mehr festzustellen war, wurde die Synthese gestoppt und der Ansatz anschließend extrahiert und aufkonzentriert. Weil neben dem gesuchten, monoacylierten Syntheseprodukt auch mehrfach-acylierte Substanzen auftraten, wurde die erhaltene gelb-gefärbte Untersuchungslösung (ca. 3 ml) anschließend mittels Kieselgel-Säulenchromatographie in 100 Fraktionen aufgetrennt. Als mit dem zuerst verwendeten Fließmittel auch nach 500 ml Durchlauf keine Produkte eluiert werden konnten, wurde zu einer polareren mobilen Phase übergegangen. Nachdem tri- und diacylierte Nebenprodukte zuerst nach dem Wechsel von der Säule gewaschen wurden, fand sich PIBP in den Fraktionen 19–45, was die DC-Kontrolle der gesammelten Einzelfraktionen bestätigte (R_f -Wert 0,64). Durch Abziehen der mobilen Phase und Lyophilisierung wurde das gereinigte, ölige und gelbliche Reaktionsprodukt erhalten. Mittels HPLC (siehe 4.7) wurde das PIBP weiter analysiert und bei einer Retentionszeit (R_t) von ca. 7,2 min und der Wellenlänge des Absorptionsmaximums von 286 nm detektiert (Abbildung 5.2).

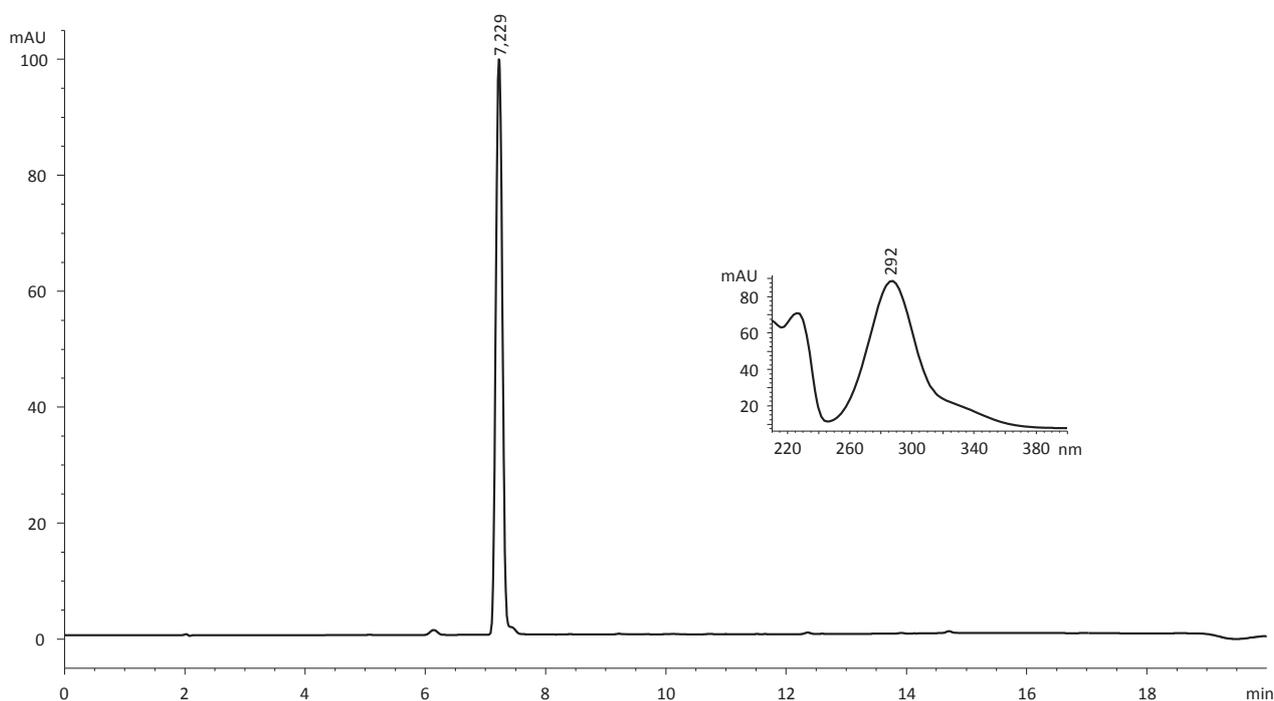


Abbildung 5.2 HPLC-Chromatogramm von synthetisiertem PIBP. HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 286 \text{ nm}$. Insert: UV-Spektrum

Zusätzlich wurde zur endgültigen Identifizierung ein Massenspektrum (siehe 4.8; Abbildung 5.3) von PIBP ($M = 196,07 \text{ g/mol}$) aufgenommen, welches bei einem Signal von $m/z = 194,9$ das erwartete Produkt-Molekül-Ion $[M-H]^-$ zeigte, und auch die weitere Fragmentierung durch MS/MS-Kopplung spaltete das Produkt in ein bereits publiziertes Muster weiter auf^[268]. Als Abgleich dienen zusätzlich die experimentell ermittelten Daten einer alternativen PIBP-Probe, die zuvor bereits in unserer Arbeitsgruppe (AG) synthetisiert wurde^[149].

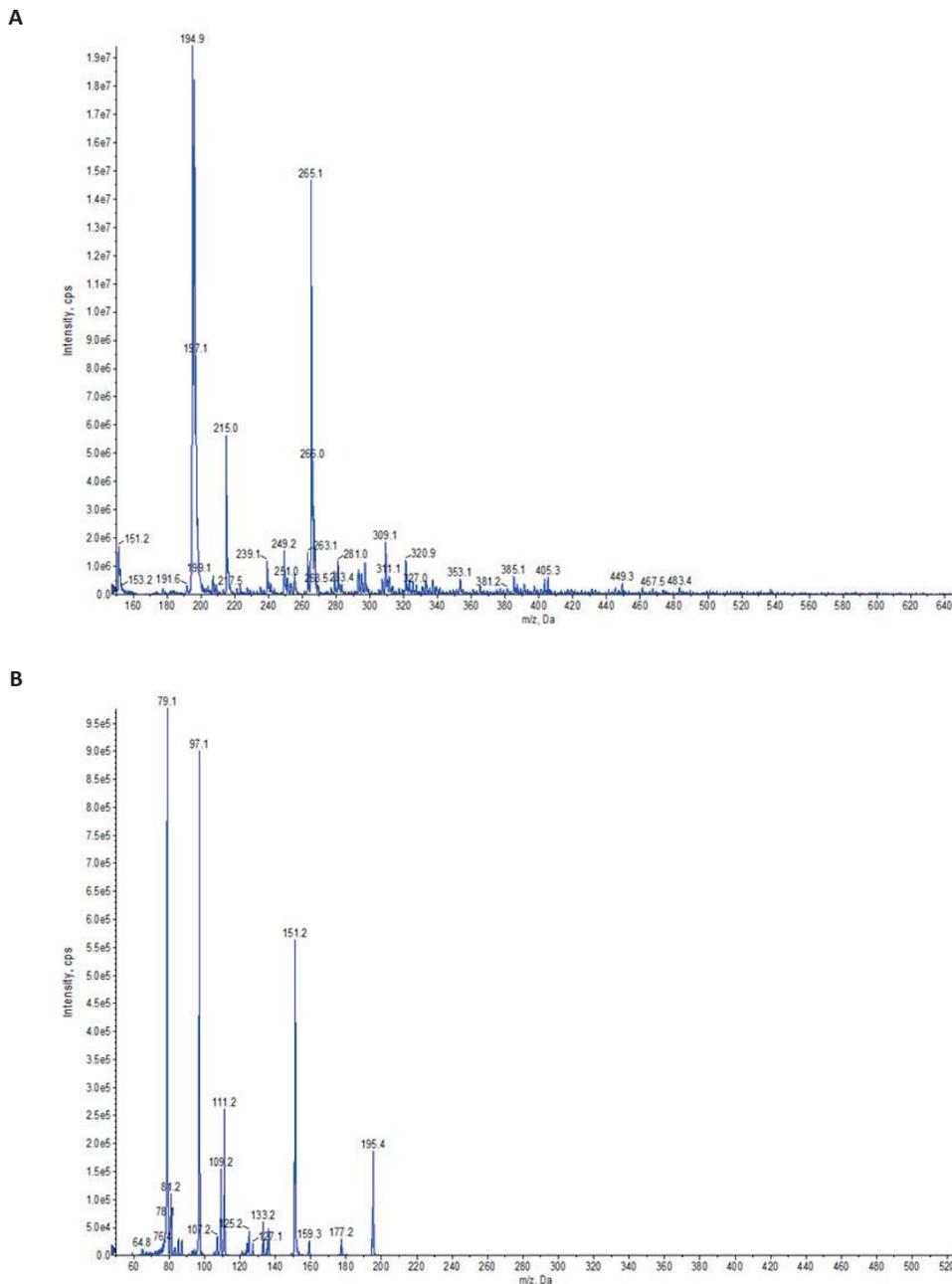


Abbildung 5.3 MS-Analyse des PIBP-Syntheseproduktes. **A:** Massenspektrum (EMS ESI neg) von PIBP. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI neg) der Fragmentierung des PIBP-Signals ($m/z = 195,4$)

5.1.3. Synthese von 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon

Weil für eine rein chemische Einzschritt-Synthese nach Protokoll der Original-Vorschrift^[228] das benötigte Substrat 2,4,5-Trihydroxybenzoesäure nicht verfügbar war, wurde der hier beschriebene, aufwändigere Ansatz einer Zwei-Schritt-Synthese gewählt.

Die DC-Kontrolle nach 1 h Reaktionszeit zeigte kaum noch detektierbare Banden auf Höhe der Phloroglucin- und 2,5-Dihydroxybenzoesäure-Referenzen, jedoch einen deutlichen Fleck auf Höhe der 1,3,7-Trihydroxyxanthon (1,3,7-THX)-Referenz (R_f -Wert 0,32; violette Fluoreszenz bei UV_{254}). Deshalb wurde von einer nahezu vollständig abgelaufenen Reaktion ausgegangen. Die nach dem Stoppen der Synthese extrahierte, konzentrierte Untersuchungslösung von ca. 3 ml wurde anschließend mittels Kieselgel-Säulenchromatographie fraktioniert. Durch die verwendete Gradienten-Elution konnten Nebenprodukte aus dem Reaktionsansatz größtenteils abgetrennt werden, so dass in den Fraktionen 90–133 relativ reines 1,3,7-THX zu finden war, was die DC-Kontrolle der gesammelten Einfeldfraktionen bestätigte (R_f -Wert 0,33). Nach Abziehen der mobilen Phase und Lyophilisierung wurde das gelb-orange Zwischenprodukt zur Identifizierung per HPLC analysiert (siehe 4.7). Das Chromatogramm zeigte einen Substanzpeak bei $R_t = 9,9$ min bei der Detektions-Wellenlänge von 254 nm (Abbildung 5.4). Ein Vergleich der Retentionszeit und des UV-Spektrums mit einem HPLC-Chromatogramm der authentischen Referenz-Substanz 1,3,7-THX identifizierte die extrahierte Substanz als das gesuchte Zwischenprodukt. Eine darüber hinaus durchgeführte massenspektrometrische Kontrolle (siehe 4.8) zeigte einen erwarteten Peak für das Molekül-Ion $[M-H]^-$ der Zwischenstufe bei $m/z = 242,9$ (Abbildung 5.5), was im Negativmodus der molaren Masse von 1,3,7-THX ($M = 244,04$ g/mol) zuzuordnen war und somit die Identität des Zwischenproduktes bestätigte.

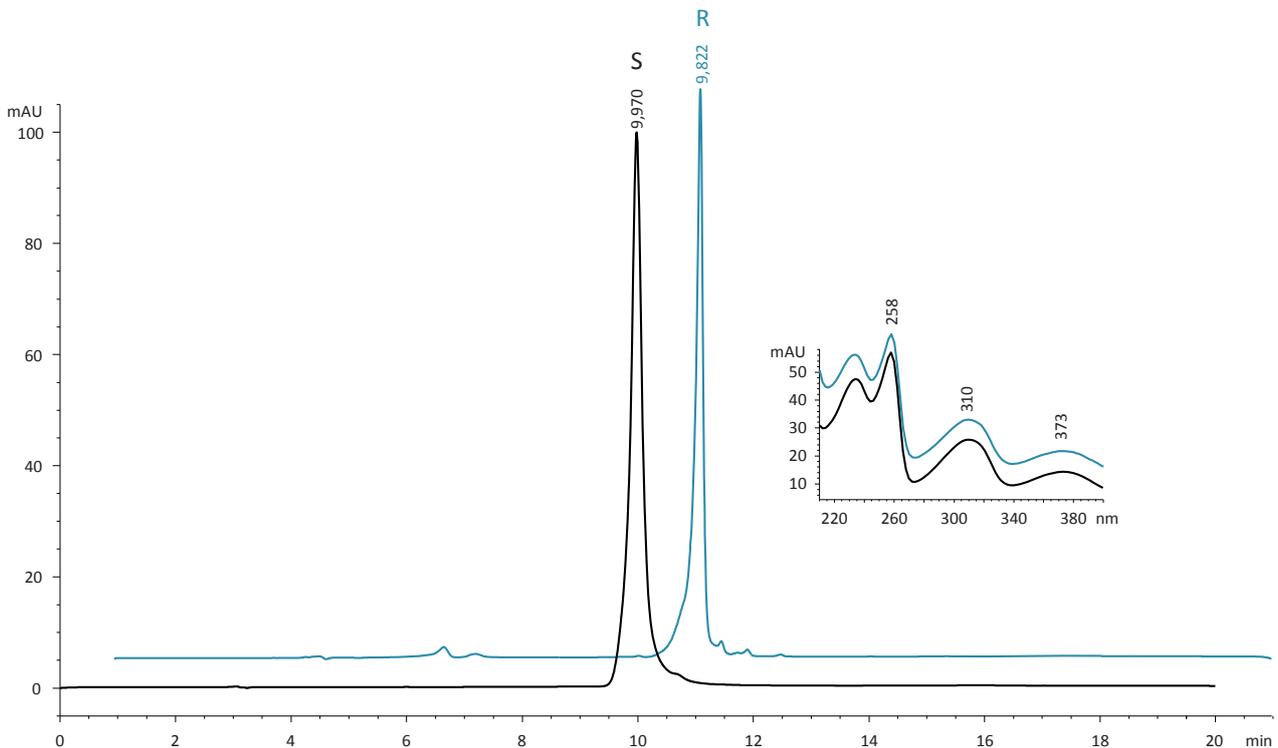


Abbildung 5.4 HPLC-Chromatogramm von synthetisiertem 1,3,7-THX. HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 254$ nm. R: Referenz; S: Syntheseprodukt

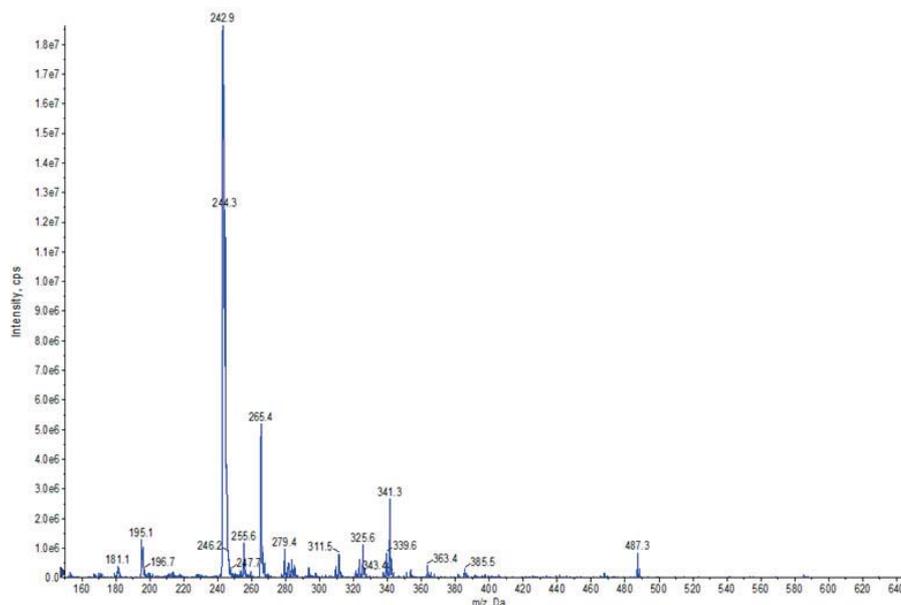


Abbildung 5.5 Massenspektrum (EMS ESI neg) des Synthese-Zwischenproduktes 1,3,7-THX

Erhaltenes 1,3,7-THX wurde anschließend zur weiteren Umwandlung in einem Fütterungsexperiment eingesetzt. Als Wirt für die enzymatische Modifizierung diente ein spezieller Hefestamm (*S. cerevisiae*) aus unserer AG, der mit einem Fremd-Gen zur Expression einer Xanthon 6-Hydroxylase – unter Kontrolle eines GAL-Promotors – ausgestattet war. Da Glucose im Reaktionsmedium die Induktion des GAL-Promotors durch den Elicitor Galactose unterdrückte, wurde erst nach positiver Abwesenheitskontrolle des Repressors die Genexpression gestartet und das 1,3,7-THX in die Hefe-Suspension gegeben. Aufgenommen von den Hefezellen und mit einer zusätzlichen Hydroxylgruppe an Position C–6 des Kohlenstoff-Grundgerüsts versehen, wurde das Reaktionsprodukt 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon (1,3,6,7-THX) wieder aus den Zellen ins Medium sekretiert und nach Ablauf der Inkubationszeit daraus extrahiert. Die ca. 3 ml der aufkonzentrierten, gelblichen Untersuchungslösung wurden aufgrund besseren Trennungsverhaltens der Reaktionsmischung auf einer lipophilen Kieselgel-Umkehrphase aufgetrennt und 1,3,6,7-THX wurde im UV-Licht detektiert (R_f -Wert 0,77; gelbe Fluoreszenz bei UV_{365}). Nach Abtrennung des Produktes vom Trägermaterial der stationären Phase und vollständiger Trocknung wurde ein blass-gelber Feststoff erhalten. Dessen Identität als 1,3,6,7-THX ($M = 260,03$ g/mol) wurde durch Aufnahme eines Massenspektrums (siehe 4.8) festgestellt, welches bei einem Signal von $m/z = 259,3$ das erwartete Molekül-Ion $[M-H]^-$ zeigte sowie in der weitergehenden Fragmentierung durch gekoppelte MS/MS einem in der Datenbank unserer AG hinterlegten Aufspaltungsmuster der Referenzsubstanz ähnelte (Abbildung 5.6). Bestätigt wurde die Identifizierung durch eine HPLC-Untersuchung (Abbildung 5.7) des Syntheseproduktes im Vergleich mit dem HPLC-Chromatogramm und dem UV-Spektrum der authentischen Referenz-Substanz 1,3,6,7-THX ($R_t = 6,9$ min).

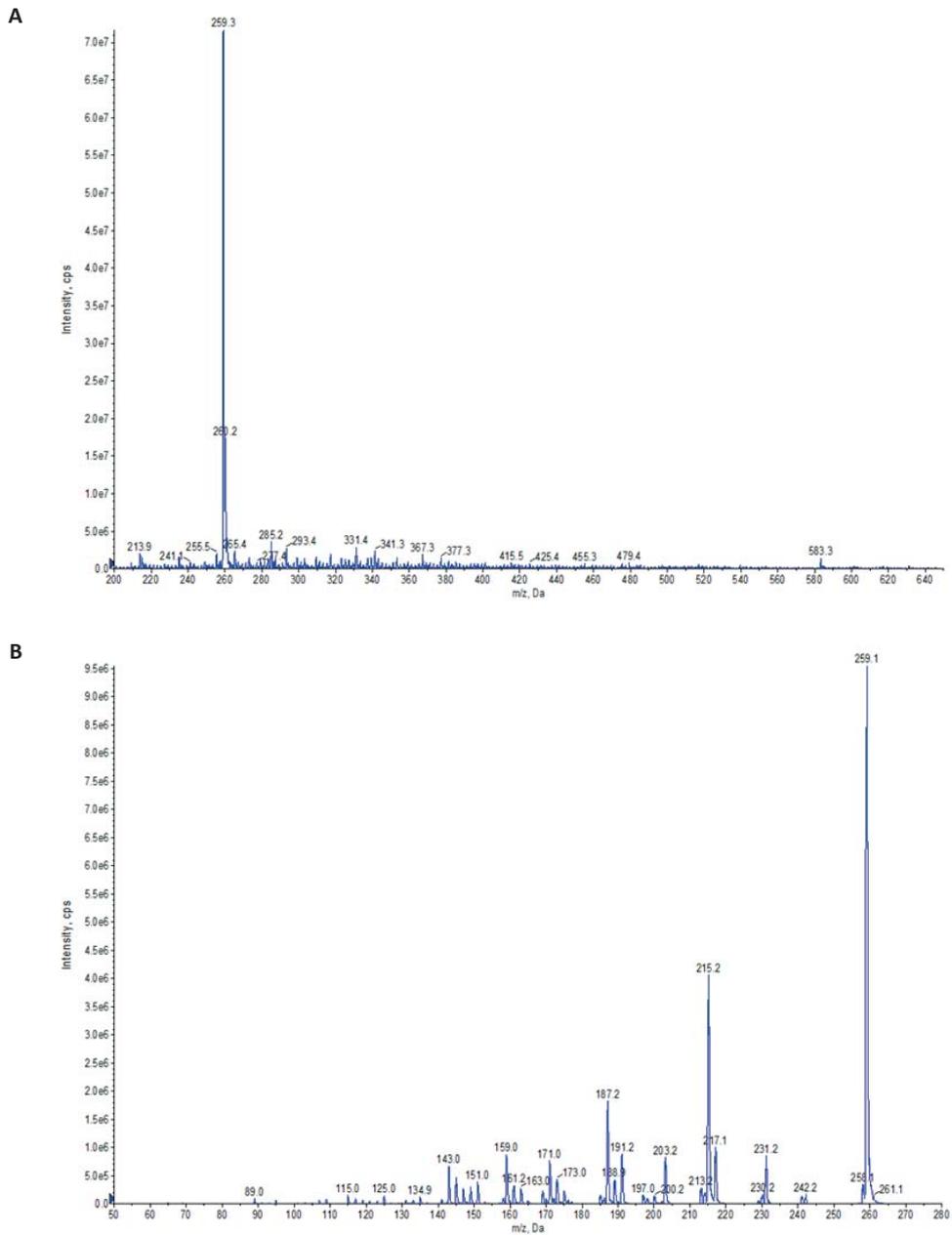


Abbildung 5.6 MS-Analyse des 1,3,6,7-THX-Syntheseproduktes. **A:** Massenspektrum (EMS ESI neg) von 1,3,6,7-THX. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI neg) der Fragmentierung des 1,3,6,7-THX-Signals ($m/z = 259,1$)

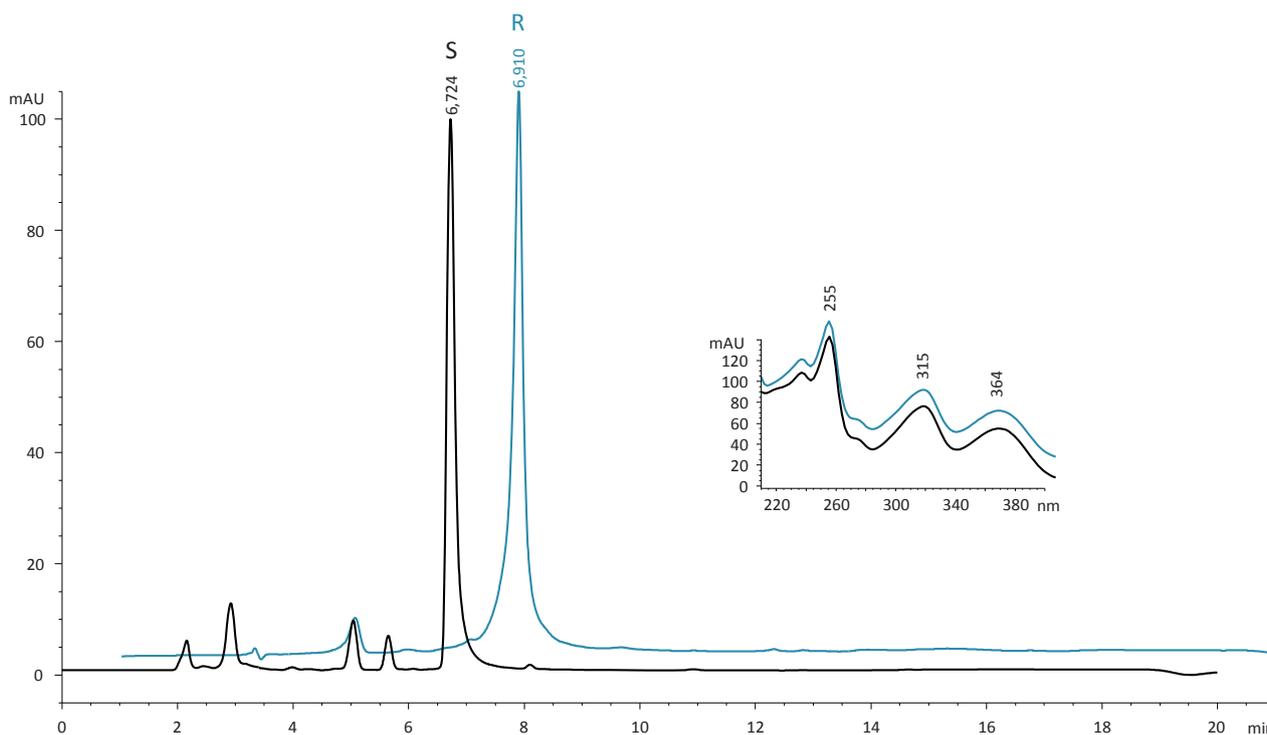


Abbildung 5.7 HPLC-Chromatogramm von synthetisiertem 1,3,6,7-THX. HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 254$ nm. Inset: UV-Spektren; R: Referenz; S: Syntheseprodukt

5.2. (Bioinformatische) Vorab-Charakterisierung von Prenyltransferase-Genen

Um Zugang zu möglichen Prenyltransferase (PT)-Sequenzen aus Johanniskraut zu erhalten, dienten Datenbanken von *Hypericum*-Arten als Quelle, die anhand weniger bekannter PT-cDNAs durchsucht wurden (siehe 4.3.1). Der erhaltene Sequenzkatalog wurde bioinformatisch mit verschiedenen Online-Tools (siehe 3.9) aufgearbeitet, um theoretische Vorhersagen über den Aufbau und die Länge von PT-Sequenzen, die Enzymfamilien-spezifischen Regionen, die abgeleiteten Proteinstrukturen und deren intrazelluläre Lokalisation usw. treffen zu können. Die Notwendigkeit dieser computergestützten Analyse ergab sich immer jeweils vor dem Start und nach Beendigung der Klonierungsarbeiten eines betrachteten Gens, um es als vollständige Sequenz einer aromatischen Sekundärstoffwechsel-PT (AS-PT) zu identifizieren, mögliche Gen-Mutationen oder Polymorphismen zu erkennen und anhand prognostizierter Protein-Eigenschaften u.a. die Auswahl der benötigten Expressionsparameter abschätzen zu können.

5.2.1. Überlassene Prenyltransferase-Sequenzen aus vorherigen Arbeiten

Wie bereits in einer früheren Dissertation aus unserer AG beschrieben^[220], wurde eine subtraktive cDNA-Datenbank aus *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen konstruiert. Etwa 800 der erhaltenen Sequenzen wurden mittels NCBI-BLAST-Analyse ausgewertet. Dabei entdeckte MÜLLER^[220] in den Sequenzdaten die drei cDNA-Fragmente „Contig 88, 290 und 339“, die Sequenzähnlichkeiten zu bereits veröffentlichten AS-PT-cDNAs zeigten, und untersuchte diese näher in seiner Arbeit. Mit Hilfe der RACE-Technik (siehe 4.3.4.2; 4.3.5.4) gelang es ihm, aus zwei Fragmenten den jeweils vollständigen offenen Leserahmen zu gewinnen – „Contig 290(HcPT-2)“ mit einer Sequenzlänge von 1.137 bp und „Contig 339(HcPT-3)“ mit einer 1.191 bp langen kodierenden Sequenz (*engl. coding sequence*, CDS). Das dritte partielle PT-Gen konnte bis zum 3'-Ende und in Richtung 5'-Ende verlängert werden, so dass die cDNA „Contig 88(HcPT-1)“ mit einer

Länge von 1.273 bp erhalten wurde. Darüber hinaus extrahierte MÜLLER^[220] aus dem online zugänglichen Johanniskraut-Transkriptom MPGR (siehe 4.3.1)^[231,232] die 1.158 bp messende Volllänge-cDNA „HpPT-470“, die vom Transkript „hpa_locus_470_iso_1_len_1384_ver_2“ abgeleitet und erarbeitet wurde.

5.2.2. Prenyltransferase-Sequenzen aus vier analysierten *H. perforatum*-Transkriptomen

Die erste Suche innerhalb eines vorläufigen, nicht veröffentlichten Transkriptoms von *H. perforatum* am IPK Gatersleben lieferte 14 nützliche cDNA-Treffer (Tabelle 5.1), aus denen nach Sequenzvergleich und Ausdünnen die drei neuen Kandidaten „IPK_Contig2633, 7200 und 18827“ resultierten. Zwei der drei Treffer zeigten nach Übersetzung in die Aminosäuren-Abfolge (ExpASY Translate; siehe 3.9) jeweils eine vollständige, 390 Aminosäuren (aa) lange Proteinsequenz, und der dritte Treffer war ein 420 bp langes cDNA-Fragment, das nach Übersetzung ein wahrscheinliches PT-Fragment inkl. des C-Terminus darstellte. Da diese ersten Ergebnisse auf einer noch nicht ausgereiften Transkriptom-Version basierten, wurden diese drei cDNAs nicht direkt molekularbiologisch bearbeitet, sondern sie wurden zur Kontrolle neben „HpPT-1“ und „HIPT-1“ als Abfragen in einer weiteren cDNA-Suche im MPGR-Transkriptom herangezogen.

Tabelle 5.1 Trefferliste der cDNA-Suche in einem vorläufigen *H. perforatum*-Transkriptom des IPK Gatersleben

Nr.	Sequenz-ID	Länge [bp]	Nr.	Sequenz-ID	Länge [bp]
1	IPK_Contig552	536	8	IPK_Contig4531	364
2	IPK_Contig706	506	9	IPK_Contig7200	420
3	IPK_Contig1159	896	10	IPK_Contig7583	479
4	IPK_Contig1295	901	11	IPK_Contig11928	434
5	IPK_Contig2633	1.346	12	IPK_Contig11954	513
6	IPK_Contig2919	1.242	13	IPK_Contig13353	409
7	IPK_Contig4016	785	14	IPK_Contig18827	1.252

Die erste Untersuchung des MPGR-Transkriptoms (zweite Stufe) zielte auf Transkripte ab, die sich durch hohe Expression in Hyperforin-reichen Geweben^[132] auszeichneten. Neben einer Vielzahl von cDNA-Fragmenten, die keine so hohen FPKM-Werte in diesen Gewebetypen aufwiesen, lieferte die Suchanfrage aber als mögliche PT-Gene die Transkripte „hpa_locus_4472, 8393 und 9259“, die im Folgenden näher molekularbiologisch und biochemisch untersucht wurden. Die cDNA „hpa_locus_4472“ umfasste eine 1.390 bp lange Sequenz ohne zusammenhängenden ORF, die jedoch übersetzt in ihre zugehörige Aminosäure-Sequenz in zwei unterschiedlichen Leserastern jeweils PT-ähnliche Protein-Merkmale aufwies. Bei der cDNA „hpa_locus_8393“ verhielt es sich ähnlich, d.h. auch hier fanden sich innerhalb der 1.587 bp messenden Sequenz nach Überführung auf die Protein-Ebene in unterschiedlichen Leserastern das 5'- und das 3'-Ende. Das 1.275 bp lange Transkript „hpa_locus_9259“ enthielt direkt einen vollständigen ORF, der für ein 391 aa langes Protein codierte. Zusätzliche Ergebnisse aus der alleinigen MPGR-Analyse wurden nicht weiterverfolgt, sondern später bei der Vergleichsanalyse aller vier betrachteten Datenbanken wieder aufgenommen und berücksichtigt. Die dritte Stufe der Transkriptom-Analyse sah vor, mit einer umfassenderen Anfrage verfügbarer PT-Sequenzen die unterschiedlichen Datenbanken zu durchsuchen und neu gewonnene Informationen miteinander zu verknüpfen. Der somit nach eigenen Vorstellungen und Grenzwerten (siehe 4.3.1) erstellte Sequenzkatalog der einzelnen BLAST-Analysen, von dem bereits die Hits vorheriger Analysen subtrahiert wurden, umfasste insgesamt 91 neue cDNAs, die das Anforderungsprofil der Suche erfüllten. Die im Anschluss daran durchgeführte Detail-Analyse, bei der von mehrfach auftretenden cDNA-Sequenzen unter Bewahrung der längsten, durchgehenden Sequenz alle kürzeren Fragmente aussortiert wurden, schränkte die Anzahl an verbleibenden möglichen PT-Sequenzen auf letztlich 50 Stück ein. In der Aufarbeitung dieser



cDNA-Sammlung konnten vier Volllänge-Sequenzen ermittelt werden, die jeweils für ein ganzes Protein zu codieren schienen und daher durch Klonierungen und Expressionsanalysen untersucht wurden. Dabei beinhalteten sowohl das 1.317 bp lange Fragment „scaffold-BNDE-2095043“ als auch das 1.285 bp zählende Transkript „scaffold-BNDE-2013053“ jeweils schon eine zusammenhängende Proteinsequenz (408 aa bzw. 389 aa). Durch das 1:1-Alignment der verbleibenden cDNAs konnten zwei zusätzliche komplette ORFs vorhergesagt werden: „Contig10745“, eine 3.031 bp messende Sequenz ohne N-Terminus auf Protein-Ebene, und „ctg038903“, ein 209 bp kurzes Fragment ohne C-Terminus der übersetzten Sequenz, ließen sich zu einem 1.236 bp umfassenden ORF zusammensetzen. Ebenso war es möglich, die beiden einzelnen Hälften „hpa_locus_15746“ (954 bp) und „Singlet16042“ (894 bp) zu einem ORF zusammenzufügen, so dass ein weiteres vollständiges Protein von 390 aa Länge entstand.

Übrige Ergebnisse aus dieser Datenbanken-Aufarbeitung (u.a. der ORF in „ctg015370“ oder der modellierte ORF aus „hpa_locus_19471“ und „Contig31764“) wurden Mitarbeitern unserer AG für ihre Untersuchungen zur Verfügung gestellt bzw. ihre Bearbeitung steht noch aus.

Tabelle 5.2 Ergebnisliste der PT-Sequenz-Suche vor und nach kombinatorischem Transkriptom-Vergleich

Transkriptom	MPGR		PhytoMetaSyn		ViroBLAST		1KP	
unbearbeitete Trefferanzahl	22		27		24		18	
bearbeitete Trefferanzahl	17		17		9		7	
Sequenz-ID-Präfix	hpa_locus_...		Contig... / Singlet...		ctg...		scaffold-BNDE-...	
Sequenz-ID / Länge [bp]	7061	1.511	3219	737	002826	653	2013053	1.285
↓	7698	1.113	5006	899	004687	471	2013054	898
	11003	1.685	7565	883	015370	1.458	2025847	1.201
	13215	1.655	7692	1.265	017913	1.381	2026449	1.621
	14629	1.187	8200	1.388	023071	435	2093759	709
	15746	954	10400	1.532	023573	594	2094897	1.177
	16995	1.473	10288	699	034373	231	2095043	1.317
	19471	1.666	10745	3.031	038903	209		
	22705	322	16042	894	044722	406		
	23792	417	19652	1.327				
	25379	804	20723	748				
	27262	560	21822	951				
	29268	823	26945	1.289				
	39283	1.173	31764	1.381				
	47111	317	69228	1.404				
	60291	741	78575	1.384				
	78275	791	98332	1.385				

5.2.3. Pflanzliche aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen: Aufbau und Eigenschaften

5.2.3.1. Generelle Proteinstruktur der AS-PTs aus Johanniskraut

Nach Übersetzen der PT-Gene aus Johanniskraut in die jeweils codierte Aminosäure-Sequenz (ExpASY Translate; siehe 3.9) wurden Informationen über den grundlegenden Aufbau von pflanzlichen aromatischen Prenyltransferasen^[162], die an Reaktionen des Sekundärstoffwechsels (siehe 1.1) beteiligt sind, anhand von Protein-Sequenzvergleichen untereinander und in Bezug auf die AS-PT „HIPT-1“ gewonnen (Alignments mit

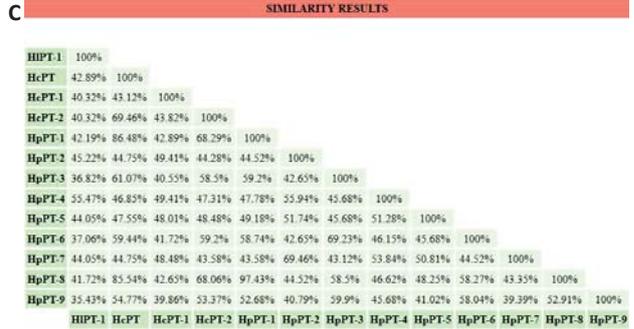
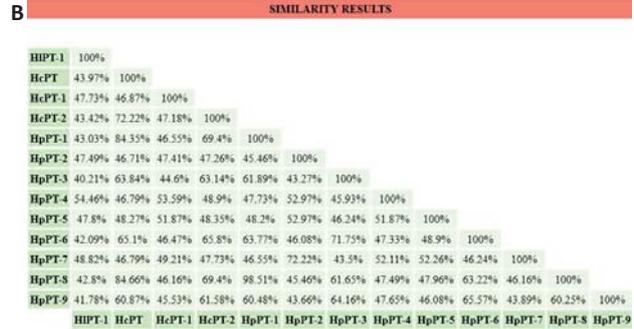
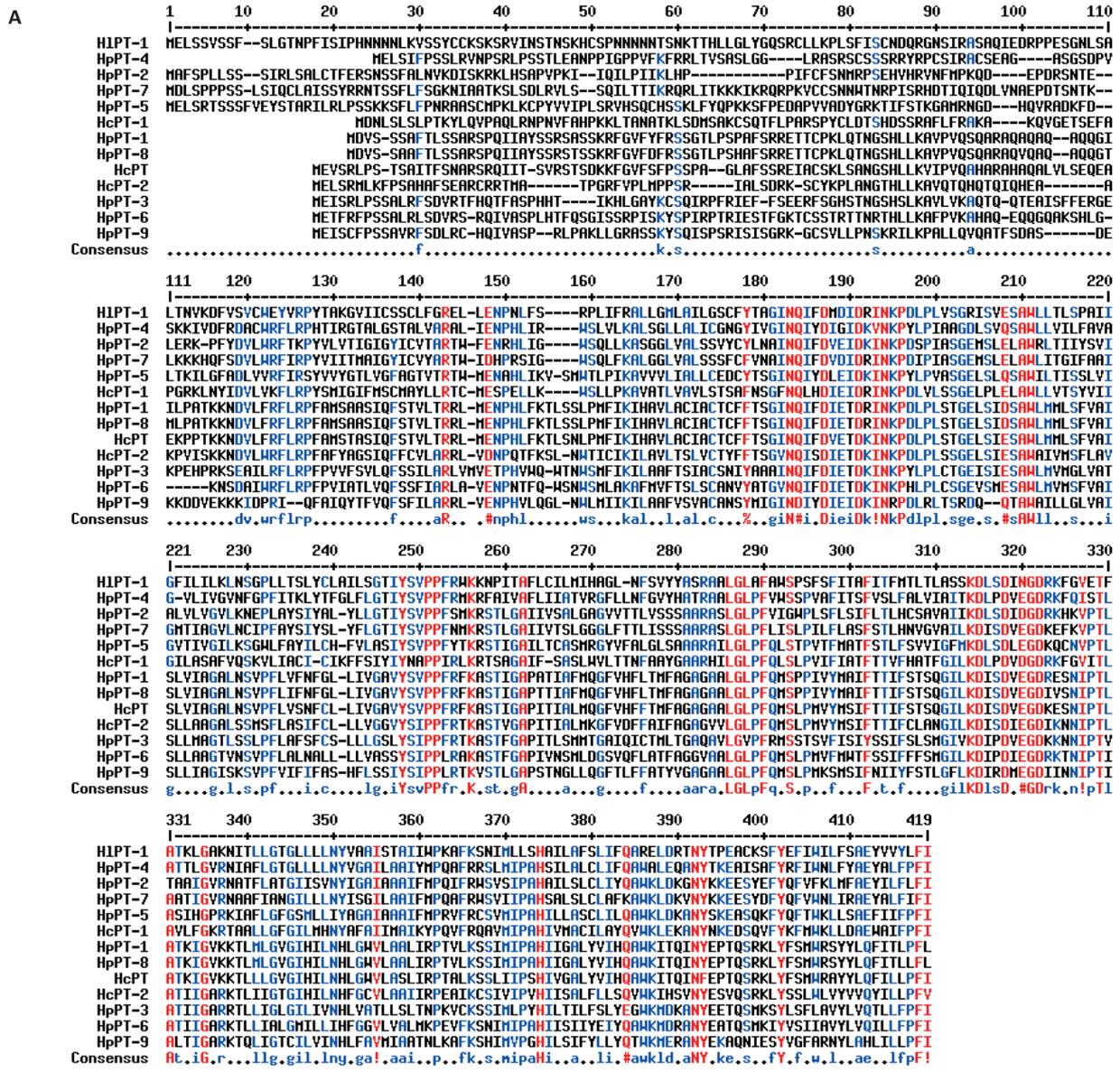


Abbildung 5.8 Sequenzvergleich klonierter/übernommener PTs aus Johanniskraut mit HIPT-1. **A:** Alignment der Aminosäure-Sequenzen. Rot: hochkonservierte Aminosäuren; blau: semikonservierte Aminosäuren. **B:** Ähnlichkeits-Abgleich auf Gen-Ebene. **C:** Ähnlichkeits-Abgleich auf Protein-Ebene

MultAlin; siehe 3.9). Diese PT, die im Echten Hopfen (*Humulus lupulus* L.) entdeckt wurde^[152,238], fungierte aufgrund der von ihr katalysierten Reaktion – die Verknüpfung des acylierten Phloroglucin-Derivates Phlorisovalerophenon (PIPV, 3-Methyl-1-(2,4,6-trihydroxyphenyl)-butan-1-on) mit DMAPP – als Modell-Sequenz.



Ihre Funktion in der Biosynthese von Hopfenbitterstoffen ist nämlich vergleichbar mit dem ersten Prenylierungsschritt in der prognostizierten Biosynthese von Hyperforin^[269], weshalb es nahe lag von katalytischer Ähnlichkeit (bezüglich Substrat/Reaktion) auf strukturelle Ähnlichkeit mit „HIPT-1“ zu schließen und daher nach wiederkehrenden Eigenschaften in vermutlichen Johanniskraut-PTs zu suchen. Dadurch wurde „HIPT-1“ für die Suche möglicher neuer PTs ein wichtiger Ausgangspunkt und eine sehr bedeutsame Referenz für alle folgenden Sequenzvergleiche (Abbildung 5.8).

Die Protein-Gesamtlänge der untersuchten PTs bewegte sich zwischen 380 aa beim kürzesten („HcPT-2“) und 411 aa beim längsten Enzym („HpPT-5“). Innerhalb der Aminosäure-Sequenzen waren zwei konservierte Aspartat-reiche Motive „NQxxDxxxD“ und „KDxxDxxGD“ zu finden – nach Abbildung 5.8 präziser als „N(Q/D)(I/L)xDxx(I/T)D“ sowie „KD(I/L)xDx(D/E)GD“ bezeichnet. Mit deren Hilfe war es möglich, die PT-Sequenzen in einen generellen Aufbau aus fünf strukturellen Teilstücken zu untergliedern: am N-Terminus eine in der Länge variable Sequenz von 144–175 aa, gefolgt von den beiden konservierten Motiven, getrennt durch einen 121 aa langen Abstandhalter (bei „HcPT-1“ 120 aa, bei „HpPT-9“ nur 119 aa), und abschließend ein in der Länge konservierter, 97 aa messender „Schwanz“ inklusive des C-Terminus (Abbildung 5.9). Trotz dieses recht homogenen Strukturaufbaus ergab ein genereller Identitätsabgleich (SIAS, siehe 3.9) der verglichenen PT-Sequenzen erwartungsgemäß nur durchschnittlich ca. 40–60% Übereinstimmung der AS-PTs untereinander^[163]. Eine Ausnahme waren „HcPT“ und „HpPT-1“ mit ca. 87%, „HcPT“ und „HpPT-8“ mit ca. 86% sowie „HpPT-1“ und „HpPT-8“ mit sogar ca. 98% (12 aa Unterschied, möglicherweise Isoformen) Ähnlichkeit zueinander (Abbildung 5.8).



Gen	Pflanzen-Art	PT-Länge [aa]	N-Terminus [aa]	Pos. 1. Motiv [aa]	Verbindung [aa]	Pos. 2. Motiv [aa]	C-Terminus [aa]	Molekulgewicht [kDa]
HIPT-1	<i>H. lupulus</i>	411	175	176–184	121	306–314	97	45,481
HcPT	<i>H. calycinum</i>	396	160	161–169	121	291–299	97	43,498
HcPT-1	–“–	386	151	152–160	120	281–289	97	43,185
HcPT-2	–“–	380	144	145–153	121	275–283	97	41,927
HpPT-1	<i>H. perforatum</i>	393	157	158–166	121	288–296	97	43,180
HpPT-2	–“–	391	155	156–164	121	286–294	97	43,658
HpPT-3	–“–	394	158	159–167	121	289–297	97	43,913
HpPT-4	–“–	381	145	146–154	121	276–284	97	41,784
HpPT-5	–“–	411	175	176–184	121	306–314	97	45,547
HpPT-6	–“–	391	155	156–164	121	286–294	97	43,222
HpPT-7	–“–	408	172	173–181	121	303–311	97	45,420
HpPT-8	–“–	393	157	158–166	121	288–296	97	43,207
HpPT-9	–“–	385	151	152–160	119	280–288	97	42,876

Abbildung 5.9 Grundlegender, 5-geteilter Protein-Aufbau der PTs aus Johanniskraut-Arten (oben) sowie (Molekül-)Eigenschaften ihrer Primärstruktur (unten). Molekülmasse berechnet mit ExPASy ProtParam (3.9)

5.2.3.2. Vorhergesagte Struktur-Charakteristika von AS-PTs aus Johanniskraut

Nachdem die Primärstruktur der PTs untersucht wurde, folgten weitere Analysen und Vorhersagen über das wahrscheinliche Verhalten der Proteine *in vivo*. Neben den bereits zuvor behandelten Aspartat-reichen Motiven weisen die Aminosäure-Sequenzen pflanzlicher AS-PTs noch zwei weitere typische Eigenschaften auf^[238]. Zum einen haben sie mehrere Biomembran-durchspannende α -Helices (**Transmembran- α -Helices**, TMHs) und zum anderen ein N-terminales Transitpeptid (TP) zur Direktion der Proteine an ihren Bestimmungsort innerhalb der Zelle. Zur Prognose wurden die PTs deshalb mit unterschiedlicher Software analysiert und die Ergebnisse zusammengefasst (Tabelle 5.3).

Für die Suche nach hydrophoben Protein-Domänen und möglicher Membranständigkeit wurden diverse Vorhersage-Programme getestet^[270] und sich nach Abwägen für TMHMM^[271,272] sowie zum Abgleich für SOSUI^[273–275] entschieden (siehe 3.9). Beide Online-Tools lieferten die verlässlichsten – und dabei hauptsächlich harmonisierende – Ergebnisse und hatten zuvor bereits in anderen Publikationen von pflanzlichen AS-PTs^[u.a. 151,169,171,173] bevorzugt Anwendung gefunden. Bei der Bestimmung von Transmembrandomänen mit TMHMM lag bei einigen PTs die tatsächliche Anzahl sehr wahrscheinlich höher als es die erste ausgegebene Kalkulation ergab – gerade bei PTs mit kleinen Vorhersage-Werten. Diese Vermutung entstand aus einer zusätzlichen grafischen Ausgabe der TMHMM-Analyse, mit deren Zusatzinformationen zur möglichen Struktur weitere TMHs abgelesen werden konnten, die nur aufgrund des nicht editierbaren Schwellenwerts in der Berechnung nach dem „Alles-oder-nichts“-Prinzip nicht als Membrandomänen identifiziert wurden (Bsp. in Abbildung 5.10).

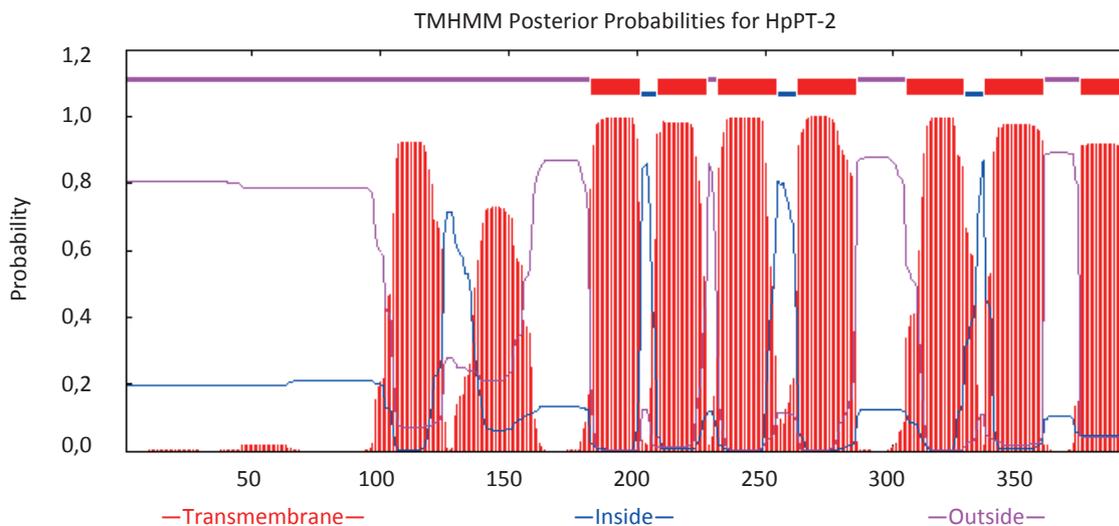


Abbildung 5.10 Berechnung von TMHs in der Proteinsequenz von HpPT-2 mit TMHMM. Vorhergesagt sind sieben TMHs, jedoch sind zwei weitere sehr wahrscheinlich vorhandene Membrandomänen zwischen den Aminosäure-Positionen 100–150 vorherzusehen: 7→9 TMHs

Alle untersuchten PT-Sequenzen zeigten in den Struktur-Berechnungen mindestens vier, maximal neun („HpPT-2“ mit SOSUI: 10) Transmembranregionen, die so gelegen waren, dass die beiden konservierten Aspartat-reichen Motive nicht in die Membran integriert waren (bzw. nur wenige Aminosäuren des ersten Motivs). Stattdessen befanden sie sich in sogenannten Loops – freiliegenden, schlaufenartigen Abschnitten der Proteinsequenz zwischen zwei TMHs. Die freie Platzierung der Motive, also außerhalb der Membran, sowie ihre Positionierung auf derselben Membran-Seite sind wichtige Voraussetzungen für die funktionelle Aktivität von AS-PTs. Da der Diphosphatrest über das 1. Motiv gebunden wird^[276,277] und das aromatische Substrat sich voraussichtlich am 2. Motiv^[176] anlagert, dürfen beide Reaktionsdomänen nicht unzugänglich oder gar durch die Membran räumlich voneinander getrennt in zwei unterschiedlichen Kompartimenten



positioniert sein. Die bioinformatisch gesammelten Daten über die vermutlichen TMHs der Johanniskraut-PTs, welche die Ergebnisse für „HcPT“, „HcPT-1“, „HcPT-2“ und „HpPT-9“ von MÜLLER^[220] bestätigten und im Einklang mit bisherigen Publikationen von pflanzlichen AS-PTs standen, deuteten unter Beachtung all dieser Aspekte stark auf das Vorliegen von AS-PTs des Johanniskrauts hin. Einzig die fehlplatzierten, beidseitig Membran-gerichteten Motive bei „HcPT“, „HpPT-3“, „HpPT-4“ und „HpPT-9“ entsprachen nicht dem erwarteten Schema, jedoch bleibt zu erwähnen, dass es sich nur um theoretische Berechnungen handelte und diese ausschließlich zum Abschätzen und Treffen einer Vorauswahl herangezogen wurden.

Tabelle 5.3 Vorhersagen zu Protein-Eigenschaften und dem Verhalten untersuchter PTs aus Johanniskraut. –: keine Aussage möglich; (): Länge des möglichen TP in Aminosäuren; / 1–9: TMH-Anzahl / Platzierung nach Korrektur; C: Chloroplasten; Lp: Loop; M: Mitochondrien; pl: isoelektrischer Punkt; TMH: transmembranäre α -Helix; TP: Transitpeptid. Verwendete Software: siehe 3.9

Gen-Name	pl <i>ProtParam</i>	TMH		TMHMM: Motiv-Platzierung		Subzelluläre Lokalisation (TP)		
		TMHMM	SOSUI	1. Motiv	2. Motiv	TargetP	ChloroP	iPSORT
HIPT-1	9,14	8	9	Lp 1	Lp 5	C (91)	C (91)	C
HcPT	9,71	4 / 6	6	TMH 1 & Lp 1	C-term. / Lp 4	C (54)	C (54)	M
HcPT-1	9,42	6 / 8	8	N-term. / Lp 2	Lp 4 / Lp 6	– (–)	C (16)	C
HcPT-2	9,52	9	7	Lp 2	Lp 6	M (24)	– (11)	M
HpPT-1	9,98	6 / 7	5	TMH 1 & Lp 1	Lp 5	C (71)	C (71)	M
HpPT-2	9,29	7 / 9	10 / 9	N-term. / Lp 2	Lp 4 / Lp 6	C (12)	– (12)	C
HpPT-3	9,24	8	6	Lp 2	Lp 5	M (26)	– (71)	M
HpPT-4	10,02	6 / 7	6	TMH 1 & Lp 1	Lp 4	C (65)	C (65)	C
HpPT-5	9,52	6 / 8	9	Lp 1	Lp 5	C (77)	C (77)	M
HpPT-6	9,78	6 / 8	8	N-term. / Lp 2	Lp 3 / Lp 5	C (75)	C (75)	M
HpPT-7	9,65	8	9	TMH 2 & Lp 2	Lp 6	C (25)	C (25)	C
HpPT-8	9,95	6 / 7	5	TMH 1 & Lp 1	Lp 5	C (71)	C (71)	M
HpPT-9	9,70	6 / 7	5	Lp 1 / Lp 2	Lp 4 / Lp 5	C (48)	C (48)	M

Die Abschätzung des isoelektrischen Punktes (pl) der vermutlichen AS-PTs mit ProtParam (siehe 3.9) lieferte für alle Proteine durchgehend ungewöhnlich hohe Werte, die für „HcPT“, „HcPT-1“, „HcPT-2“ und „HpPT-9“ von zuvor publizierten Annahmen (pl um 6,1, ausgegeben mit GENTle (siehe 3.9))^[220] deutlich abwichen. Auch Kontrollen der Berechnung mit weiteren frei zugänglichen Online-Programmen wie „Calculation of protein isoelectric point“ oder „Protein Calculator“ ergaben eine pl-Spanne von 9,1–10,0. Somit musste tatsächlich von einem theoretischen Vorliegen aller putativen PTs als basische Proteine ausgegangen werden. Diese Tatsache harmonisierte nach genauerer Betrachtung aber nicht nur mit der vorhergesagten und bereits bestätigten Membranständigkeit, sondern sie lieferte auch ein Indiz dafür, dass die gefundenen PTs vermutlich aus Plastiden stammten. Nach FERRO *et al.*^[278] und SHEN *et al.*^[174] waren hohe pl-Werte typisch für membrangebundene Proteine, die im Inneren von Chloroplasten lokalisiert waren. Somit würde die Hypothese bezüglich des Hyperforin-Biosynthese-Ortes – nämlich Produktion in plastidhaltigen Zellen und anschließende Lagerung in benachbarten schizogenen Ölbehältern/Ölgängen von *H. perforatum*-Gewebe^[84] – bekräftigt werden.

Die nachfolgende Kontrolle der vermeintlichen Johanniskraut-PTs auf eine Lokalisierung in den Plastiden geschah durch eine Suche nach N-terminalen TP-Sequenzen. Diese Analyse gestaltete sich jedoch ebenfalls aufwändiger als erwartet: Mögliche N-terminale TPs konnten nicht einfach mittels PT-Sequenzvergleichen oder der gezielten (BLAST-)Suche nach erkennbaren TP-Mustern innerhalb der unterschiedlich langen N-Terminus-Sequenzen (Abbildung 5.9) entdeckt werden. Zum damaligen Zeitpunkt war weder eine derartige, allgemeine TP-Sequenz für Plastiden oder Mitochondrien innerhalb pflanzlicher PTs bekannt/publiziert,

noch war sie von den bisherigen Ergebnissen abzuleiten. Aus diesem Grund wurden alle Aminosäure-Sequenzen mit drei Online-Tools (siehe 3.9), nämlich TargetP^[279,280], ChloroP^[281] sowie iPSORT^[282], mittels theoretischer Vorhersagen untersucht. Unter Berücksichtigung von Wahrscheinlichkeiten und statistischen Verlässlichkeitsanalysen, die bei den Berechnungen der Software-Anwendungen Einfluss hatten, fanden letztlich nur die definitiven Endergebnisse der Kalkulationen Einzug in die Vorab-Charakterisierung. Im Endeffekt hieß dies nichts anderes, als dass die stärkste, wahrscheinlichste Vorhersage als wahr angenommen wurde und sich den Empfehlungen der Software folgend für die anzunehmende Lokalisierung entschieden wurde. Neun putativen PTs wurde jeweils ein Chloroplasten-TP vorhergesagt und zwei PTs ein Mitochondrien-TP („HcPT-2“ und „HpPT-3“). Für „HcPT-1“ gab es nur eine Tendenz zu plastidärer Lokalisation, aber keine verlässliche Prognose. Dabei gab es mit einer vermeintlichen Länge von 11–77 aa eine unglaublich große Spanne und Inhomogenität innerhalb der betrachteten PTs, was die angesprochene Komplexität und Schwierigkeit des Ableitens von TP-Mustern für pflanzliche AS-PTs bestätigte. Eine N-terminale Erkennungssequenz für einen intrazellulären Transport zu Zielstrukturen wurde aber letztlich für alle untersuchten PTs gefunden und bestätigte damit auch die dritte vorausgesagte Eigenschaft von Mitgliedern aus der Enzymfamilie der AS-PTs, so dass alle Strukturvoraussetzungen für zielgerichtete Klonierungen und Expressionsanalysen gegeben waren.

Inspiziert durch einen experimentellen Ansatz von SHEN *et al.*^[174] und AKASHI *et al.*^[176] wurden im Verlauf dieser Arbeit exemplarisch die beiden Enzyme „HcPT-2“ und „HpPT-1“ für die Expression in Hefezellen (siehe 4.4.1) um ihr vorhergesagtes N-terminales TP verkürzt (siehe 5.4.3.2; 5.4.4.3). Der Gedanke hinter diesem Schritt war die Annahme, dass das pflanzliche TP in den Hefen zu Misslokalisierung, Fehlfaltung und insgesamt reduzierter Stabilität der Proteine führen könnte, was die Lebenszeit und Aktivität der PTs negativ beeinflusste.

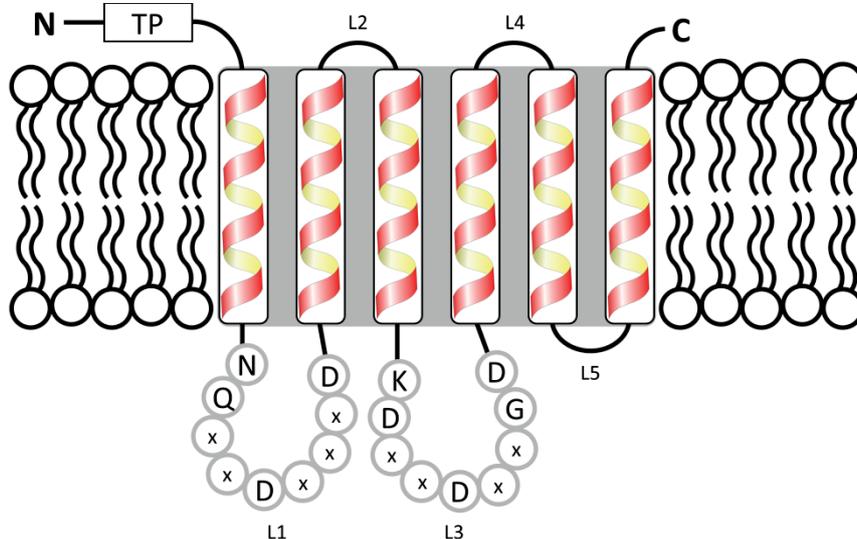


Abbildung 5.11 Schematische Struktur und Membranintegration einer AS-PT aus Johanniskraut mit sechs TMHs und den zwei konservierten Aspartat-reichen Motiven^[263]. C: C-Terminus; L1–5: extra-membranäre Loops; N: N-Terminus; TP: vorhergesagtes Transitpeptid

Als Endergebnis der Struktur-Untersuchungen ließ sich festhalten, dass alle putativen PT-Sequenzen aus Johanniskraut die Anforderungen an bekannte, membranständige AS-PTs erfüllten. Folglich standen zwölf geeignete PT-Kandidaten mit voraussichtlichem Beitrag zu Sekundärstoffbiosynthesen im Johanniskraut bereit, die kloniert und in Expressionsanalysen auf enzymatische Aktivität untersucht werden konnten.



5.2.3.3. Subzelluläre Lokalisierung von HcPT-2

Zur intrazellulären Lokalisierung von Proteinen können deren Gene mit einem Reporter-Gen (z.B. für ein fluoreszierendes Protein) verknüpft und als Fusionskonstrukt exprimiert werden. Am verbreitetsten ist dabei die Verwendung des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP). Dieses bei Anregung mit Licht leuchtende Protein wurde in den 1960er Jahren in der Quallen-Art *Aequorea victoria* entdeckt^[283] und bescherte seinem Entdecker zusammen mit zwei weiteren Forschern im Jahr 2008 den Nobelpreis für Chemie. Derivate davon sind das **enhanced green fluorescent protein (eGFP)**, **yellow fluorescent protein (YFP)** und **cyan fluorescent protein (CFP)**. Exemplarisch für alle PTs aus Johanniskraut wurde „HcPT-2“ sowie die um das vorhergesagte Transitpeptid verkürzte Variante „HcPT-2_oT“ C-terminal mit dem verstärkt grün-fluoreszierenden eGFP markiert (siehe 5.4.3.3) und in Sf9-Insektzellen exprimiert (siehe 4.4.2). Zur Kontrolle wurde parallel das im Cytosol lösliche eGFP ohne fusionierte PT exprimiert, um einen Vergleich mit einem nicht membrangebundenen Protein zu ermöglichen. Nach 1–4 Tagen wurden Proben infizierter Insektzellen entnommen und wie zuvor beschrieben (siehe 4.6) bis zur Detektion unter einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufgearbeitet. Wie erwartet zeigten Sf9-Zellen, die nur das eGFP produzierten, spätestens 72 h nach der Infektion eine durchgehende, diffuse Grünfärbung über die gesamte Querschnittsfläche in allen Ebenen der Wirtszelle (Abbildung 5.12). Das Aussehen von Insektzellen, die „HcPT-2-GFP“ / „HcPT-2_oT-GFP“ in sich trugen, war für beide Fusionskonstrukte vergleichbar und unterschied sich deutlich von der löslichen Cytosol-Kontrolle. Mit bester Farbtintensität und bestem Kontrast nach 72 h zeigte jede PT-produzierende Wirtszelle einen grün-fluoreszierenden Ring, begrenzt durch die Zellmembran nach außen und den fluoreszenzfreien Zellkern nach innen. Innerhalb dieses Ringes trat punktuelle Grünfärbung in Form einzelner, stark leuchtender Flecken vor einem schwach fluoreszierenden Hintergrund auf, was auf einen Einbau des PT-Konstruktes in die Membran von Zellorganellen schließen ließ. Hier handelte es sich voraussichtlich um das endoplasmatische Retikulum (ER) oder die Mitochondrien, da einerseits mit schwacher Prävalenz ein Mitochondrien-TP innerhalb der Volllänge-PT-Sequenz vorhergesagt wurde und sich andererseits beide fluoreszierenden „HcPT-2“-Varianten nicht in ihrer Lokalisation unterschieden. Die exakte Lokalisierung in einem bestimmten Mikrosomen-Typ durch beispielsweise Co-Färbung von Organellen oder des Zellkerns war im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, jedoch auch nicht notwendig, weil es nur um die grundlegende Positionierung der PT-Genprodukte im Wirt zur Optimierung des Isolierungsprozesses ging. Darüber hinaus war fraglich, ob irgendeine Verlässlichkeit gegeben war für den Einbau von plastidären PTs in die Insektzellstrukturen, die sich im Aufbau und dem Vorhandensein von Chloroplasten von pflanzlichen Zellen unterscheiden, oder ob die Organellen der Sf9-Zellen nicht nur bestmögliche Alternativen für die Platzierung der membranständigen PTs aus Johanniskraut darstellten. Das erklärte letztlich, dass in diesem heterologen Wirtssystem keine Aussage über die natürliche, physiologische Lokalisation innerhalb der Pflanzenzelle möglich sein konnte.

Mit den Ergebnissen der Fluoreszenzmikroskopie wurde somit durch „HcPT-2-GFP“ stellvertretend nachgewiesen, dass die Software-gestützten Vorhersagen zur Membranintegrität korrekt waren und somit die Verwendung eines prokaryotischen Expressionssystems für die Produktion von AS-PTs aus Johanniskraut ausgeschlossen werden konnte, wie schon von MÜLLER^[220] vermutet. Dies bestätigte außerdem, dass die Extraktion von Mikrosomen als Fraktion mit höchstem Anteil an gesuchtem Enzym ein wichtiger Schritt im zu etablierenden Protokoll der Protein-Isolierung aus eukaryotischen Wirtszellen sein würde.

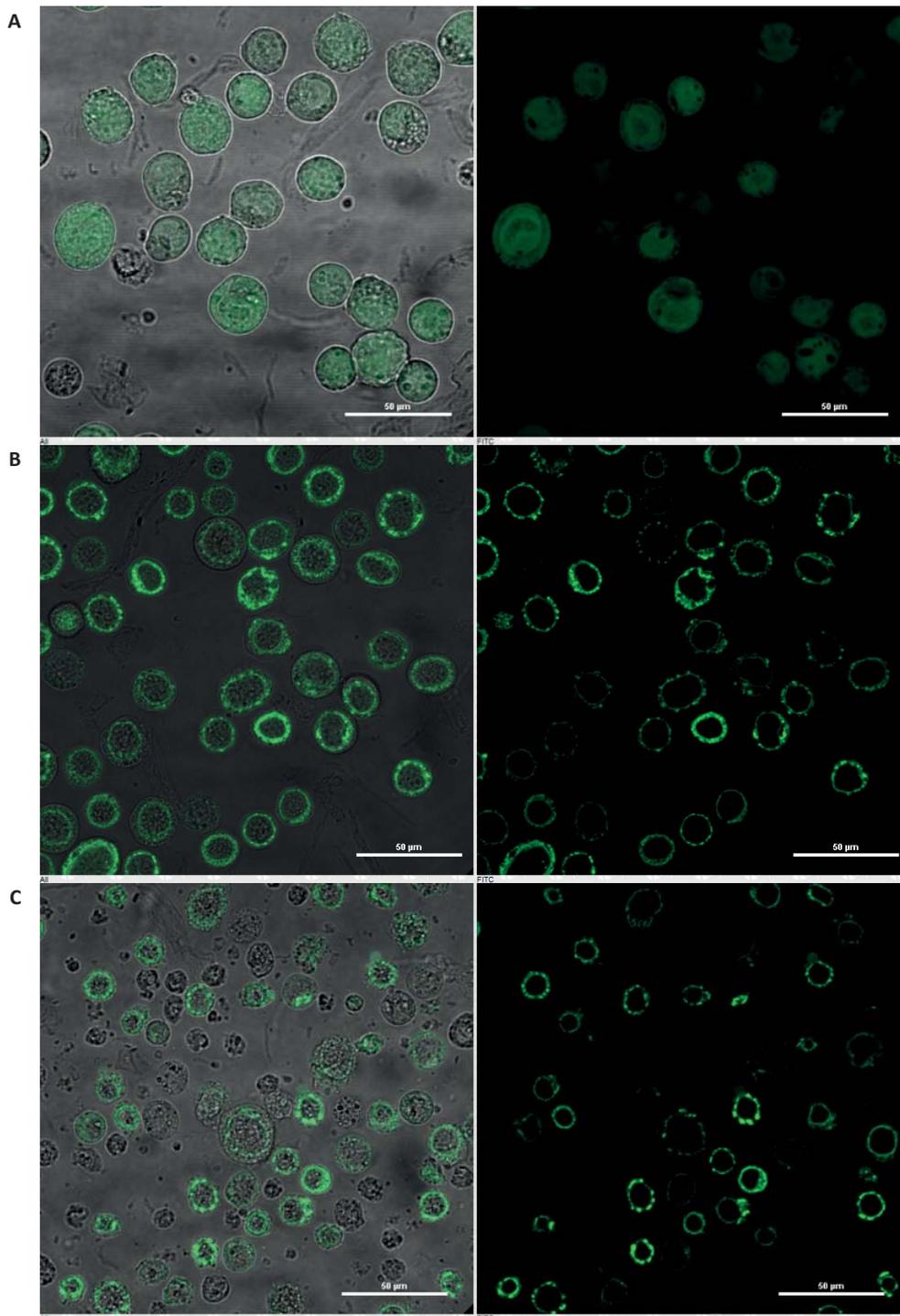


Abbildung 5.12 Konfokale Laser-Scanning Mikroskop-Aufnahmen von Insektenzellen mit Fluoreszenzgen tragenden Baculoviren, 72 h nach der Infektion. **A:** Sf9-Zellen mit löslichem eGFP ohne fusionierte PT. **B:** Sf9-Zellen mit membranständiger HcPT-2-GFP. **C:** Sf9-Zellen mit membranständiger HcPT-2_oT-GFP. Links: Differential-Interferenz-Kontrast-Aufnahmen und Fluoreszenzaufnahmen übereinander; rechts: Fluoreszenzaufnahmen (Anregung bei $\lambda = 488$ nm und Emission bei $\lambda = 500$ – 550 nm)

5.2.3.4. Phylogenetische Untersuchung von AS-PTs aus Johanniskraut

Die Phylogenie diente als ein Teilstück innerhalb der Vorab-Charakterisierung von möglichen PTs und wurde daher nur mit den bereits optimierten Einstellungen, die ausgiebig in einer vorangegangenen Arbeit aus unserer AG diskutiert sind^[220], zur PT-Analyse herangezogen. Der phylogenetische Baum (Abbildung 5.13) zeigt dabei ein vergleichbares Gruppierungsmuster wie die beiden zur Konstruktion herangezogenen

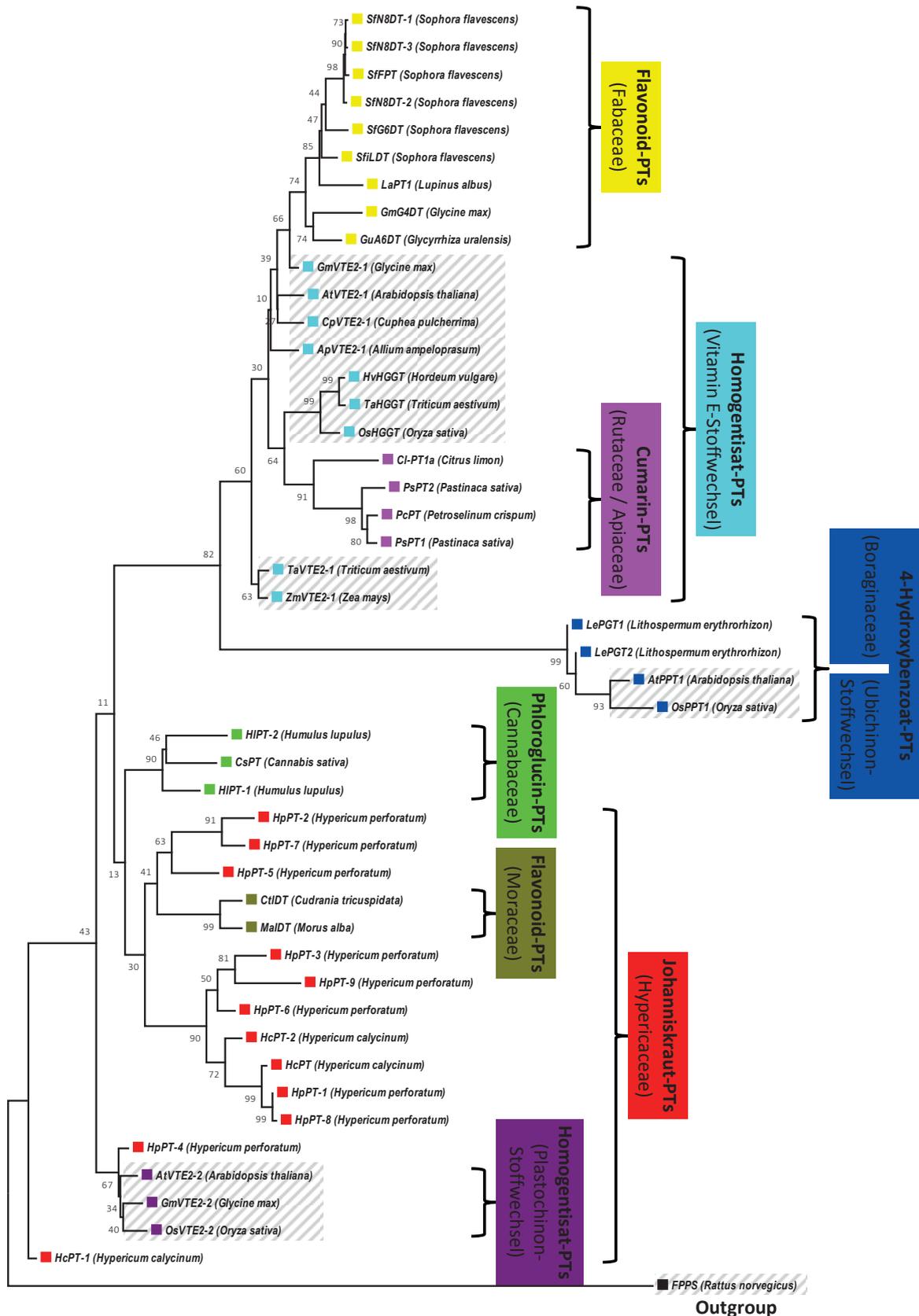


Abbildung 5.13 Phylogenetische Einordnung untersuchter Proteinsequenzen putativer Johanniskraut-PTs zu verwandten pflanzlichen, membrangebundenen PTs (für PT-Informationen siehe 8.1; Alignment mit ClustalW-Algorithmus, Neighbour-Joining-Methode mit Poisson-Modell). Phylogenetischer Baum abgewandelt nach MUNAKATA *et al.*^[169] und MÜLLER^[220]; grau schraffiert: PTs des Primärstoffwechsels

Vorlagen-Diagramme (siehe 4.3.12). Neben einer Säuger-Farnesyldiphosphat-Synthase (FPPS) zur Verwurzelung spaltet sich „HcPT-1“ deutlich von allen anderen pflanzlichen PTs ab. Die erste Aufzweigung des Baumes innerhalb der übrigen PTs findet zwischen den Homogentisat-PTs der Plastochinon-Biosynthese (Primärstoffwechsel; violett), zu denen sich „HpPT-4“ gruppiert, und allen weiteren Gruppen statt. Bei der nächsten Verästelung verzweigt sich der phylogenetische Baum in zwei grundsätzliche Unteräste: Auf der einen Seite sammeln sich die zehn verbliebenen putativen Johanniskraut-PTs (rot) erwartungsgemäß neben den eng verwandten PTs aus Hanf und Hopfen (grün)^[152,172,238], die bewiesenermaßen Aktivität bei Phloroglucin-Substraten zeigen. Bei detaillierterer Betrachtung stehen dabei „HpPT-2“, „HpPT-5“ und „HpPT-7“ in einer eigenen Subklade, die neben den Flavonoid-PTs „CtIDT“ und „MaIDT“ der Moraceae angeordnet ist (olivgrün)^[173], während die restlichen vermeintlichen *Hypericum*-PTs in einer eigenen Untergruppierung aufgelistet sind. Auf der anderen Seite stehen sowohl die etwas ausgruppiert liegenden Primärstoffwechsel-PTs, die mit der Ubichinon-Biosynthese in Verbindung gebracht werden (blau), als auch ein letzter Verzweigungspunkt, von dem aus sich der Baum in zwei weitere, große Kladen unterteilen lässt. Die große, heterogene Gruppe der Homogentisat-PTs des Vitamin E-Stoffwechsels (cyan) beinhaltet dabei auch in einer extra Subklade die vier AS-PTs, die Cumarine als Substrate akzeptieren (pink)^[169–171], wohingegen der andere, homogen aufgebaute Unterast die Flavonoid-PTs aus der Familie der Fabaceae umfasst (gelb).

Für alle zu untersuchenden PTs dieser Arbeit wurde durch die phylogenetische Untersuchung die biogenetische Verwandtschaft untereinander und in Vergleich zu bekannten aromatischen PTs des Sekundärstoffwechsels nachgewiesen. Somit erschienen alle putativen *Hypericum*-PTs als wahrscheinliche AS-PTs und somit als geeignete Kandidaten für Expressionsanalysen und Aktivitätsuntersuchungen.

5.3. RNA-Extraktion aus Pflanzenmaterial

Die Extraktion von hochwertiger, d.h. äußerst reiner und ausreichend hoch konzentrierter RNA aus Johanniskraut war eine besondere Hürde und so gut wie immer der limitierende Faktor während der Klonierungsarbeiten. Die schnellsten Extraktionen mit geringstem Arbeitsaufwand versprachen die kommerziell erhältlichen Extraktions-Kits, die sich nach exzessiven Untersuchungen jedoch als nur bedingt geeignet herausstellten. Qiagens RNeasy® Plant Mini Kit, angewendet mit dem Protokoll für die Aufreinigung von Gesamt-RNA aus Pflanzengewebe, erlaubte die zufriedenstellende RNA-Gewinnung aus Zellen der Suspensionskulturen von *H. calycinum* – mit Konzentrationen zwischen 650–2.420 ng/μl bei einem reinheitsbestimmenden Absorptionsquotienten A_{260}/A_{280} von 1,8–1,9.

Für die Isolierung verwertbarer Gesamt-RNA aus Pflanzenmaterial von *H. perforatum* zeichnete sich keines der getesteten Extraktions-Kits als brauchbar aus, mit Ausnahme zweier Testmuster von Thermo Scientifics GeneJET™ Plant RNA Purification Mini Kit, welches ausgezeichnete RNA-Konzentrationen von 1.296 bzw. 1.316 ng/μl bei einer Reinheit A_{260}/A_{280} von 1,8–1,85 bzw. 1,80 ergab. Interessanterweise konnten die guten Extraktionsergebnisse nicht einmal mit dem zuvor erfolgreichen, nun mehr jedoch kommerziell erworbenen GeneJET™-Kit in späteren Anwendungen reproduziert werden (möglicherweise bedingt durch zwischenzeitliche, herstellerseitige Veränderungen an ihrem Produkt). Die gesammelten Ergebnisse bewegten sich zwischen 18–30 ng/μl bei A_{260}/A_{280} um 1,3 bei keiner erkennbaren Präsenz im Agarose-Gel (Abbildung 5.14, A), was als Grundlage für nachfolgende Arbeitsschritte indiskutabel war.

Die Versuche einer RNA-Extraktion aus *H. perforatum* mit dem Reagenz TRIzol® scheiterten ebenfalls an den Ausbeuten und möglicher Nukleinsäure-Degradation während der Isolierung. RNA-Konzentrationen von 15–70 ng/μl mit einer Reinheit $\leq 1,15$ lieferten ebenso enttäuschende Ergebnisse wie die zuvor getesteten Extraktions-Kits. Bei einem testweisen Austausch des Pflanzenmaterials von *H. perforatum* zu *Arabidopsis thaliana* oder *Nicotiana benthamiana* zeichneten sich im Vergleich bemerkenswerterweise keine

Schwierigkeiten ab, qualitativ hochwertige Gesamt-RNA zu gewinnen (Abbildung 5.14), was auf die besondere handwerkliche Problematik bei den Arbeiten mit Johanniskraut hindeutete.

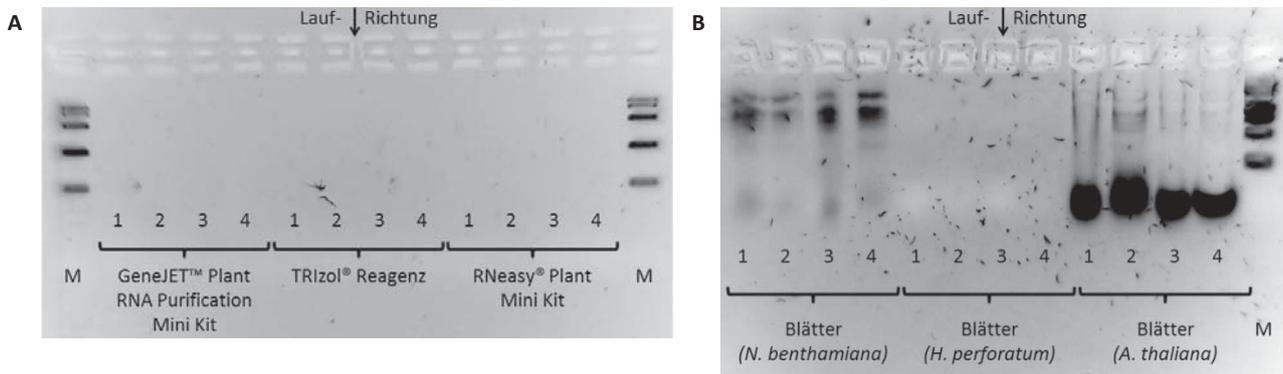


Abbildung 5.14 Agarose-Gelelektrophorese extrahierter Gesamt-RNA-Proben aus Pflanzenmaterial von 2012–2013. Qualitativ hochwertige Gesamt-RNA wird durch die 18S- und 28S-Gelbanden der ribosomalen RNA nachgewiesen. **A:** Versuch der Gesamt-RNA-Extraktion aus *H. perforatum*-Blüten mit unterschiedlichen Methoden. **B:** Vergleich der Gesamt-RNA-Extraktion mit TRIZOL® Reagenz aus Blättern drei unterschiedlicher Pflanzen-Arten. 1: 2012, ohne RNase-Inhibitor; 2: 2012, mit RNase-Inhibitor; 3: 2013, ohne RNase-Inhibitor; 4: 2013, mit RNase-Inhibitor; M: Marker als Größenstandard

Als Methode der Wahl stellte sich die RNA-Fällung mittels LiCl heraus. In Anlehnung an JAAKOLA *et al.*^[240] war es möglich, in einer vielstufigen, aufwändigen Art und Weise innerhalb von 1,5 Tagen sehr gute RNA-Ausbeuten aus allen untersuchten Pflanzenteilen von *H. perforatum* zu generieren, die sich sowohl in den Konzentrationen (692–1.395 ng/μl) als auch der Reinheit (A_{260}/A_{280} : 1,65–1,95) sowie der Banden-Präsenz im Agarose-Gel abzeichneten (Abbildung 5.15). Es wurde zusätzlich getestet das eingesetzte Protokoll aus Zeitspargründen abzuwandeln, was ebenfalls in intakter Gesamt-RNA resultierte. Jedoch endeten diese Versuche letztlich ohne erkennbaren Zugewinn und wurden nicht weiterverfolgt, weil weder die Ausbeute noch die Reinheit an die ursprünglich eingesetzte, modifizierte Methode nach JAAKOLA *et al.*^[240] heranreichten.

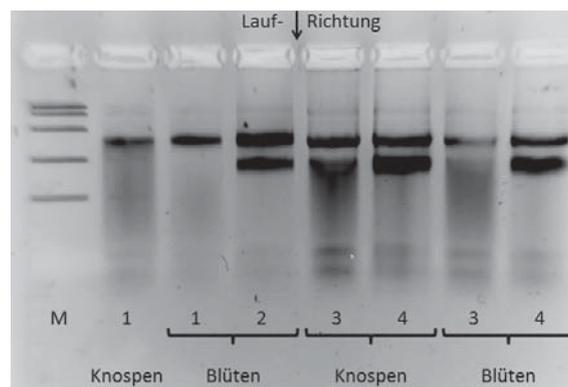


Abbildung 5.15 Agarose-Gel extrahierter Gesamt-RNA aus *H. perforatum*-Pflanzenmaterial von 2012–2013. Qualitativ hochwertige Gesamt-RNA wird durch die 18S- und 28S-Gelbanden der ribosomalen RNA nachgewiesen. 1: 2012, ohne RNase-Inhibitor; 2: 2012, mit RNase-Inhibitor; 3: 2013, ohne RNase-Inhibitor; 4: 2013, mit RNase-Inhibitor; M: Marker als Größenstandard

5.4. Klonierung von Prenyltransferase-Genen

Im Verlauf dieser Arbeit wurde sich mit insgesamt zwölf PT-Genen aus zwei unterschiedlichen Johanniskraut-Arten molekularbiologisch befasst. Dabei wurden dankenswerterweise vier Gensequenzen bereits durch die Arbeit von MÜLLER^[220] als Grundlage zur Verfügung gestellt (siehe 5.2.1), weshalb sich bei diesen PTs der Fokus auf das Reproduzieren/Umklonieren der vorliegenden Sequenzen zur Präparation von Expressionskonstrukten beschränkte. Die übrigen acht Gene wurden in eigenen Arbeiten entdeckt, ggf. vervollständigt und von Grund auf zu endgültigen Volllänge-Sequenzen kloniert. Dabei ist zu beachten, dass während der molekularbiologischen Arbeiten Isoformen fast aller untersuchten PTs gefunden wurden. Um dieses Polymorphismus-Problem einzugrenzen und zusätzlich mögliche Amplifikationsfehler bei der PCR auszuschließen, wurden daher nur diejenigen PTs weiter untersucht, die nach zwei oder mehr voneinander unabhängigen Klonierungsdurchläufen in identischen Aminosäure-Sequenzen resultierten (siehe Anhang 10.2). Für „HcPT“ wird die Klonierung in ausführlicher Form – dem Klonierungsschema unter 4.3 schrittweise folgend – unten beschrieben, so dass für die anderen elf PTs nur eine kurze Übersicht mit den wichtigsten Informationen gegeben wird. Von allen bestätigten PT-Konstrukten wurden Dauerkulturen angelegt (siehe 4.3.9) und diese PTs schließlich in Hefe- und/oder Insektenzellen exprimiert (siehe 4.4). Weil im Verlauf der gesamten Arbeiten unterschiedliche Bezeichnungen für die einzelnen PT-Gene verwendet wurden und es innerhalb unserer AG zu Umbenennungen kam, wird nun vorab mit der unten stehenden Gesamtübersicht (Tabelle 5.4) ein Überblick über die eingeführte, einheitliche Namensgebung geschaffen.

Tabelle 5.4 Nomenklatur (alt und neu) der zwölf untersuchten Prenyltransferasen aus *Hypericum*-Arten

Gen-Name	Alternative, veraltete Bezeichnungen	Laufende Nr.	Ursprung des klonierten Gens
HcPT	<i>Contig 339(HcPT-3)</i> , 339; <i>Contig 339</i>	174; 175	<i>H. calycinum</i> (Hc), subtraktive cDNA-Datenbank
HcPT-1	<i>Contig 88(HcPT-1)</i> , 88; <i>Contig 88</i>	275	–
HcPT-2	<i>Contig 290(HcPT-2)</i> , 290; <i>Contig 290</i>	172; 173	–
HpPT-1	<i>HpPT-1B</i> ; <i>HpPTF-1B</i> ; <i>HpPTF-1</i> ; V6	177; 178	<i>H. perforatum</i> (Hp), Suche mit degenerierten Primern
HpPT-2	<i>HpPTF-2</i> ; 9259; <i>hpa_locus_9259...</i>	179; 180	<i>H. perforatum</i> (Hp), Online-Transkriptom
HpPT-3	<i>HpPTF-3</i> ; <i>HpPTF-3(1)</i> ; 4472_1; 4472; <i>hpa_locus_4472...</i>	181; 182	–
HpPT-4	<i>HpPTF-4</i> ; 8393; <i>hpa_locus_8393...</i>	246; 247	–
HpPT-5	<i>HpPTF-5</i> ; 10745; <i>Contig10745</i> ; <i>Contig10745+ctg038903</i> ; 1+2	248; 249	–
HpPT-6	<i>HpPTF-6</i> ; 15746; <i>hpa_locus_15746...</i> ; <i>hpa_locus_15746+Singlet16042</i> ; 3+4	250; 251	–
HpPT-7	<i>HpPTF-7</i> ; 2095043; <i>scaffold-BNDE-2095043</i> ; 5+6	252	–
HpPT-8	<i>HpPTF-8</i> ; 2013053; <i>scaffold-BNDE-2013053</i> ; 7+8	253; 254	–
HpPT-9	<u><i>HpPT-470</i></u> ; 470; <i>hpa_locus_470...</i>	176	–

unterstrichen: kloniert und unter diesem vorläufigen Namen publiziert und zur Verfügung gestellt von MÜLLER^[220]



5.4.1. Prenyltransferase HcPT

Der Ausgangspunkt zur Klonierung war die 644 bp lange cDNA „Contig 339“ der subtraktiven cDNA-Datenbank, die bereits von MÜLLER^[220] zu einem 1.191 bp langen ORF verlängert und als „Contig 339(HcPT-3)“ zur Verfügung gestellt wurde (siehe 5.2.1).

Ausgehend von dieser Sequenz wurden die Expressionsprimer „339_pFastBac_For“ und „339_pFastBac_Re“ (siehe 3.8) abgeleitet und mit deren Hilfe das Gen aus frischer cDNA – gewonnen durch reverse Transkription (siehe 4.3.4) von RNA, die aus Elicitor-behandelten *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen extrahiert wurde (siehe 4.1) – unter Einsatz der DNA-Polymerase Phusion® Hot Start II vervielfältigt (siehe 4.3.5.2). Nach qualitativer Kontrolle des PCR-Ergebnisses mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.3.6) wurde die erwartete DNA-Bande von 1.191 bp Größe aus dem Gel extrahiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt sowie der Transfervektor pFastBac™ 1 wurden mit den beiden Restriktionsendonukleasen (RE) *EcoRI* und *HindIII* verdaut, das linearisierte Plasmid dephosphoryliert und beide DNA-Stränge miteinander ligiert (siehe 4.3.7). Nach Transformation in *E. coli* (DH5α) (siehe 4.3.8.2) wurden Kolonien selektiert, zur Plasmid-Vermehrung als ÜN-Kultur angezogen und die Fremdgen-tragenden Plasmide aus den Bakterien isoliert (siehe 4.3.10.1). Die Insert-Kontrolle erfolgte mit einer Standard-PCR (siehe 4.3.5.1) unter Verwendung derselben Primer wie bei der ersten Vervielfältigung, wobei nun das extrahierte Plasmid als DNA-Matrize diente. Im Agarose-Gel konnte eine DNA-Sequenz von ca. 1.200 bp Länge detektiert werden, die nach der DNA-Sequenzierung (siehe 4.3.11) als 1.191 bp langer ORF identifiziert wurde. Bei identischer Länge im Vergleich zum Ausgangsgen „Contig 339(HcPT-3)“ (MultAlin; siehe 3.9) fanden sich in der neuen PT-Sequenz „HcPT“ drei Nukleobasen-Austausche an Position 369 (A statt G), 453 (A statt G) und 735 (G statt A). Nach Übersetzung des ORF in die 396 aa lange Aminosäure-Sequenz (ExpASy Translate; siehe 3.9) zeigte sich jedoch, dass alle drei Mutationen stumm waren und zu keinen Veränderungen innerhalb der ursprünglichen PT-Sequenz führten.

Tabelle 5.5 Übersicht der Klonierung von HcPT zur Expression

Vorhandene Gensequenz	„Contig 339(HcPT-3)“ (1.191 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus Elicitor-behandelten <i>H. calycinum</i> -Kulturen
Expressionsprimer-Paar	„339_pFastBac_For“ und „339_pFastBac_Re“
PCR-Anwendung	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „339_pFastBac_For“ und „339_pFastBac_Re“
→ DNA-Sequenzierung	

5.4.2. Prenyltransferase HcPT-1

Die molekularbiologische Untersuchung von „HcPT-1“ startete mit dem 1.273 bp langen cDNA-Fragment „Contig 88(HcPT-1)“ (siehe 5.2.1). Die Sequenz zeigte die typischen Struktureigenschaften einer AS-PT (siehe 5.2.3), nur fehlte eine Bestätigung des 5'-Endes durch eine Verlängerung der cDNA-Sequenz bis zu einem Stoppcodon im 5'-UTR. Durch Alignments dieser Sequenz mit veröffentlichten sowie zwischenzeitlich klonierten PT-cDNAs konnte das tatsächliche Startcodon jedoch anhand von Sequenzvergleichen (siehe 5.2.3) innerhalb der 1.273 bp langen Sequenz abgeschätzt und identifiziert werden.

Die erhaltene CDS „HcPT-1“ hatte eine Länge von 1.161 bp und war damit deutlich kürzer als die Ausgangs-cDNA. Nachvollziehbar war die Verkürzung um 58 bp durch Abtrennung des 5'-UTR, jedoch wurde zusätzlich ein 54 bp langes Intron innerhalb des angenommenen ORFs „Contig 88(HcPT-1)“ entdeckt (siehe MÜLLER^[220], S. 99), welches wiederholt in eigenen Klonierungen nicht auftauchte und somit auch nicht

bestätigt werden konnte (Abbildung 5.16). Außerdem fanden sich 38 Nukleobasen-Austausche in der CDS, die in dem übersetzten ORF des Proteins zu 20 abweichenden Aminosäuren führten.

Vorhandene Gensequenz	„Contig 88(HcPT-1)“ (1.273 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus Elicitor-behandelten <i>H. calycinum</i> -Kulturen
Expressionsprimer-Paar	„HcPT-1_Xhol_for“ und „HcPT-1_KpnI_rev“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>XhoI</i> und <i>KpnI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Doppelverdau mit <i>XhoI</i> und <i>KpnI</i>
→ DNA-Sequenzierung	

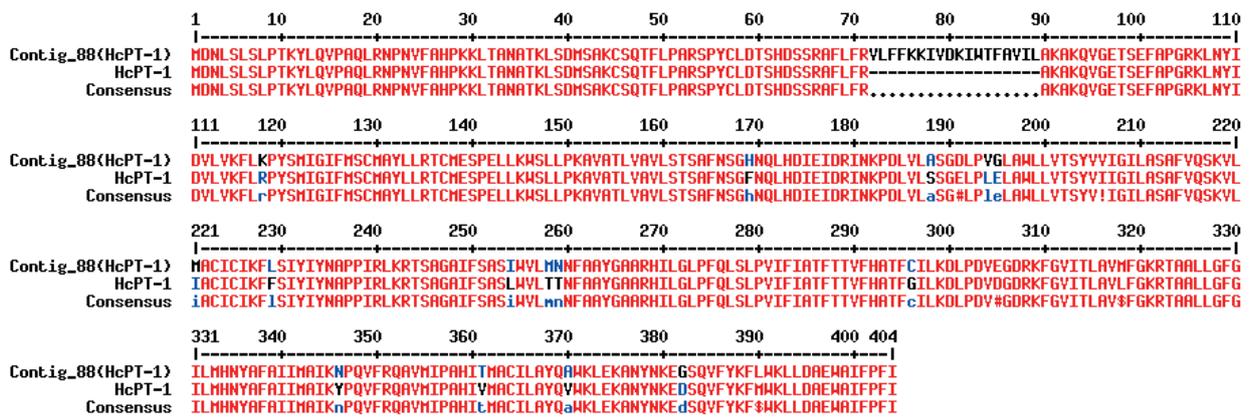


Abbildung 5.16 Übersicht der Klonierung von HcPT-1 (oben) und Aminosäure-Sequenzvergleich von neu klonierter HcPT-1 und überlassener PT-Sequenz (unten). Blaue Kleinbuchstaben/rote Sonderzeichen im Consensus: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.3. Prenyltransferase HcPT-2 und Varianten

5.4.3.1. Klonierung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen

Das Klonierungsschema für dieses Gen ähnelte im Ablauf der Präparierung von „HcPT“ (siehe 5.4.1). Die klonierte cDNA „HcPT-2“ hatte einen 1.143 bp langen ORF, war also um sechs Nukleobasen länger als ihre Vorläufer-Sequenz „Contig 290(HcPT-2)“ (siehe 5.2.1). Diese sechs zusammenhängenden Nukleotide (CAG_CAT) fanden sich ab Position 190 im Gen wieder, was in der Proteinsequenz einen Einschub von zwei zusätzlichen Aminosäuren an Position 65–66 bedeutete (Abbildung 5.17). Die übrige, nunmehr 380 aa lange Aminosäuren-Kette blieb trotz eines weiteren Nukleobasen-Austausches (A statt G an Position 480; stumme Mutation) identisch zur ursprünglichen PT-Sequenz.



Vorhandene Gensequenz	„Contig 290(HcPT-2)“ (1.137 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus Elicitor-behandelten <i>H. calycinum</i> -Kulturen
Expressionsprimer-Paar	„290_pFastBac_For“ und „290_pFastBac_Re“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektoren	pESC-URA / pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „290_pFastBac_For“ und „290_pFastBac_Re“
→ DNA-Sequenzierung	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
HcPT-2	MELSRMLKFPSAAHAFSEARCRRTMATPGRFVPLMPPSRIALSDRKSCYKPLANGTHLLKAVQTQHQ..TQIQHEAAKPVISKNDVLRFLRPFAYAGSIQFFCYLARRLV											
Contig_290(HcPT-2)	MELSRMLKFPSAAHAFSEARCRRTMATPGRFVPLMPPSRIALSDRKSCYKPLANGTHLLKAVQTQ--TQIQHEAAKPVISKNDVLRFLRPFAYAGSIQFFCYLARRLV											
Consensus	MELSRMLKFPSAAHAFSEARCRRTMATPGRFVPLMPPSRIALSDRKSCYKPLANGTHLLKAVQTQ..TQIQHEAAKPVISKNDVLRFLRPFAYAGSIQFFCYLARRLV											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
HcPT-2	DNPQTFKSLNNTICIKILAVLTSLVCTYFFTSGVNQISDIETDKINKPDLPLSSGELSIESAHAIYMSFLAVSLLAAGALSSMSFLASIFCLLLVGGVYSIPPFRTKAST											
Contig_290(HcPT-2)	DNPQTFKSLNNTICIKILAVLTSLVCTYFFTSGVNQISDIETDKINKPDLPLSSGELSIESAHAIYMSFLAVSLLAAGALSSMSFLASIFCLLLVGGVYSIPPFRTKAST											
Consensus	DNPQTFKSLNNTICIKILAVLTSLVCTYFFTSGVNQISDIETDKINKPDLPLSSGELSIESAHAIYMSFLAVSLLAAGALSSMSFLASIFCLLLVGGVYSIPPFRTKAST											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
HcPT-2	VGPATITIALMKGFDFFAIFAGAGVVLGLPFQMSLPMYYHSIFTTIFCLANGILKDISDIEGDIKNIPTLATIIGARKTLIIGTGIHILNHFGCYLAARIIRPEAIKCSI											
Contig_290(HcPT-2)	VGPATITIALMKGFDFFAIFAGAGVVLGLPFQMSLPMYYHSIFTTIFCLANGILKDISDIEGDIKNIPTLATIIGARKTLIIGTGIHILNHFGCYLAARIIRPEAIKCSI											
Consensus	VGPATITIALMKGFDFFAIFAGAGVVLGLPFQMSLPMYYHSIFTTIFCLANGILKDISDIEGDIKNIPTLATIIGARKTLIIGTGIHILNHFGCYLAARIIRPEAIKCSI											
	331	340	350	360	370	380						
HcPT-2	VIPVHIISALFLLSQVMKIHVSVNYESVQSRKLYSSLMLVYVYQYILLPFV											
Contig_290(HcPT-2)	VIPVHIISALFLLSQVMKIHVSVNYESVQSRKLYSSLMLVYVYQYILLPFV											
Consensus	VIPVHIISALFLLSQVMKIHVSVNYESVQSRKLYSSLMLVYVYQYILLPFV											

Abbildung 5.17 Übersicht der Klonierung von HcPT-2 (oben) und Aminosäure-Sequenzvergleich von neu klonierter, untersuchter HcPT-2-CDS mit überlassener PT-Sequenz (unten). Schwarze Buchstaben: Zusätzliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.3.2. Verkürzung des Volllänge-Gens für Expressionsuntersuchungen

Zum Entfernen des putativen Transitpeptides (siehe 5.2.3.2) wurde vom ursprünglichen „HcPT-2“-Gen ein vorwärts gerichteter Primer abgeleitet, der 72 bp am 5'-Ende der cDNA (d.h. 24 aa am N-Terminus des Proteins) abtrennen und stattdessen ein neues ATG (codiert für die Aminosäure Methionin) als Startcodon in die Sequenz einbringen sollte. Bei der Aminosäure-Sequenz von „HcPT-2“ befand sich an Position 24 durch Zufall bereits die Aminosäure Methionin, so dass es ausreichte, die ersten 69 bp des Gens abzutrennen und das natürlich vorkommende ATG an Position 70–72 als neues Startcodon zu verwenden. Positiv klonierte und sequenzierte Konstrukte stellten den erwarteten, verkürzten Leserahmen „HcPT-2_oT“ von 1.074 bp Länge bereit, der bis auf den fehlenden N-Terminus sequenzidentisch zu „HcPT-2“ war.

Tabelle 5.6 Übersicht der Verkürzung – Klonierung von HcPT-2_oT

Vorhandene Gensequenz	HcPT-2 (1.143 bp)
Eingesetzte Matrize	HcPT-2 in pESC-URA / pFastBac™ 1
Expressionsprimer-Paare	„HcPT-2_oT_for“ und „HcPT-2_oT_rev“ / „HcPT-2_oT_for“ und „290_pFastBac_Re“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektoren	pESC-URA / pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>EcoRI</i> und <i>PacI</i> / <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Doppelverdau mit <i>EcoRI</i> und <i>PacI</i> / <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
→ DNA-Sequenzierung	

5.4.3.3. Fluoreszenzmarkierung von HcPT-2 und HcPT-2_oT

Um „HcPT-2“ und „HcPT-2_oT“ jeweils C-terminal mit einem eGFP zu fusionieren, wurde aus beiden PT-Genen das Stoppcodon entfernt und durch ein eGFP-Fluoreszenzgen ersetzt. Dadurch entstand aus beiden Einzelproteinen ein zur Fluoreszenz befähigtes Fusionsprotein, welches von einem einzigen, zusammenhängenden ORF codiert wurde.

Im ersten Schritt wurde das Gen für das eGFP vervielfältigt und in den Transfervektor pFastBac™ 1 kloniert, was zu einem ORF von 720 bp mit einem einzelnen Nukleobasen-Austausch an Position 651 (C statt T) führte, im Vergleich zur Original-eGFP-Sequenz. Weil es aber als stumme Mutation die 239 aa Proteinsequenz des Ausgangs-eGFP nicht abwandelte, wurde der mit dem eGFP-Gen versehene Transfer-Fusionsvektor als „pFastBac 1-GFP“ bezeichnet und weiterverwendet. Der folgende Schritt sah den Einbau der Gene „HcPT-2“ und „HcPT-2_oT“ in den Fluoreszenzprotein-markierten Transfervektor vor. Da die beiden in der PCR eingesetzten, rückwärts gerichteten Oligonukleotide in ihrer Sequenz ohne das Stoppcodon „TAG“ entworfen wurden, war somit nun der natürliche Translationsabbruch der PT-Proteinsequenzen entfernt, so dass während der Proteinbiosynthese die Translation über das Gen hinaus stattfinden konnte. Dadurch konnten die beiden PT-Gene derart in „pFastBac 1-GFP“ ligiert werden, dass sich die Sequenzen von „HcPT-2“ / „HcPT-2_oT“ und eGFP, getrennt durch ein 21 bp langes MCS-Fragment des Vektors, in einem gemeinsamen, ununterbrochenen ORF befanden. Die erhaltenen offenen Leserahmen „**HcPT-2-GFP**“ (1.881 bp) und „**HcPT-2_oT-GFP**“ (1.812 bp) lieferten beide eine durchgehende, sinnvolle Proteinsequenz von 626 bzw. 603 aa Länge.

Tabelle 5.7 Übersicht der Klonierung von HcPT-2-GFP / HcPT-2_oT-GFP zur Expression und Lokalisierung

Vorhandene Gensequenz	eGFP (720 bp)
Eingesetzte Matrize	eGFP in „pET-52b(+)-eGFP“ (Donorplasmid)
Primer-Paar	„pFB1_GFP_F“ und „pFB1_GFP_R“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>XhoI</i> und <i>HindIII</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „pFB1_Seq_for“ und „pFB1_Seq_rev“
→ DNA-Sequenzierung	
Vorhandene Gensequenzen	HcPT-2 (1.143 bp) / HcPT-2_oT (1.074 bp)
Eingesetzte Matrize	HcPT-2 / HcPT-2_oT in pFastBac™ 1
Expressionsprimer-Paar	„290_pFastBac_For“ und „HcPT-2_GFP-rev“ / „HcPT-2_oT_for“ und „HcPT-2_oT_GFP-rev“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac 1GFP
Restriktionsverdau mit REs	<i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „290_pFastBac_For“ und „HcPT-2_GFP-rev“ / „HcPT-2_oT_for“ und „HcPT-2_oT_GFP-rev“
→ DNA-Sequenzierung	

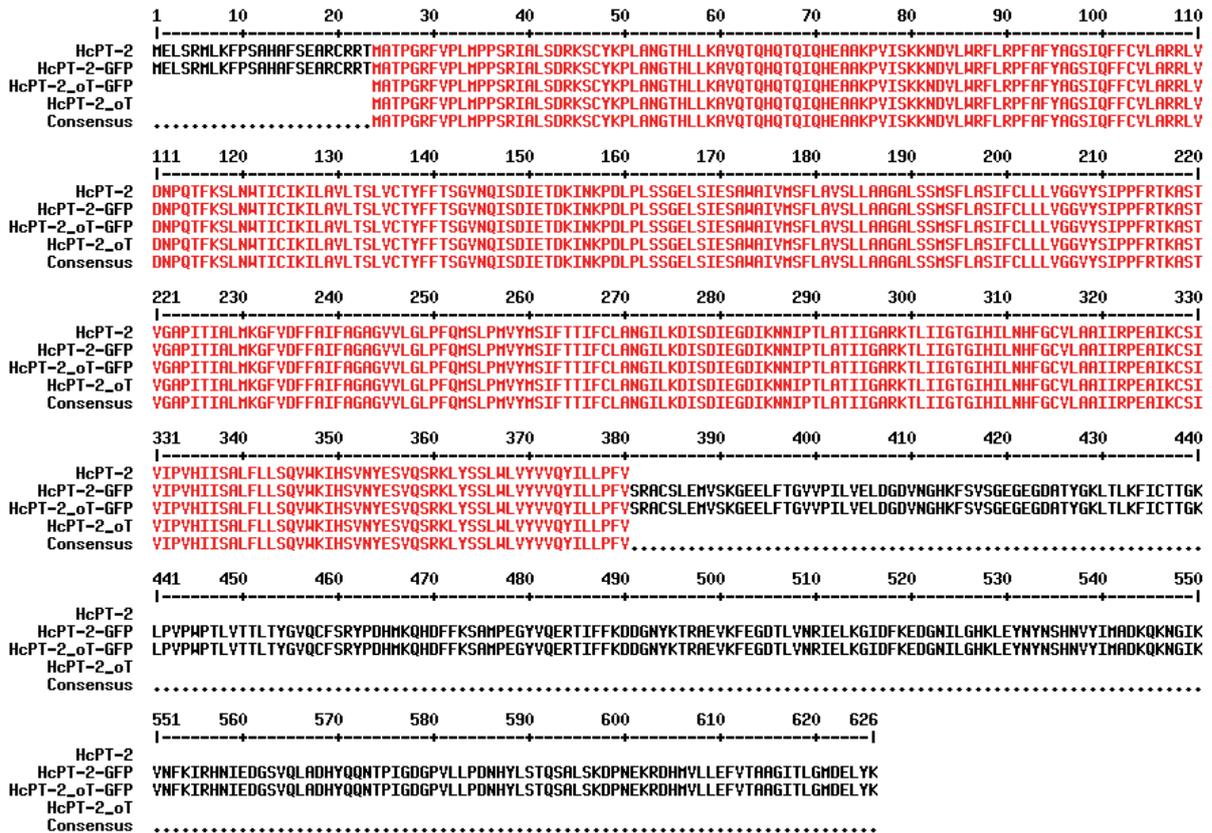


Abbildung 5.18 Übersicht der Aminosäure-Sequenzen aller klonierten HcPT-2-Konstrukte

5.4.4. Prenyltransferase HpPT-1 und eine Variante

5.4.4.1. Entwurf degenerierter Primer anhand konservierter PT-Motive

Das Gen „HpPT-1“ war die erste aromatische Prenyltransferase des Sekundärstoffwechsels, die aus der Art *H. perforatum* isoliert und kloniert wurde. Weil zu Beginn der Klonierungsarbeiten noch keine DNA-/RNA-Datenbanken des Echten Johanniskrauts verfügbar waren, wurde zusammen mit MÜLLER^[220] als Ansatz die PT-Identifizierung mit degenerierten Oligonukleotiden gewählt. Dies war möglich, da bei pflanzlichen, aromatischen Sekundärstoffwechsel-PTs (zumindest Flavonoid-/Homogentisat-PTs) zwei konservierte Aspartat-reiche Regionen (siehe 5.2.3.1) in den Proteinsequenzen existierten^[162,163]. Dieser Information folgend wurden die Aminosäure-Sequenzen der bekannten Enzyme „GmG4DT“ (BAH22520.1)^[176], „HIPT-1“ (BAJ61049.1)^[238], „SfG6DT / SfiLDT“ (BAK52291.1 / BAK52290.1)^[175] und „Sfn8DT-1 / Sfl17a“ (B1B3P3.1 / BAG12674.1)^[177] mit den zuvor in unserer AG erarbeiteten PTs „Contig 290(HcPT-2)“ und „Contig 339 (HcPT-3)“ durch Alignments verglichen (Abbildung 5.19). Dabei fiel die Entscheidung zu Gunsten dieser PTs und gegen andere PTs aus *Sophora flavescens* und *Lithospermum erythrorhizon* aufgrund der zu großen Ähnlichkeit eben dieser PTs untereinander, wenn sie derselben Stammpflanze entstammten, oder aufgrund zu großer Sequenzähnlichkeit zu PTs des Primärmetabolismus.



Abbildung 5.19 Alignment zur Aminosäure-Sequenzvergleich von ausgewählten AS-PTs. Rot: hochkonservierte Aminosäuren – inkl. konservierter Domänen nach HEIDE^[162] und YAZAKI *et al.*^[163]; blau: semikonservierte Aminosäuren; →: Position des degenerierten Vorwärts-Primers „BIG_DEGEN_FOR“; ←: Position des degenerierten Rückwärts-Primers „BIG_DEGEN_REV“

Die beiden degenerierten Primer wurden nicht direkt von den Aminosäure-Sequenzen der beiden Motive („ETD(K/R)INKP“, „D(I/L)(P/S)D(I/M/T/V)(E/N)GD“) abgeleitet, weil im genetischen Code bis auf Methionin und Tryptophan alle proteinogenen Aminosäuren durch mehr als nur ein mögliches Nukleobasen-Triplett codiert werden. Die Oligonukleotide „BIG_DEGEN_FOR“ und „BIG_DEGEN_REV“ wurden stattdessen anhand der rückübersetzten Gensequenz als Matrize entworfen, um den Degenerationsgrad in den Primern möglichst gering zu halten (siehe 3.8). Bei fragwürdigen Entscheidungen der Primersequenz wurden die in „Contig 290(HcPT-2)“ und „Contig 339(HcPT-3)“ identischen Nukleobasen bevorzugt eingebaut und an Stellen, wo theoretisch alle vier Nukleobasen stehen konnten, Desoxyinosin eingesetzt für die finalen Sequenzen mit dem Degenerationsgrad von 256 bzw. 128.

5.4.4.2. Klonierung der Volllänge-PT HpPT-1 für Expressionsuntersuchungen

Mit cDNA von *H. perforatum*-Blüten als Matrize und den degenerierten Oligonukleotiden konnte schließlich nach mehreren Amplifikationsversuchen mit optimierten Bedingungen in (*Touchdown*)-Standard-PCRs ein ca. 400 bp langes cDNA-Fragment vervielfältigt und detektiert werden. Nach Aufreinigung der entsprechenden cDNA-Bande, Klonierung und Sequenzierung wurde bestätigt, dass die Primer eine 399 bp lange cDNA-Sequenz aus den Transkripten von *H. perforatum* extrahiert hatten, welche übersetzt auf Protein-Ebene die gesuchten Motive „ETDRINKP“ und „DISDVEGD“ innerhalb einer durchgehenden, sinnvollen Proteinsequenz zeigte. Von diesem bekannten Teilstück ausgehend wurden zur Verlängerung GSPs für die 3'-RACE-PCR sowie für die 5'-RACE-PCR entworfen. Die 3'-RACE-PCR ergab eine Verlängerung der CDS um 312 bp bis zu einem Stoppcodon und darüber hinaus weitere 250 bp bis zur polyadenylierten Sequenz, so dass hier vom gefundenen 3'-Ende des Gens und einem Stück 3'-UTR ausgegangen werden konnte. Untermuert wurde diese Annahme durch die Verknüpfung von Mittelfragment und dem Ergebnis der 3'-RACE-PCR, die in einer durchgehenden Proteinsequenz mündete. Die Suche nach dem 5'-Ende ergab nach einigen erfolglosen, optimierungsbedürftigen Klonierungsversuchen schließlich eine Verlängerung des ursprünglichen Mittelfragments um 522 bp, wobei in 5'-Richtung nach 486 bp ein ATG vorlag und nach weiteren 39 bp ein Stoppcodon, was ein Nachweis des gefundenen 5'-Endes und der 5'-UTR war.

Die Kombination aller drei Einzelstücke ergab einen theoretischen, zusammenhängenden ORF, der im Folgenden mit Primern aus den UTRs heraus über die gesamte CDS hinweg in einem Stück amplifiziert wurde. Die Bande von ca. 1.250 bp, die während der Klonierung gefunden wurde, stellte sich nach der DNA-Sequenzierung als der gesuchte, 1.182 bp messende ORF „**HpPT-1**“ heraus – codierend für ein 393 aa langes Enzym, das sequenzielle Ähnlichkeiten u.a. zu „HIPT-1“ zeigte.


Tabelle 5.8 Übersicht der HpPT-1-Suche und Verlängerung durch RACE-Klonierungen

Vorhandene Gensequenz	–
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> –Blüten
Primer-Paar	„BIG_DEGEN_FOR“ und „BIG_DEGEN_REV“
PCR-Anwendungen	(<i>Touchdown</i> -)Standard-PCRs
Klonierungsvektor	pGEM®-T easy
Restriktionsverdau mit REs	–
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i>
→ DNA-Sequenzierung	
Vorhandene Gensequenz	Mittelfragment (399 bp)
Eingesetzte Matrize	Mittelfragment (399 bp) in pGEM®-T easy
Primer-Paare	„To_PL.V6_3'R1, -2“ und „RACE long und RACE short“ / „To_PL.V6_5'R1, -2, -3“ und „RACE long und RACE short“
PCR-Anwendungen	(<i>Touchdown</i> -)Standard-PCRs
Klonierungsvektor	pGEM®-T easy
Restriktionsverdau mit REs	–
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i>
→ DNA-Sequenzierung	
Vorhandene Gensequenzen	5'-Ende, Mittelfragment, 3'-Ende (1.182 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> –Blüten
Primer-Paar	„PR.V6_FOR“ und „PR.V6_11.3,19.3“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR mit T/A-Klonierung
Klonierungs-/Expressionsvektor	pGEM®-T easy
Restriktionsverdau mit REs	–
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i>
→ DNA-Sequenzierung	

Die Expressionsvorbereitung lief mit dem „HpPT-1“-tragenden pGEM®-T easy als DNA-Matrize mit der Proofread-PCR ab. Das gesuchte PCR-Produkt wurde in Expressionsvektoren für Hefe- und Insektenzellen eingebracht und bis zur DNA-Sequenzierung kloniert, um die Identität von „HpPT-1“ in den Expressionskonstrukten zu bestätigen.

Tabelle 5.9 Übersicht der Klonierung von HpPT-1 zur Expression

Vorhandene Gensequenz	HpPT-1 (1.182 bp)
Eingesetzte Matrize	HpPT-1 in pGEM®-T easy
Expressionsprimer-Paar	„Tex_for_BamHI“ und „Tex_rev_KpnI“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektoren	pESC-URA / pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>BamHI</i> und <i>KpnI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „Tex_for_BamHI“ und „Tex_rev_KpnI“
→ DNA-Sequenzierung	

5.4.4.3. Verkürzung des Volllänge-Genes für Expressionsuntersuchungen

Wie unter 5.4.3.2 beschrieben wurde ein vorhergesagtes Transitpeptid vom Volllänge-Gen „HpPT-1“ entfernt, um die übrige, eigentliche Enzym-Sequenz zu exprimieren. Der neu abgeleitete, genspezifische Expressionsprimer band erst nach 213 bp (vom 5'-Ende aus gesehen) auf der CDS von „HpPT-1“, wodurch 71 aa am N-Terminus der PT abgeschnitten und gleichzeitig durch ein artifizielles Startcodon innerhalb der Primersequenz ersetzt wurden. Das auf diese Weise klonierte PT-Gen „HpPT-1_oT“ zählte 972 bp, jedoch mit sechs Nukleotid-Unterschieden innerhalb der verbliebenen Sequenz im Vergleich mit der langen Gen-Version. Auf Protein-Ebene beeinflusste dabei nur ein einziger Nucleobasen-Austausch die Sequenz, indem an Position 297 des kompletten Gens die Aminosäure Arginin durch Isoleucin ersetzt wurde. Diese Gen-Variante von „HpPT-1_oT“ wurde trotz der einen Mutation in INVSc1-Zellen auf Expression und Enzymaktivität untersucht.

Vorhandene Gensequenz	HpPT-1 (1.182 bp)
Eingesetzte Matrize	HpPT-1 in pESC-URA
Expressionsprimer-Paar	„PTF-1_cut_for“ und „Tex_rev_KpnI“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pESC-URA
Restriktionsverdau mit REs	<i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „PTF-1_cut_for“ und „Tex_rev_KpnI“
→ DNA-Sequenzierung	

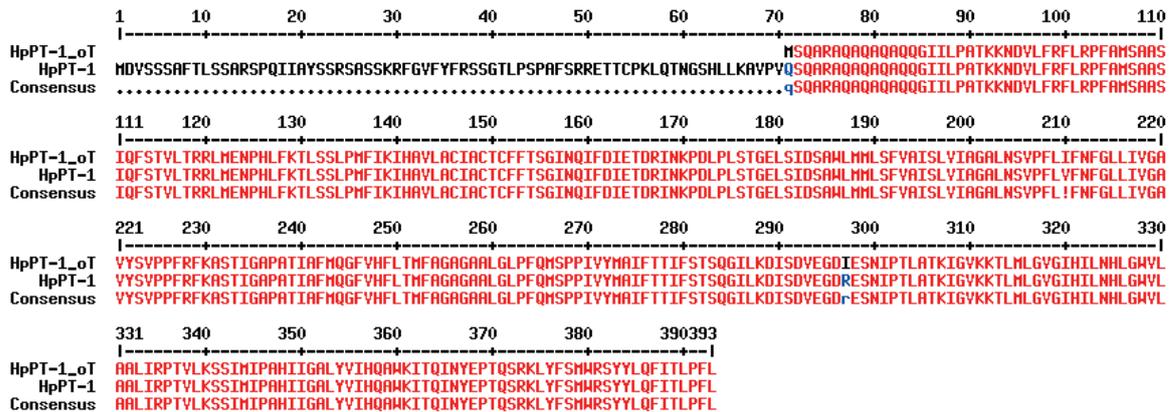


Abbildung 5.20 Übersicht der Verkürzung – Klonierung von HpPT-1_oT (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von ursprünglicher HpPT-1 und neu klonierter, verkürzter HpPT-1_oT (unten). Blaue Kleinbuchstaben im Consensus: Abweichende Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.5. Prenyltransferase HpPT-2

Das MPGR-Transkript „hpa_locus_9259“ (Länge: 1.275 bp) enthielt eine zusammenhängende CDS für eine putative PT, auf die direkt Expressionsprimer zur Bestätigung dieser Gensequenz entworfen wurden und die mittels Proofread-PCR als kompletter ORF bestätigt werden konnte. Das 1.176 Nukleotide messende Gen „HpPT-2“ ergab übersetzt ein sinnvolles, PT-ähnliches Protein, das sich durch zwei Aminosäure-Austausche (Abbildung 5.21) aufgrund zweier Gen-Mutationen an Position 148 (C statt T) und 694 (T statt A) von der Ursprungssequenz unterschied.



Vorhandene Gensequenz	hpa_locus_9259 (1.275 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten / -Knospen / HpPT-2 in pGEM®-T easy
Expressionsprimer-Paar	„9259_for_BamHI“ und „9259_rev_KpnI“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR (mit T/A-Klonierung)
Klonierungs-/Expressionsvektor	pGEM®-T easy / pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>EcoRI</i> / <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i> / Standard-PCR mit „9259_for_BamHI“ und „9259_rev_KpnI“
→ DNA-Sequenzierung	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
hpa_locus_9259	MAFSPLLSSSIRLSALCTFERSNSSFALNVKDISKRKLSAPVPKIIQIFPIIKLHPPIFCFSNMRPSEHVHRVNFMPKQDEPDRSNTLEERKPFYDVLWRFKPYVLVT											
HpPT-2	MAFSPLLSSSIRLSALCTFERSNSSFALNVKDISKRKLSAPVPKIIQILPIIKLHPPIFCFSNMRPSEHVHRVNFMPKQDEPDRSNTLEERKPFYDVLWRFKPYVLVT											
Consensus	MAFSPLLSSSIRLSALCTFERSNSSFALNVKDISKRKLSAPVPKIIQILPIIKLHPPIFCFSNMRPSEHVHRVNFMPKQDEPDRSNTLEERKPFYDVLWRFKPYVLVT											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
hpa_locus_9259	IGIGYICYTARTAFENRHLIGWSQLLKASGGLYALSSVYCYLNAIQIFDVEIDKINKPDSPIASGEMSELAWRLTIISVIALVYVGLKNEPLAYSIYALYLLGTIY											
HpPT-2	IGIGYICYTARTAFENRHLIGWSQLLKASGGLYALSSVYCYLNAIQIFDVEIDKINKPDSPIASGEMSELAWRLTIISVIALVYVGLKNEPLAYSIYALYLLGTIY											
Consensus	IGIGYICYTARTAFENRHLIGWSQLLKASGGLYALSSVYCYLNAIQIFDVEIDKINKPDSPIASGEMSELAWRLTIISVIALVYVGLKNEPLAYSIYALYLLGTIY											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
hpa_locus_9259	SVPPFSMKRSTMGAIIVSALGAGVYVTLVSSAARRASLGLPFVIGMPLSFLSIFLTLHCSAVAIKOLSDIDGDRKHVPTLTAIGVNRATFLATGIISVNYIGAIARA											
HpPT-2	SVPPFSMKRSTLGAIIIVSALGAGVYVTLVSSAARRASLGLPFVIGMPLSFLSIFLTLHCSAVAIKOLSDIDGDRKHVPTLTAIGVNRATFLATGIISVNYIGAIARA											
Consensus	SVPPFSMKRST\$GAIIVSALGAGVYVTLVSSAARRASLGLPFVIGMPLSFLSIFLTLHCSAVAIKOLSDIDGDRKHVPTLTAIGVNRATFLATGIISVNYIGAIARA											
	331	340	350	360	370	380	391					
hpa_locus_9259	IFHPQIFRHSYSIPAHAILSLCLIYQANKLDKGNKYKEEYEFYQVFVKLMFAEYILFLFI											
HpPT-2	IFHPQIFRHSYSIPAHAILSLCLIYQANKLDKGNKYKEEYEFYQVFVKLMFAEYILFLFI											
Consensus	IFHPQIFRHSYSIPAHAILSLCLIYQANKLDKGNKYKEEYEFYQVFVKLMFAEYILFLFI											

Abbildung 5.21 Übersicht der Klonierung von HpPT-2 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von klonierter HpPT-2 und vorliegendem Transkript (unten). Blauer Kleinbuchstabe/rotes Sonderzeichen im Consensus: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.6. Prenyltransferase HpPT-3

Die Klonierung dieser PT ging vom MPGR-Transkript „hpa_locus_4472“ (Länge: 1.390 bp) aus, das mit großen FPKM-Werten in Blütenbestandteilen hoch exprimiert war, jedoch als Transkriptom-Sequenz selber aufgrund von fehlerhaftem Zusammenbau aus kürzeren Fragmenten zu keiner sinnvollen Proteinsequenz führte. Ein 687 bp langer, zusammenhängender Bereich codierte für ein Mittelfragment ohne beide Gen-Enden, das aber beide konservierte Motive aromatischer Sekundärstoffwechsel-PTs aufwies. Ein weiteres Teilstück des Transkripts zeigte in einem anderen Leserahmen ein mögliches 3'-Ende, das es zu beweisen galt (Abbildung 5.22). Mittels RACE-PCRs wurde zuerst das vermutliche 3'-Ende als das tatsächliche Gen-Ende identifiziert (Verlängerung um 282 bp bis zum Stoppcodon plus 138 bp 3'-UTR bis zum polyadenylierten Sequenzende). Dann wurden vielfache Versuche unternommen das 5'-Ende durch 5'-RACE-PCR zu entdecken. Da letztlich dank diverser Protokoll-Abwandlungen ein 5'-Ende gefunden wurde, dieses jedoch mit einem erneuten Leserahmen-Wechsel zwischen dem Startcodon und dem restlichen Genstück einhergehend, wurde zunächst das Genfragment zwischen dem enthüllten 5'-UTR (77 bp vor dem ATG) und den rückwärts gerichteten 5'-RACE-Primern amplifiziert und untersucht. Dadurch konnte im Endeffekt der durchgehende ORF aufgedeckt werden, und nach Bestätigung des 5'-Endes (210 bp Mittelstück-Verlängerung bis zum Startcodon) wurde mit Expressionsprimern die vollständige CDS „**HpPT-3**“ (1.185 bp) kloniert. Das 394 aa lange Protein zeigte im Vergleich zum übersetzten Transkript sechs Aminosäure-Austausche, bedingt durch neun variierte Nukleobasen im Gegensatz zum abzugeleichenden Transkript.

Vorhandene Gensequenz	hpa_locus_4472 (1.390 bp)
Eingesetzte Matrice	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Primer-Paare	„4472_for1, -2“ und „RACE long und RACE short“ / „4472_rev1, -2“ und „RACE long und RACE short“
PCR-Anwendungen	(<i>Touchdown</i> -)Standard- / Proofread-PCR mit T/A-Klonierung
Klonierungs-/Expressionsvektor	pGEM®-T easy
Restriktionsverdau mit REs	–
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i>
→ DNA-Sequenzierung	
Vorhandene Gensequenz	hpa_locus_4472 (1.390 bp)
Eingesetzte Matrice	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Primer-Paare	„PT4472_F1, -F2“ und „4472_rev1, -2“
PCR-Anwendungen	(<i>Touchdown</i> -)Standard-PCRs
Klonierungsvektor	pGEM®-T easy
Restriktionsverdau mit REs	–
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i>
→ DNA-Sequenzierung	
Vorhandene Gensequenzen	5'-Ende, Mittelfragment, 3'-Ende (1.185 bp)
Eingesetzte Matrice	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Expressionsprimer-Paar	„PT4472_F_EX“ und „PT4472_R_EX“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR (mit T/A-Klonierung)
Klonierungs-/Expressionsvektor	pGEM®-T easy / pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	– / <i>BamHI</i> und <i>KpnI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Verdau mit <i>EcoRI</i> / Standard-PCR mit „PT4472_F_EX“ und „PT4472_R_EX“
→ DNA-Sequenzierung	

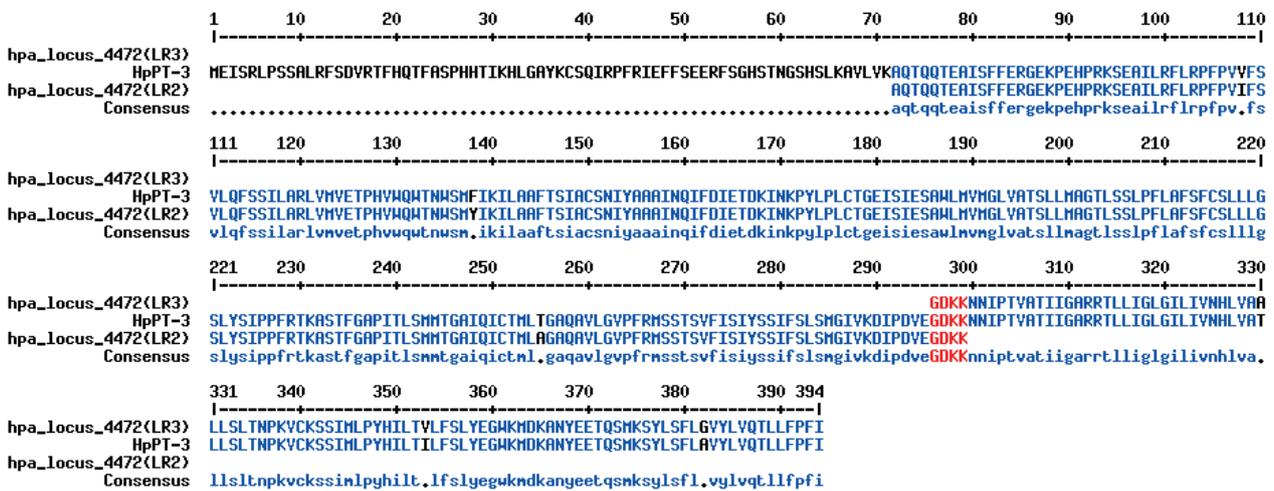


Abbildung 5.22 Übersicht der Transkript-Verlängerung durch RACE-PCR und Klonierung von HpPT-3 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von klonierter HpPT-3 mit vorliegendem Transkript (in zwei unterschiedlichen Leserastern; unten). LR: Leseraster; schwarze Buchstaben: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.7. Prenyltransferase HpPT-4

Mit Hilfe der Sequenz „hpa_locus_8393“ aus dem MPGR-Transkriptom wurde die nächste PT entdeckt und isoliert. In der 1.587 bp langen cDNA-Sequenz, exprimiert in Blüten und Blättern von *H. perforatum*, fanden sich die beiden typischen Aspartat-reichen Motive und ein wahrscheinlicher N- und C-Terminus einer PT, wobei beide Enden in verschiedenen Leserastern auftauchten (Abbildung 5.23). Unvorteilhafter



Weise ergab die cDNA keinen vollständigen ORF und codierte somit auch nicht für eine sinnvolle Proteinsequenz, was vermutlich durch einen fehlerhaften Fragment-Einbau ins Transkript beim Erstellen der Datenbank ausgelöst wurde. Da jedoch beide vermutlichen Gen-Enden eindeutig identifiziert waren und nur die Verbindung der beiden sich teilweise überlappenden ORF-Teilstücke (198 bp und 1.059 bp) unentdeckt war, wurde letztlich mit Erfolg versucht, das 1.146 bp messende Gen „**HpPT-4**“ direkt mit Expressionsprimern aus cDNA zu klonieren. Die finale DNA-Sequenzierung enthüllte ein 28 Nukleotide langes Insert zwischen den ursprünglichen Fragmenten mit Start- und Stoppcodon, was zu der ursprünglichen Rasterverschiebung geführt hatte. Darüber hinaus gab es zusätzlich 16 Nucleobasen-Austausche in der CDS, was zu 5 aa Unterschied im Genprodukt führte.

Vorhandene Gensequenz	hpa_locus_8393 (1.587 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Expressionsprimer-Paar	„hpa_8393_for“ und „hpa_8393_rev“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „hpa_8393_for“ und „hpa_8393_rev“
→ DNA-Sequenzierung	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
hpa_locus_8393(LR2)												ACSEAGASGSDPVSKKYVDFRDACWRFLRPHTIRGTLGSTALVA
HpPT-4	MELSIFPSSLRVNPSRLPSSTLEANPPIGPPVFKFRRLTVSASLGGLRASRSCSSRRYRPCSIRACSEAGASGSDPVSKKYVDFRDACWRFLRPHTIRGTLGSTALVA											
hpa_locus_8393(LR1)	MELSIFPSSLRVIPSRPSSTLEANPPIGPPVFKFRRLTVSASLGGLRAGRSCSSRRYRPCSIR											
Consensus	melsifpsslr,psrlpsstleanppigppvfkfrlltvsaslgglra,rscssrryrpcsiracseagasgdpvskk,vdfrdacwrlrphtrigt.lgstalva											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
hpa_locus_8393(LR2)	RALIENPHLIRMSLVLKALSGLLALICGNGYIVGINQIYDIGIDKYNKPYLPIAAGDLSVQSALLVILFVAVAGVLIYGVNFGPFITKLYTFGLFLGTIYSVPPFRMKRF											
HpPT-4	RALIENPHLIRMSLVLKALSGLLALICGNGYIVGINQIYDIGIDKYNKPYLPIAAGDLSVQSALLVILFVAVAGVLIYGVNFGPFITKLYTFGLFLGTIYSVPPFRMKRF											
hpa_locus_8393(LR1)	RALIENPHLIRMSLVLKALSGLLALICGNGYIVGINQIYDIGIDKYNKPYLPIAAGDLSVQSALLVILFVAVAGVLIYGVNFGPFITKLYTFGLFLGTIYSVPPFRMKRF											
Consensus	ralienphlirmslvlkalsgllallicgngyivginqiydigidkynkpylpiaggdlsvqsallvilfavagvliygvnfgpfitklytfglflgtiysvppfrmkrf											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
hpa_locus_8393(LR2)	AVVAFLLIATVRGFLNFGVYHATRAALGLPFVWSSPVAFITSFVSLFALYIATKDLPDVEGDRKFQISTLATTLGVRNIAFLGTGLLLNLYVGAILAIIYMPQAFRRS											
HpPT-4	AIVAFLLIATVRGFLNFGVYHATRAALGLPFVWSSPVAFITSFVSLFALYIATKDLPDVEGDRKFQISTLATTLGVRNIAFLGTGLLLNLYVGAILAIIYMPQAFRRS											
hpa_locus_8393(LR1)	AIVAFLLIATVRGFLNFGVYHATRAALGLPFVWSSPVAFITSFVSLFALYIATKDLPDVEGDRKFQISTLATTLGVRNIAFLGTGLLLNLYVGAILAIIYMPQAFRRS											
Consensus	a,vaflliatvrgflnfgvyhatraalglpfvwsspvafitsfvslfalviatkdldpvegdrkfqistlattlgvrniaflgtglllnlyvgailaaiympqafrrs											
	331	340	350	360	370	381						
hpa_locus_8393(LR2)	LMIPAHNSILALCLIFQAWALEQANYTKEAISAFYRFINLIFYAEYALFPFI											
HpPT-4	LMIPAHNSILALCLIFQAWALEQANYTKEAISAFYRFINLIFYAEYALFPFI											
hpa_locus_8393(LR1)	LMIPAHNSILALCLIFQAWALEQANYTKEAISAFYRFINLIFYAEYALFPFI											
Consensus	lmipahnsilalclifqawaleqanytkeaisafyrfiwnlfyaeyalfpfi											

Abbildung 5.23 Übersicht der Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-4 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von klonierter HpPT-4 mit nützlichem Transkript-Bereich (in zwei verschiedenen Leserastern; unten). LR: Leseraster; schwarze Buchstaben: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.8. Prenyltransferase HpPT-5

Das fast vollständige PT-Gen „Contig10745“, das 3.031 Nukleotide lang war und 1.196 bp einer durchgehenden CDS beinhaltete (beide konservierte PT-Motive und den C-Terminus), wurde als Matrize für die 5'-RACE-PCR eingesetzt in der vergeblichen Hoffnung durch (*Touchdown*-)Standard- und Proofread-PCR das 5'-Ende zu identifizieren. Der Erfolg stellte sich erst ein, als durch die Transkriptom-Analyse (siehe 5.2.2) das zu „Contig10745“ passende Transkript „ctg038903“ mit möglichem 5'-Ende entdeckt wurde. Durch Kombination beider Genfragmente entstand ein putativer ORF, der in der nachfolgenden Klonierung auch direkt in einem Stück bestätigt werden konnte. „**HpPT-5**“ maß 1.236 bp (sieben Nukleotide Unterschied zu den Transkripten), d.h. das übersetzte Protein von 411 aa Länge wich letztlich durch fünf Aminosäure-Austausche von den Transkriptom-Sequenzen ab.

Vorhandene Gensequenzen	Contig10745 (3.031 bp) / ctg038903 (209 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Expressionsprimer-Paar	„10745_BamHI_for“ und „10745_KpnI_rev“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>Bam</i> HI und <i>Kpn</i> I
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „10745_BamHI_for“ und „10745_KpnI_rev“
→ DNA-Sequenzierung	

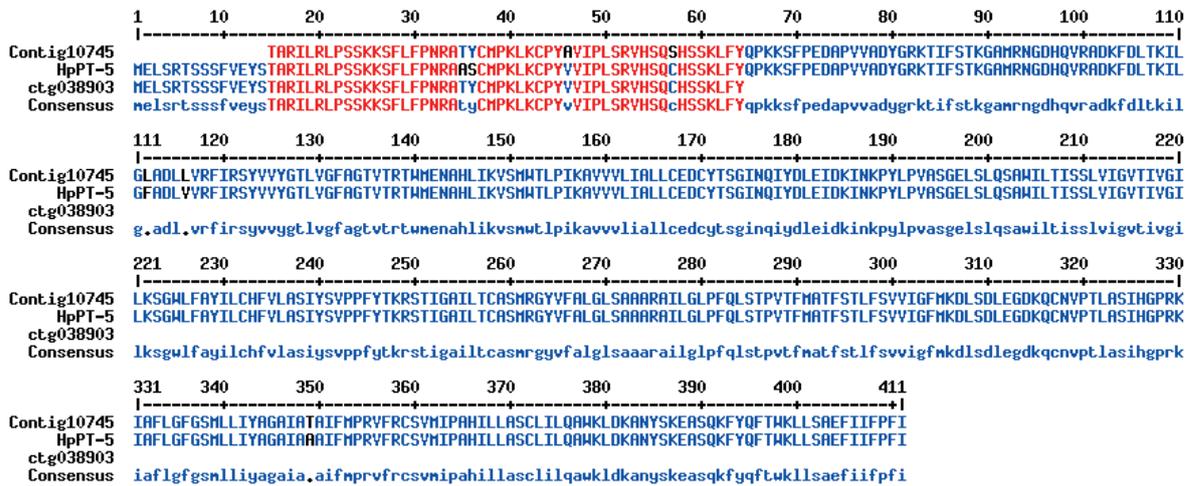


Abbildung 5.24 Übersicht der Volllänge-Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-5 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von klonierter HpPT-5 mit vorliegenden Transkript-Daten (unten). Schwarze Buchstaben: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.9. Prenyltransferase HpPT-6

Aus den beiden ca. 900 bp langen cDNA-Fragmenten „hpa_locus_15746“ und „Singlet16042“ ließ sich während der Transkriptom-Analyse (siehe 5.2.2) ein weiteres putatives PT-Gen zusammensetzen, das als Protein alle typischen Merkmale einer AS-PT mitbrachte (siehe 5.2.3). Von dieser Sequenz ausgehend wurde der vollständige ORF „**HpPT-6**“ (1.176 bp) kloniert, der sowohl sieben Nukleobasen-Austausche als auch den Einschub drei zusätzlicher Nukleotide (TTC) an Position 102–104 aufzeigte – und sich somit durch letztlich fünf unterschiedliche Aminosäuren sowie ein zusätzliches Serin von der vorhergesagten Proteinsequenz abgrenzte (Abbildung 5.25).



Vorhandene Gensequenzen	hpa_locus_15746 (954 bp) / Singlet16042 (894 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Expressionsprimer-Paar	„15746_BamHI_for“ und „15746_XhoI_rev“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „15746_BamHI_for“ und „15746_XhoI_rev“
→ DNA-Sequenzierung	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
hpa_locus_15746	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----											
HpPT-6	METFRFPSSALRLSDVRSRQIVASPLHTLQSGIS-KPISKYSPIRPTRIESTFGKTCSSSTRITNRTHLLKAFVYKAHAQEQQGQAKSHLGKNSDAIWRFLRPFVVIATLI											
Singlet16042	METFRFPSSALRLSDVRSRQIVASPLHTFQSGISSRPISKYSPIRPTRIESTFGKTCSSSTRITNRTHLLKAFVYKAHAQEQQGQAKSHLGKNSDAIWRFLRPFVVIATLI											
Consensus	metfrfpssalrldsdrsqrivasplht.qsgis..piskyspirptriestfgktsstrtrtnrthllkafvpykahaqeqqqakshlgknsdaiwrflrpfvviatl.											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
hpa_locus_15746	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----											
HpPT-6	QFSSFIARLAVENPNTFQHSNWSHLAKAFMVFTSLSCANVYATGVNQIFDIETDKINKPHLPLCSGEVSMESALMVMSFVAISLLAAGTVNSVVPFLALNALLLVASSY											
Singlet16042	QFSSFIARLAVENPNTFQHSNWSHLAKAFMVFTSLSCANVYATGVNQIFDIETDKINKPHLPLCSGEVSMESALMVMSFVAISLLAAGTVNSVVPFLALNALLLVASSY											
Consensus	qfssfiarlavenpntfqsnswnslakafmvftslscanvyatgvnqifdietskinkphlplcsgevsmESALMVMSFVAISLLAAGTVNSVVPFLALNALLLVASSY											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
hpa_locus_15746	----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- ----- -----											
HpPT-6	SIPPLRAKASTFGAPIVNSMLDGSVQFLATFAGGVAALGLPFQMSLPHVFMWTFSSIFFFSMGILKIDIPDIEGDRKTNISIPPLRAKASTFGAPIVNSMLDGSVQFLATFAGGVAALGLPFQMSLPHVFMWTFSSIFFFSMGILKIDIPDIEGDRKTNIP											
Singlet16042	SIPPLRAKASTFGAPIVNSMLDGSVQFLATFAGGVAALGLPFQMSLPHVFMWTFSSIFFFSMGILKIDIPDIEGDRKTNIP											
Consensus	SIPPLRAKASTFGAPIVNSMLDGSVQFLATFAGGVAALGLPFQMSLPHVFMWTFSSIFFFSMGILKIDIPDIEGDRKTNIP											
	331	340	350	360	370	380	391					
hpa_locus_15746	----- ----- ----- ----- ----- ----- -----											
HpPT-6	LMKPEVFKSNMIPAHIIISIIYEIQAKMDRANYEATQSKTIYVSIAYVLYQILLFPFI											
Singlet16042	LMKPEVFKSNMIPAHIIISIIYEIQAKMDRANYEATQSKTIYVSIAYVLYQILLFPFI											
Consensus	lmkpevfksnmipahiiisiiyeiqakmdrangeatqs.k.yvsiayvlyqillfpfi											

Abbildung 5.25 Übersicht der Volllänge-Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-6 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von klonierter HpPT-6 mit vorliegenden Transkript-Daten (unten). Schwarze Buchstaben: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.10. Prenyltransferase HpPT-7

Aus dem 1KP-Transkriptom wurde mit der cDNA „scaffold-BNDE-2095043“ eine 1.317 bp lange Sequenz gewonnen, die während der Transkriptom-Analyse in verschiedenen Abgleichen mehrfach als vollständiger ORF einer PT bestätigt wurde. Daher wurde der direkte Ansatz gewählt, mit Expressionsprimern die Volllänge-Klonierung anzugehen, was nach mehreren Modifizierungen am Protokoll in dem Gen „**HpPT-7**“ resultierte. Diese PT war wie die CDS im zu Grunde liegenden Transkript 1.227 Nucleobasen lang, auf DNA- sowie folglich auch auf Protein-Ebene absolut identisch zur vorgegebenen Datenbank-Sequenz und codierte für ein 408 aa langes Protein.

Tabelle 5.10 Übersicht der Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-7 zur Expression

Vorhandene Gensequenz	scaffold-BNDE-2095043 (1.317 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Expressionsprimer-Paar	„2095043_BamHI_for“ und „2095043_XhoI_rev“
PCR-Anwendungen	(<i>Touchdown</i> -)Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „pFB1_Seq_for“ und „2095043_XhoI_rev“ / „2095043_BamHI_for“ und „pFB1_Seq_rev“
→ DNA-Sequenzierung	

5.4.11. Prenyltransferase HpPT-8

Ebenfalls aus dem 1KP-Transkriptom stammte die 1.285 Nukleobasen lange cDNA „scaffold-BNDE-2013053“ – mit einem 1.170 bp messenden ORF, der in der Transkriptom-Analyse mehrfach als vollständige PT verifiziert wurde. Mit Expressionsprimern wurde die Volllänge-Klonierung von Start- bis Stoppcodon des Gens initiiert, und nach leichten Abänderungen der Standardbedingungen wurde die zusammenhängende, vollständige PT-Sequenz „HpPT-8“ erhalten. Die Ähnlichkeit zum oder gar die Identität des ursprünglichen Transkripts konnte in diesem Fall nicht nachgewiesen werden, da sich zwar die auf das Transkript entworfenen genspezifischen Primer wie geplant anlagerten, jedoch eine andere als die erwartete PT-Sequenz amplifizierten. In der DNA-Sequenzierung wurde ein 1.182 bp langer ORF enthüllt, der zwischen den Regionen der verwendeten Oligonukleotide insgesamt 101 ausgetauschte Nukleobasen sowie einen zusammenhängenden, 12 bp langen Einschub an Position 221–232 aufwies. Für das übersetzte Protein bedeutete dies eine Aminosäure-Sequenz, die sich nicht nur durch 42 aa im codierten Bereich unterschied (ca. 89% Sequenzähnlichkeit), sondern auch vier Aminosäuren länger war als die vom Transkriptom vorhergesagte Sequenz (Abbildung 5.26). Somit blieb festzuhalten, dass erfolgreich das Gen einer weiteren AS-PT isoliert wurde, es sich aber weder um das gesuchte Transkript noch um eine Isoform dessen handeln konnte, weil dafür zu große Sequenzunterschiede vorlagen.

Vorhandene Gensequenz	scaffold-BNDE-2013053 (1.285 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> –Blüten
Expressionsprimer-Paar	„2013053_BamHI_for“ und „2013053_XhoI_rev“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>Bam</i> HI und <i>Xho</i> I
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „2013053_BamHI_for“ und „2013053_XhoI_rev“
→ DNA-Sequenzierung	

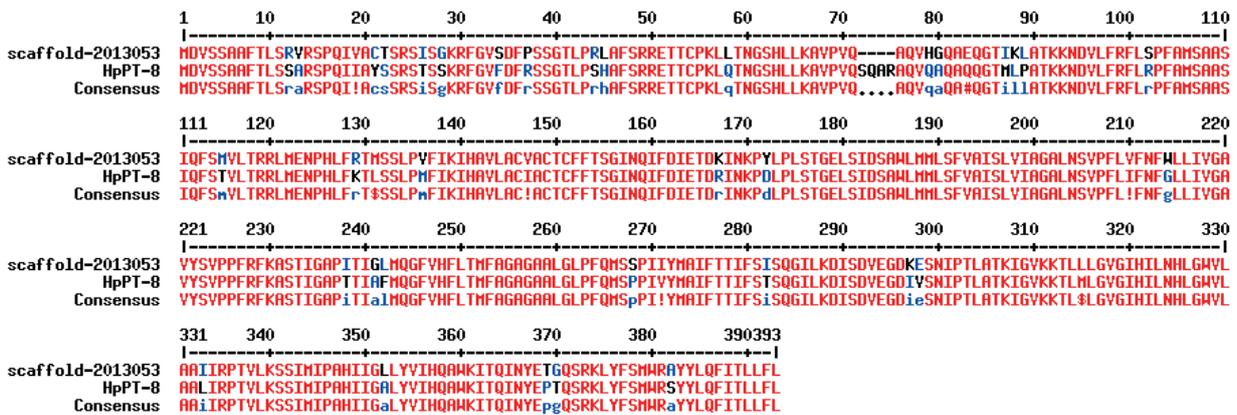


Abbildung 5.26 Übersicht der Klonierung von HpPT-8 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von klonierter HpPT-8 mit vorliegender Transkript-Sequenz (unten). Blauer Kleinbuchstabe/rotes Sonderzeichen im Consensus: Unterschiedliche Aminosäuren im Protein-Alignment

5.4.12. Prenyltransferase HpPT-9

Die molekularbiologische Analyse von „HpPT-9“ basierte auf der Volllänge-cDNA „HpPT-470“ (siehe 5.2.1) von MÜLLER^[220] und wurde entsprechend der Klonierungen von „HcPT-1–3“ durchgeführt. Die neu klonierte, erhaltene CDS „HpPT-9“ zeigte mit einem ORF von 1.158 bp (entsprechend 385 aa) eine identische Länge wie die Ausgangssequenz, unterschied sich allerdings durch 23 Nukleobasen von dem zur Verfügung gestellten Gen bzw. durch 19 Aminosäuren von der übersetzten Proteinsequenz (Abbildung 5.27).



Vorhandene Gensequenz	„HpPT-470“ (1.158 bp)
Eingesetzte Matrize	cDNA aus <i>H. perforatum</i> -Blüten
Expressionsprimer-Paar	„470_pFastBac_For“ und „470_pFastBac_Re“
PCR-Anwendungen	Proofread-PCR
Expressionsvektor	pFastBac™ 1
Restriktionsverdau mit REs	<i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>
Plasmid-Insert-Kontrolle	Standard-PCR mit „470_pFastBac_For“ und „470_pFastBac_Re“
→ DNA-Sequenzierung	

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110
HpPT-9	MEISCFPSA ^r YRFS ^r DLRCHQIVAS ^r PRLP ^r AKLLGRASSKYSQIS ^r PSR ^r ISIS ^r GRKGC ^r SVLLPNSKRIL ^r KPALLQVQAT ^r FDASDEK ^r DDV ^r EKK ^r IDPR ^r IQFAIQYTFYQFS ^r											
HpPT-470	MEISCFPSA ^r LRFS ^r DLRCHQIVAS ^r PRLP ^r AKLLGRASSKYSQIS ^r PSR ^r LSIS ^r RRKGC ^r SVLLPNSKRIL ^r KPAPLQVQAT ^r FDASNEK ^r DDV ^r EKK ^r EKTOPR ^r MQFAIQYTFYQFS ^r											
Consensus	MEISCFPSA ^r LRFS ^r DLRCHQIVAS ^r PRLP ^r AKLLGRASSKYSQIS ^r PSR ^r LSIS ^r RRKGC ^r SVLLPNSKRIL ^r KPAPLQVQAT ^r FDAS#EK ^r DDV ^r EKK ^r IDPR ^r IQFAIQYTFYQFS ^r											
	111	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220
HpPT-9	ILARRL ^r VENPHVLQGLN ^r LMIIK ^r LAAFV ^r SYACANSYHIG ^r INDIYDIEIDK ^r INRPDLRLTSRDQQTAWAILLGLVAISLLIAGISKSV ^r PFVIFIFASHFLSS ^r YSIPPLR											
HpPT-470	ILARRL ^r VENPHVLQGLN ^r LMIIK ^r LAAFV ^r SYACANSYHIG ^r INDIYDIEIDK ^r INRPDLRLTSRDQQTAWAILLGLVAISLLIAGISKSV ^r PFVIFIFASHFLSS ^r YSIPPLR											
Consensus	ILARRL ^r VENPHVLQGLN ^r LMIIK ^r LAAFV ^r SYACANSYHIG ^r INDIYDIEIDK ^r INRPDLRLTSRDQQTAWAILLGLVAISLLIAGISKSV ^r PFVIFIFASHFLSS ^r YSIPPLR											
	221	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330
HpPT-9	TKYSTL ^r GAPSTNGLLQGF ^r TLFFATY ^r YGAGARLGLPFQMSL ^r PMK ^r SHSIFNIIY ^r STLGF ^r LKDIRMEGD ^r I ^r NNIPTIALTIGARKTQLIGTCILVINHLFAYMIAATNLKA											
HpPT-470	TKYSTL ^r GAPSTNGLLQGF ^r ALFFATY ^r YGAGARLGLPFQMSL ^r PMK ^r SHSIFNIIY ^r STHGF ^r LKDIRMEGD ^r SKNNIPTIALTIGARKTQLIGTCILVINHLFAYMIAATNLKA											
Consensus	TKYSTL ^r GAPa ^r TNGLLQGF ^r aLFFATY ^r YGAGARLGLPFQMSL ^r PMk ^r fSHSIFNIIY ^r aSTHGF ^r LKDIRMEGD ^r i ^r NNIPTIALTIGARKTQLIGTCILVINHLFAYMIAATNLKA											
	331	340	350	360	370	380	385					
HpPT-9	FKSHIM ^r YPGHILSIF ^r YLLYQ ^r TKMERANYEKAQNI ^r ESYVGFARNYL ^r AHLILL ^r LPFI											
HpPT-470	FKSHIM ^r IPGHILSIF ^r YLLYQ ^r TKMERANYEKAQNI ^r ESYVGFARNYL ^r AHLILL ^r LPFI											
Consensus	FKSHIM ^r !PGHILSIF ^r YLLYQ ^r TKMERANYEKAQNI ^r ESYVGFARNYL ^r AHLILL ^r LPFI											

Abbildung 5.27 Übersicht der Klonierung von HpPT-9 zur Expression (oben) sowie Aminosäure-Sequenzvergleich von ursprünglicher und neu klonierter, untersuchter HpPT-9-Sequenz (unten). Blaue Kleinbuchstaben/rote Sonderzeichen im Consensus: Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz der beiden verglichenen Gene

5.5. Expressionsanalyse von Prenyltransferasen

5.5.1. Prenyltransferase-Expressionssysteme

Für die untersuchten PTs aus Johanniskraut wurden Hefezellen und Insektenzellen (siehe 3.6) als eukaryotische Expressionswirte ausgewählt. Bakterien als prokaryotische Wirtszellen schieden aufgrund vorhergesagter Membranintegrität der untersuchten PT-Gene (siehe 5.2) und negativer Erfahrungen in unserer AG mit Membranproteinen in *E. coli*-Standardzellen aus.

Die Mehrzahl aller bis heute publizierten AS-PTs aus Pflanzen, die kloniert und als rekombinante Proteine untersucht wurden, stammt aus Hefezellen. Daher lag es nahe die ersten Expressionsversuche ebenfalls in den in unserer AG etablierten Hefezellen (*S. cerevisiae*) zu unternehmen. In einem ersten Ansatz wurde die zuerst entdeckte und klonierte „HpPT-1“ als erste PT aus *H. perforatum* getestet. Außerdem wurde parallel zu der Methode von SHEN *et al.*^[174] und AKASHI *et al.*^[176] von „HpPT-1“ das vorhergesagte Transitpeptid entfernt (siehe 5.4.4.3) und diese verkürzte Gen-Variante „HpPT-1_oT“ parallel zum Volllänge-Gen untersucht. Auf gleiche Weise wurde außerdem mit „HcPT-2“ / „HcPT-2_oT“ vorgegangen, so dass mit zwei Volllänge- und zwei verkürzten Sequenzen insgesamt vier PT-Gene in Hefe überexprimiert wurden (siehe 4.4.1). Die Extraktion von Hefezellen nach induzierter Proteinbiosynthese (siehe 4.5.1) ergab nach dem Zellaufschluss im Rohextrakt Proteinmengen von durchschnittlich 2,60 µg/µl und in der Mikrosomen-Fraktion zwischen 1,15–3,51 µg/µl, mit denen Expressions-/Aktivitätsnachweise angegangen wurden.

Nachdem sich den Erfahrungen in unserer AG zufolge weder Prokaryoten noch einfache eukaryotische Wirtszellen (*S. cerevisiae*) als Produktionsplattform rekombinanter PTs aus Johanniskraut eigneten, wurde das Insektenzell-Baculovirus-System (siehe 4.4.2) als komplexeres eukaryotisches Expressionssystem herangezogen. Mit diesem Schritt gelang es schließlich das erste Mal überhaupt für rekombinante PTs aus Johan-

niskraut eine erfolgreiche Expression zu demonstrieren und das derzeit geeignetste Expressionssystem zu etablieren. Nach Infektion der Insektenzellen wurden diese nach abgelaufener Inkubationszeit aufgeschlossen, die untersuchten Proteinmengen der aufgereinigten mikrosomalen Fraktionen bestimmt (1,12–4,84 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und für Expressions- bzw. Aktivitätsuntersuchungen eingesetzt.

5.5.2. Versuche der Expressionskontrolle durch denaturierende Protein-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der SDS-PAGE ließen sich fast keine Aussagen über den Erfolg von PT-Expression in den verwendeten eukaryotischen Wirtszellen treffen. Sowohl die Untersuchungen in Hefezellen als auch in den Sf9-Zellen wurden mit der Protein-Gelelektrophorese verfolgt, jedoch ohne einen eindeutigen Informationsgewinn zu verzeichnen.

Bei dem Versuch die beiden in *S. cerevisiae* exprimierten und daraus extrahierten PTs „HcPT-2“ / „HcPT-2_oT“ und „HpPT-1“ / „HcPT-1_oT“ mittels SDS-Gelelektrophorese nachzuweisen, wurden im Vergleich zur gleichbehandelten pESC-URA-Leervektor-Kontrolle weder eine zusätzliche, hervorzuhebende Bande noch eine verstärkte Bandenintensität im erwarteten Größenbereich von 42–43 kDa festgestellt, auch nicht im für membrangebundene Proteine typischerweise darum liegenden Bereich^[284]. In zwei biologischen Wiederholungen des Experiments wurden gleichfalls identische, negative Resultate erzielt.

Bei der Analyse isolierter Protein-Fractionen aus Insektenzellen war in der SDS-PAGE die Unterscheidung zwischen infizierten, PT-produzierenden Wirtszellen und einer nicht-induzierten Kultur als Referenz immerhin möglich, wenn auch nicht eindeutig im Hinblick auf das gesuchte Zielprotein. Beispielsweise zeigten mit „HcPT-2“ infizierte Insektenzellen – stellvertretend als Muster für alle PTs – ein leicht verändertes, intensiveres Protein-Bandenmuster im Vergleich zur PT-freien Negativkontrolle, jedoch keine eindeutige Genprodukt-Bande im erwarteten Größenbereich von ca. 42 kDa. Auch bei der Nachverfolgung des Ziel-Proteins während der Protein-Isolierung konnte in keiner der unterschiedlichen Fraktionen eine hervorstechende PT-Bande identifiziert werden, die aufgrund großer Intensität für eine Überexpression sprach. Lediglich im zellfreien Überstand wurde eine deutliche, stark ausgeprägte Bande bei ca. 66 kDa ausgemacht, die allerdings keinen Zusammenhang zu überexprimierten Johanniskraut-PTs bot: Die Proteinbande in der löslichen Fraktion war deutlich zu groß im Vergleich mit den erwarteten AS-PTs und konnte auf das dem Sf9-Medium zugesetzte Albumin aus dem Rinderserum zurückgeführt werden (Abbildung 5.28).

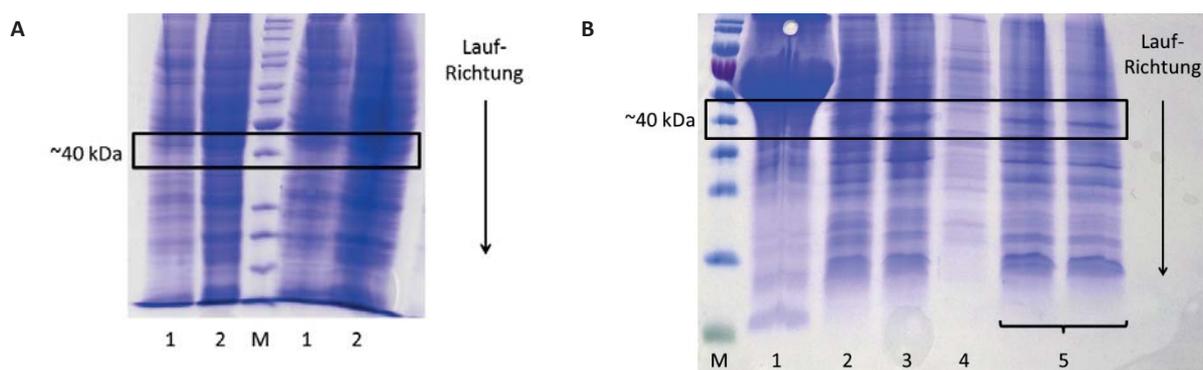


Abbildung 5.28 SDS-PAGE extrahierter Proteine aus Insektenzellen zur Übersicht und Expressionsanalyse von HcPT-2. **A:** Vergleich von nicht-infizierten (1) und mit HcPT-2 infizierten (2) Sf9-Zellen mit zwei unterschiedlichen Auftragsmengen (links je 5 μl , rechts je 10 μl), 72 h nach der Infektion. **B:** Vergleich der extrahierten Protein-Fractionen aus mit HcPT-2 infizierten Sf9-Zellen, 72 h nach der Infektion. 1: Überstand/Medium; 2: Pellet nach Ultraschall-Zellaufschluss; 3: Überstand nach Ultraschall-Zellaufschluss; 4: Überstand nach Mikrosomen-Fällung; 5: Pellet nach Ultrazentrifugation (Mikrosomen-Fraktion); M: Marker als Größenstandard



5.6. Qualitativer Nachweis rekombinanter Prenyltransferase-Aktivität

Da sich die Überexpression von PT-Genen in Eukaryoten nicht durch die Detektion von Proteinen im Polyacrylamid-Gel nachweisen ließ, wurden nach Induktion und Inkubation des genmanipulierten Expressionsorganismus Proteinfractionen aus den Wirtszellen – zuerst aus Hefezellen (*S. cerevisiae*) und dann aus Insektenzellen (*S. frugiperda*) – extrahiert und diese mit Hilfe von *in vitro*-Enzymassays auf PT-Aktivität untersucht.

5.6.1. Ausbleibende Aktivität in Hefezellen

Keine der vier exprimierten, rekombinanten PTs aus Hefezellen zeigte enzymatische Aktivität in den durchgeführten *in vitro*-Tests mit DMAPP und ausgewählten aromatischen Substraten (Tabelle 5.11). Auch bei wiederholter Genexpression – in Verbindung mit Modifikationen der Proteinextraktion aus den Wirtszellen sowie der Zusammensetzung von enzymatischen Reaktionsansätzen – wurden in der HPLC-Kontrolle der Inkubationen keine enzymatisch gebildeten, prenylierten Produkte in Form von neuen, zusätzlichen Peaks im HPLC-Chromatogramm entdeckt, weder mit eingesetztem Protein aus Rohextrakten noch aus Mikrosomen-Fractionen. Selbst die angesprochene Verkürzung der PT-Sequenzen, die in ausgesuchten Fällen in anderen Forschergruppen als Lösungsansatz diente, erbrachte keinen positiven Zugewinn. All diese negativen Erkenntnisse resultierten möglicherweise aus den negativen Beobachtungen, die bereits während der Kontrolle der Protein-Fractionen in der SDS-PAGE (siehe 5.5.2) gesammelt wurden, und zur Aufklärung des tatsächlichen Sachverhaltes musste im nächsten Schritt der Wechsel in einen alternativen, komplexeren Expressionsorganismus vollzogen werden.

Tabelle 5.11 Aktivitätsübersicht rekombinanter Johanniskraut-PTs aus Hefezellen, getestet mit ausgewählten Prenylakzeptoren (siehe Abbildung 4.7)

Substrate	HcPT-2	HcPT-2_oT	HpPT-1	HpPT-1_oT
Phloracetophenon				
Hyperxanthon E				
1,3,7-Trihydroxyxanthon				
Phlorisobutyrophenon				
1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon				
4-Hydroxybenzoesäure				

5.6.2. Prenyltransferase-Aktivität in Insektenzellen

In Sf9-Zellen produzierte PTs waren nach mikroskopischer Kontrolle in den Biomembranen von Zellorganellen zu finden (siehe 5.2.3.3), so dass sich die Experimente auf die Untersuchung extrahierter Mikrosomen-Fractionen aus Insektenzellen (siehe 4.5.2) konzentrierten. Ein exemplarischer Versuch des Aktivitätsnachweises aus Protein-Rohextrakt wurde zwar unternommen, hatte aber im Vergleich zu extrahierten Mikrosomen derselben PT (höhere Konzentration an exprimiertem Enzym im Proteinextrakt) erwartungsgemäß signifikant schwächere Substratumformung zur Folge und wurde somit in sämtlichen Folgeexperimenten umgangen. Von den insgesamt zwölf Volllänge-PTs aus Johanniskraut zeigten nach Produktion und Extraktion aus Sf9-Zellen vier Enzyme in den Testungen überhaupt keine nachweisbare Aktivität, was vermutlich auf fehlerhafte Faltung oder unzureichende, die Enzymfunktion einschränkende posttranslationale Modifikationen zurückzuführen war. Ein weiterer Erklärungsansatz lag darüber hinaus, wie schon bei den rekombinanten PTs aus Hefezellen, in der Struktur der angebotenen Enzymsubstrate. Ihre Eignung als aromatische Prenylakzeptoren konnte nur anhand von Vergleichen mit bekannten Metaboliten aus *H. per-*

foratum, *H. calycinum* und verwandten Johanniskraut-Arten abgeschätzt werden. Folglich konnte keine Aussage darüber getroffen werden, ob die getesteten Substrate nicht doch außerhalb der Spezifität besagter PTs lagen und diese somit nur inaktiv schienen. Eine Erweiterung des aromatischen Substrate-Pools (Abbildung 4.7) könnte daher weitere Rückschlüsse auf die bislang ohne Aktivitätsnachweis vorliegenden AS-PTs bieten. Für die übrigen acht getesteten Enzyme konnte hingegen mit den entwickelten und angewendeten Testsystemen katalytische Aktivität gezeigt werden.

Tabelle 5.12 Aktivitätsübersicht rekombinanter Johanniskraut-PTs aus Insektenzellen

<i>H. calycinum</i>			<i>H. perforatum</i>								
HcPT	HcPT-1	HcPT-2	HpPT-1	HpPT-2	HpPT-3	HpPT-4	HpPT-5	HpPT-6	HpPT-7	HpPT-8	HpPT-9

Bestimmt wurde diese Enzymaktivität anhand der PT-abhängigen Bildung prenylierter Aromaten, die qualitativ mittels HPLC nachgewiesen wurden. Aufgrund ihrer durch Anknüpfung einer bzw. mehrerer Kohlenwasserstoff-Seitenketten erhöhten Lipophilie im Vergleich zum Substrat erschienen sie als zusätzliche Peaks im HPLC-Chromatogramm, und zwar zeitverzögert bei einer höheren Retentionszeit als das Substrat, weil sie durch die Prenylierung mehr Wechselwirkungen mit der RP-Phase der HPLC-Säule eingingen. Bei einem positiven Befund im HPLC-Chromatogramm wurden weitere analytische Methoden hinzugezogen, um die Struktur der enzymatisch geformten Produkte zu identifizieren (Abbildung 5.29).

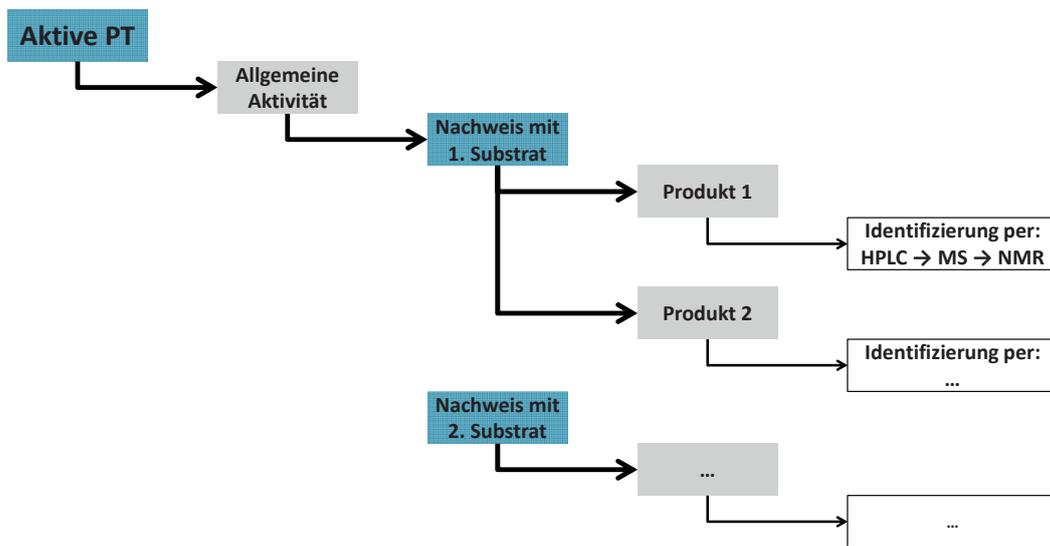


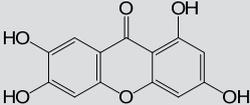
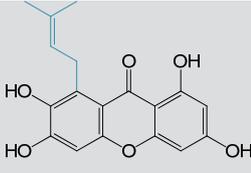
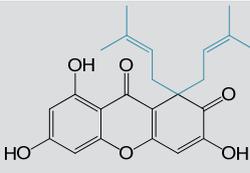
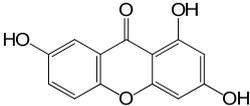
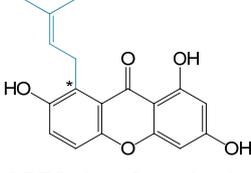
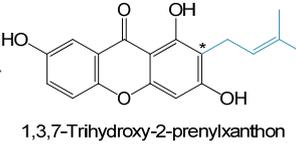
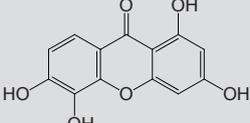
Abbildung 5.29 Fließschema – Aufbau der nachfolgenden enzymatischen Aktivitätsnachweise aktiver PTs



5.6.3. Aktive HcPT aus Sf9-Zellen

Die zuvor in Bakterien- und Hefezellen erfolglos exprimierte AS-PT „HcPT“^[220] konnte in Insektenzellen rekombinant produziert und in aktiver Form extrahiert werden. *In vitro*-Assays mit DMAPP und allen zur Verfügung stehenden Substraten (Abbildung 4.7) ergaben eine Substratspezifität für mehrfach hydroxylierte Xanthon-Grundgerüste, von denen zwei (respektive drei) von „HcPT“ akzeptiert und unterschiedlich oft prenyliert wurden (Tabelle 5.13).

Tabelle 5.13 Übersicht der von HcPT mit DMAPP umgesetzten Substrate

Substrate	Monoprenylierung	Diprenylierung
 + DMAPP 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon	 Patulon
 + DMAPP 1,3,7-Trihydroxyxanthon	 1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon oder  1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon	–
 + DMAPP 1,3,5,6-Tetrahydroxyxanthon	Spuren eines enzymatischen Produktes detektierbar	–

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenkette

Weil 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon (1,3,6,7-THX) von allen getesteten Substraten bevorzugt und in größtem Ausmaß umgesetzt wurde, wird im Folgenden anhand dieses Substrates das Vorgehen zur Detektion und Identifizierung der enzymatischen Produkte exemplarisch und detailliert vorgestellt – analog gilt für alle weiteren Substrate trotz abgekürzter Form Entsprechendes.

5.6.3.1. Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes als 1,3,6,7-TH8PX

Nach Extraktion der Inkubationsansätze und Analyse mittels HPLC konnte in den Negativkontrollen (enzymfreie Inkubation bzw. Inkubation mit denaturiertem Protein) ausschließlich das eingesetzte, nicht umgeformte Substrat 1,3,6,7-THX ($R_t = 7,8$ min) detektiert werden. Beim Einsatz von intakter „HcPT“ aus der Mikrosomen-Fraktion ließ sich hingegen bei Verwendung von K_3PO_4 -Puffer ein einzelnes, enzymatisch prenyliertes Produkt im HPLC-Chromatogramm nachweisen. Der Peak dieses Produktes „P1“ von „HcPT“ und 1,3,6,7-THX wurde bei $R_t = 12,2$ min gefunden und sein UV-Spektrum ähnelte stark demjenigen des Ausgangssubstrates – beide zeigten das für Hydroxyxanthon-Grundgerüste typische Muster dreier UV-Maxima bei 250–260 nm, 310–320 nm und 360–370 nm (Abbildung 5.30).

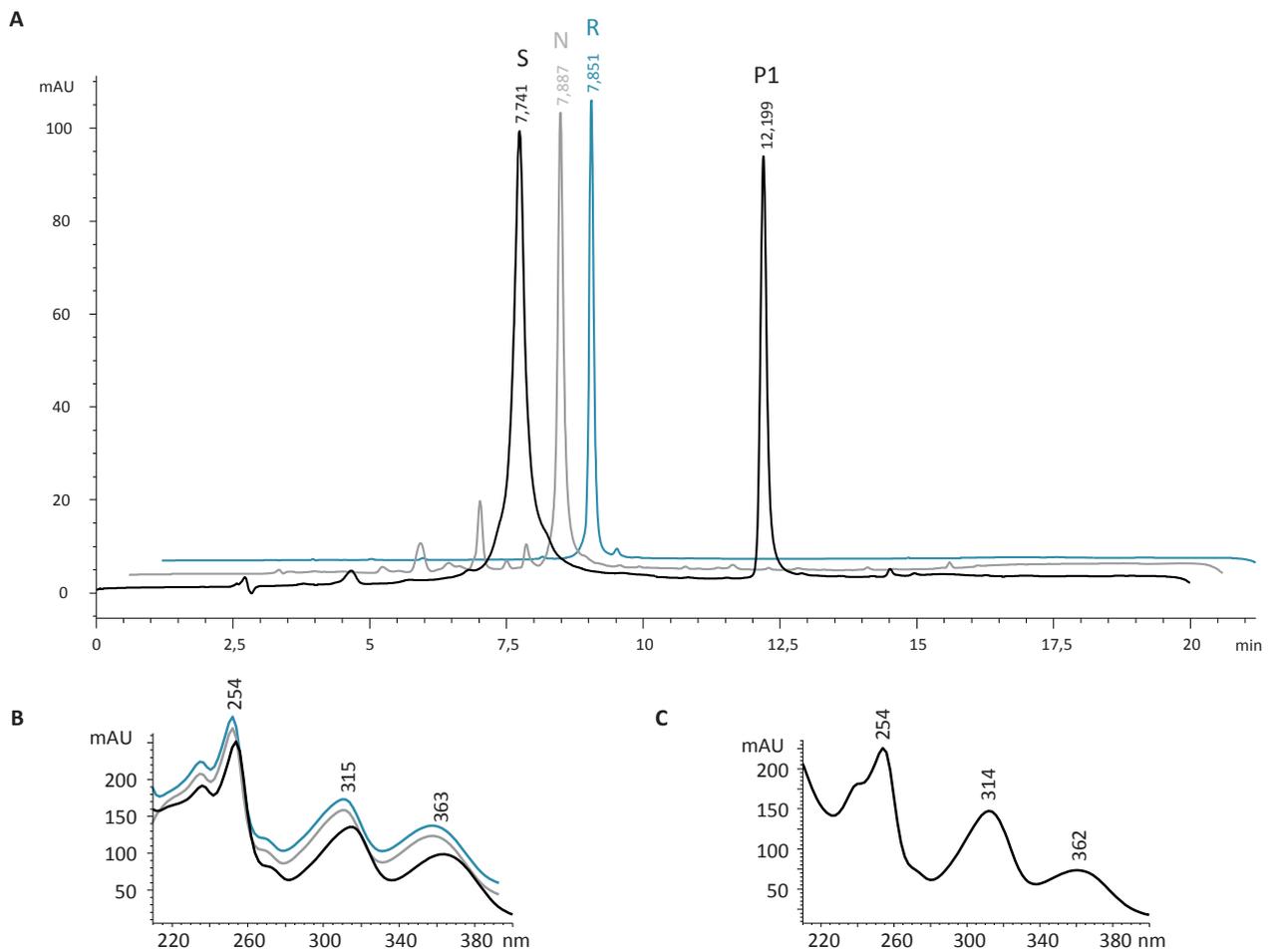


Abbildung 5.30 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in K_3PO_4 -Puffer (Tabelle 4.14). **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P1: Produkt 1 (1,3,6,7-TH8PX); R: Referenz (1,3,6,7-THX); S: Substrat (1,3,6,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N/R“. **C:** UV-Spektrum von „P1“

Mittels MS (siehe 4.8; Abbildung 5.31) wurde das Molekül-Ion $[M-H]^+$ von „P1“ bei $m/z = 329$ detektiert. Dies entsprach der Masse des Substrates 1,3,6,7-THX ($M = 260,03$ g/mol) plus der Masse genau einer angeknüpften Prenyleinheit ($M = 69,13$ g/mol). Der Vollständigkeit halber sei erwähnt, dass sich die Masse des Produktes aufgrund des durch die Prenyl-Seitenkette substituierten Wasserstoff-Atoms ($M = 1,0$ g/mol) um die Masse „1“ verringerte. Wegen der MS-Messung im Positiv-Modus tauchte jedoch genau diese Masse „1“ wieder in der Messung auf. Eine weitergehende Fragmentierung des Produktpeaks mittels MS/MS lieferte Signale von erwarteter Größe, u.a. mit $m/z = 260$ für das deprenylierte Xanthon-Grundgerüst des Produktes. Mit diesen Ergebnissen wurde die naheliegende, zuvor unverbindlich aufgestellte Annahme einer Monoprenylierung von 1,3,6,7-THX durch „HcPT“ – ohne weiterführende Aussagen zur Position der Isopren-Anknüpfung zuzulassen – bestätigt.

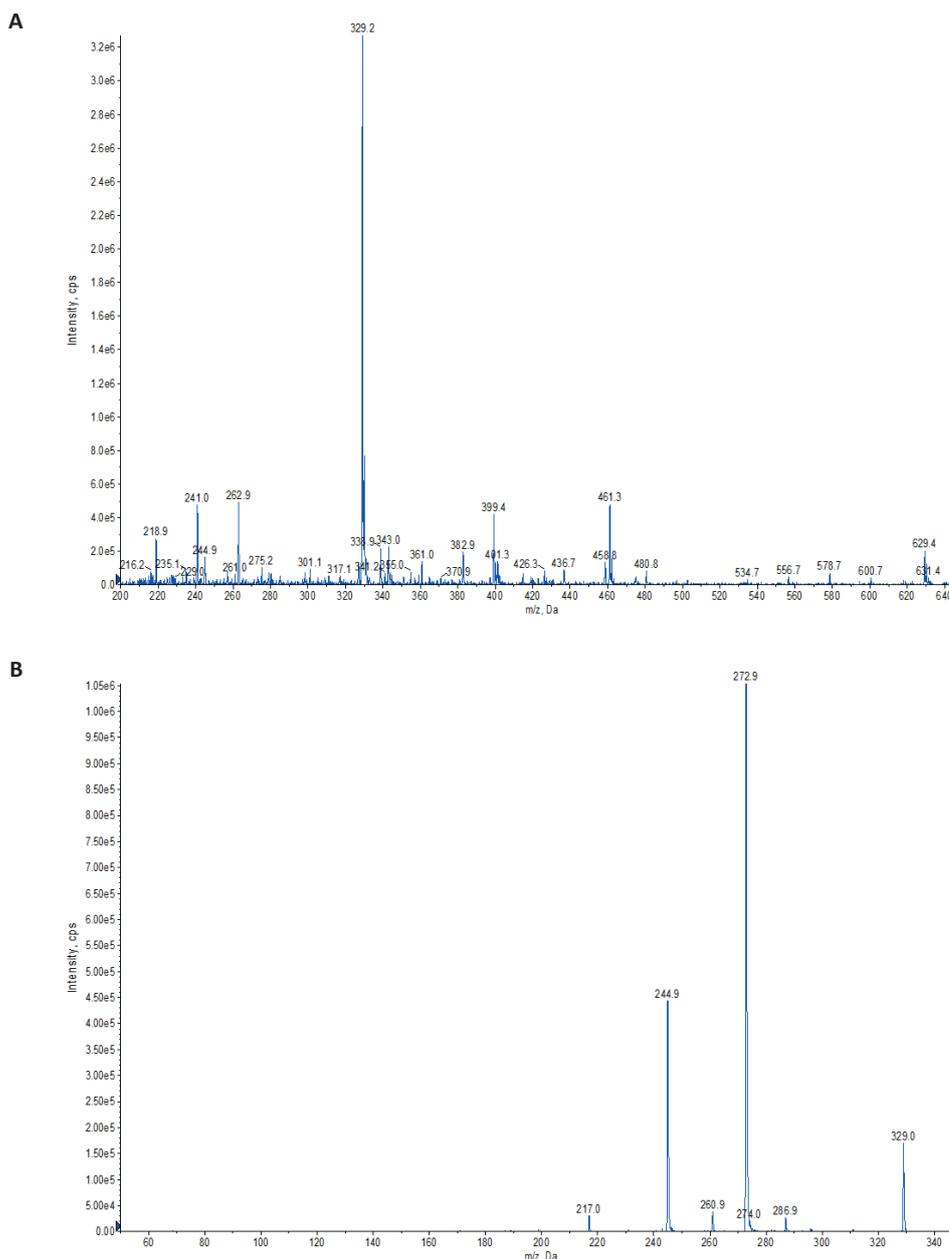


Abbildung 5.31 MS-Analyse des Produktes „P1“ einer Standard-Inkubation von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP. **A:** Massenspektrum (EMS ESI pos) des aus dem Inkubationsansatz isolierten, monoprenylierten Produktes „P1“. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI pos) der Fragmentierung des MS-Signals „P1“ ($m/z = 329$)

Das laut HPLC- und MS-Untersuchungen monoprenylierte Xanthon wurde anschließend mittels *in vitro*-Aktivitätsassays in großem Maßstab produziert (siehe 4.5.5.2), aufgereinigt (siehe 4.7.2) und der $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie unterworfen. Auf diese Weise sollte die tatsächliche Anknüpfungsstelle des Prenylrestes am Xanthon-Grundkörper bestimmt und die wahre Struktur des Produktes festgestellt werden. Anhand des von PROF. DR. LUDGER ERNST (Zentrales Labor für Kernresonanzspektroskopie, TU Braunschweig) aufgenommenen $^1\text{H-NMR}$ -Spektrums konnte mit den NMR-Daten das Vorliegen eines einfach prenylierten Produktes bestätigt werden. Die Duplettensignale für zwei einzelne Protonen in *meta*-Position zueinander bestätigten dabei, dass H-2 und H-4 des Xanthon-Grundgerüsts unsubstituiert blieben und das DMAPP an Position C-5 oder C-8 gekoppelt wurde. Die Identität des Produktes als C-8-prenyliertes Xanthon wurde letztlich durch Abgleiche mit zuvor veröffentlichten $^1\text{H-NMR}$ -Daten von 1,3,6,7-TH8PX^[285] und 1,3,6,7-TH5PX^[286] bewiesen (Abbildung 5.32).

1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon (exp.)			1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon (Lit.)			1,3,6,7-Tetrahydroxy-5-prenylxanthon (Lit.)		
H-Position	δ_H [ppm]	J [Hz]	H-Position	δ_H [ppm]	J [Hz]	H-Position	δ_H [ppm]	J [Hz]
OH	14,03 [4H]	s	OH	13,52 [4H]	s	OH	13,20 [4H]	s
H-5	6,54 [1H]	s	H-5	6,82 [1H]	s	H-8	7,56 [1H]	s
H-4	6,30 [1H]	d, 2	H-4	6,29 [1H]	d, 2	H-2	6,47 [1H]	d, 2
H-2	6,15 [1H]	d, 2	H-2	6,18 [1H]	d, 2	H-4	6,29 [1H]	d, 2
H-2'	5,47 [1H]	t, 6	H-2'	5,31 [1H]	t, 6	H-2'	5,37 [1H]	t, 7
H-1'	4,04 [2H]	d, 6	H-1'	4,18 [2H]	d, 6	H-1'	3,40 [2H]	d, 7
H-4'	1,80 [3H]	s	H-4'	1,84 [3H]	s	H-4'	1,76 [3H]	s
H-5'	1,63 [3H]	s	H-5'	1,64 [3H]	s	H-5'	1,73 [3H]	s
FIESEL <i>et al.</i> [263]			NIELSEN & ARENDS [285]			MAHABUSARAKAM <i>et al.</i> [286]		

Abbildung 5.32 Vergleich der ermittelten $^1\text{H-NMR}$ -Daten für 1,3,6,7-TH8PX (links) mit Literaturwerten für 1,3,6,7-TH8PX (Mitte) und 1,3,6,7-TH5PX (rechts). Chemische Verschiebung und Kopplungskonstanten des HcPT-Produktes von 1,3,6,7-THX und DMAPP deuten auf ein einfach C-8-prenyliertes Xanthon hin. δ : Chemische Verschiebung in ppm mit Anzahl signalgebender Protonen; H-x: Proton-Position am Kohlenstoff-Grundgerüst; J [Hz]: Kopplungskonstante (mit Signal: s: Singlet; d: Duplett; t: Triplet) in Hertz

5.6.3.2. Charakterisierung der rekombinanten HcPT

Diese ersten, gut reproduzierbaren Ergebnisse der zuvor beschriebenen Reaktion – die Anknüpfung von DMAPP an 1,3,6,7-THX durch „HcPT“ – waren Ausgangspunkt, um diese rekombinante AS-PT aus Johanniskraut in Bezug auf variable Reaktionsparameter zu charakterisieren [263]. Einzelne durchgeführte Modifikationen am gegebenen Testsystem bestätigten neben der bereits oben erwähnten Substratspezifität die starke Abhängigkeit der AS-PT von divalenten Kationen als Cofaktor [162]. Nur in Anwesenheit von solchen Metallionen zeigte sich enzymvermittelte Substratumformung, wobei Mg^{2+} signifikant am besten für die Prenylierung geeignet war. Wurde durch EDTA als Komplexbildner für mehrwertige Kationen die Anwesenheit eines Cofaktors ausgeschlossen, so konnte keine Produktbildung nachgewiesen werden (Abbildung 5.33).

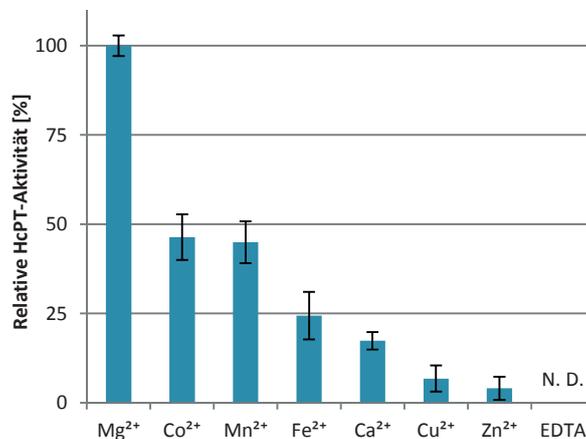


Abbildung 5.33 Einfluss divalenter Kationen auf die Aktivität von HcPT (drei biologische Wiederholungen). N.D.: nicht detektierbar



Die beste Aktivität zeigte sich im leicht alkalischen Reaktionsmilieu bei pH 8,0, was während der Bestimmung mit einer unerwarteten Überraschung und einem Exkurs in Form der folgenden, detaillierteren Betrachtung einherging. An dieser Stelle der Evaluierung des pH-Wert-Einflusses wurde nämlich durch den Einsatz unterschiedlicher Puffersubstanzen entdeckt, dass „HcPT“ in einer Reaktionsumgebung ohne K_3PO_4 aus dem Standard-Puffer zur Bildung eines zweiten enzymatischen Reaktionsproduktes – neben 1,3,6,7-TH8PX – fähig ist (siehe 5.6.3.3). Daher wurde eine intensiviertere Untersuchung des Puffereinflusses unternommen. In K_3PO_4 -Puffer (pH 5,0–8,0) stieg die relative Enzymaktivität, gemessen an der Bildung von 1,3,6,7-TH8PX, kontinuierlich mit steigendem pH-Wert. Ab pH 8,5 kam das erste Mal TRIS-HCl-Puffer zum Einsatz und offenbarte erstmalig neben 1,3,6,7-TH8PX ein weiteres, zusätzliches Signal für ein zweites Reaktionsprodukt, das bei einer größeren R_f als das bereits bekannte Produkt erschien und mit fortlaufend steigendem pH-Wert abnahm. Ein folgender Austausch der Puffersubstanz im Bereich pH $\leq 8,0$ ergab, dass bei Verwendung von MES-Puffer (pH 5,0–7,0) die Bildung des ersten Produktes vergleichbar wie bei K_3PO_4 -Puffer ablief, bei pH 7,0 aber bereits auch schon das zusätzliche Produkt gebildet und detektiert wurde. Ebenso war in TRIS-HCl-Puffer bei pH 7,5 und pH 8,0 der zusätzliche Peak für das zweite Produkt vorhanden, mit größtem Produktsignal bei pH 8,0. Durch diese Entdeckung wurde nicht nur TRIS-HCl (pH 8,0) zum Standard-Puffer für sämtliche zukünftige Assays – bei „HcPT“ und allen weiteren zu untersuchenden AS-PTs – gewählt, sondern auch nachfolgend das Phänomen der eingeschränkten Enzymaktivität in K_3PO_4 -Puffer aufgeklärt. Da die Unterdrückung der Bildung des zweiten Produktes nicht pH-abhängig erschien, musste die Puffersubstanz selbst für die partielle Enzyminhibition verantwortlich sein, und zumindest für K^+ wurde bereits ein regulatorischer Einfluss auf die Aktivität von Enzymen festgestellt^[214,287,288]. Eine bewusste Addition von bis zu 10 mM K^+ (in Form von KCl-Lösung) zu Standard-Inkubationen mit TRIS-HCl-Puffer zeigte hierbei jedoch keinen hemmenden Effekt auf die Bildung des zweiten Produktes. Ebenso wenig generierte der Austausch der Puffersubstanz K_3PO_4 zu Na_3PO_4 einen zu erwartenden Zusatzpeak, so dass die Vermutung aufkam die Phosphat-Ionen seien der inhibierende Faktor, der die vollständige Aktivität von „HcPT“ unterdrückte. Anschließende Experimente mit einem HCO_3^-/CO_3^{2-} -Puffer (pH 7,0 und pH 7,5) an Stelle von phosphathaltigem Medium bewiesen durch den Nachweis beider möglicher Produkte, dass tatsächlich PO_4^{3-} die entscheidende, limitierende Komponente im Reaktionsansatz darstellte und ein Hemmstoff der *in vitro*-Synthese des zweiten Produktes war. Nach diesen Ergebnissen wurde die relative Gesamtaktivität von „HcPT“ in MES (pH 5,0–7,0) und TRIS-HCl (pH 7,5–11,0) gemessen und pH 8,0 als Wert mit der größten enzymatischen Aktivität, hergeleitet über die AUC der detektierten Substrat- und Produktpeaks, bestimmt

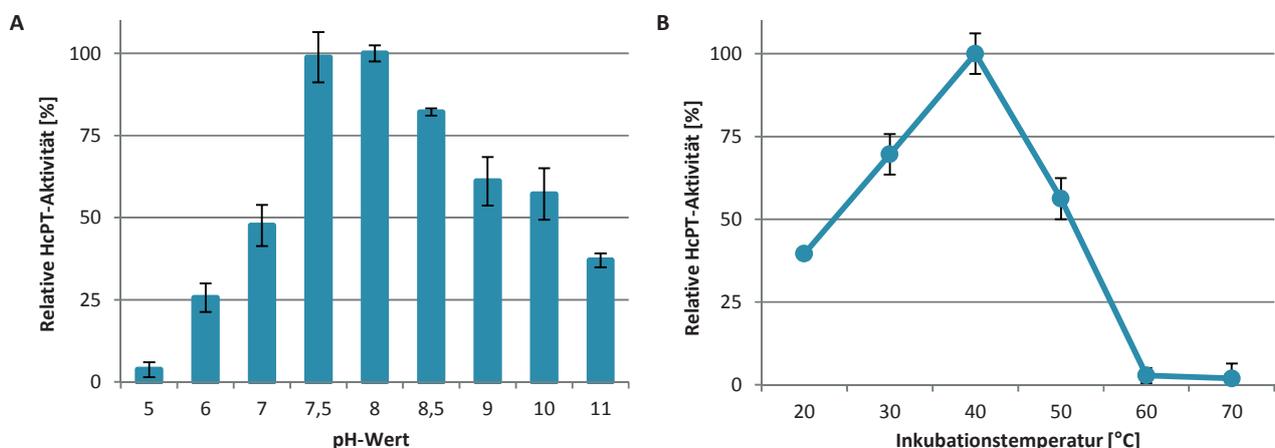


Abbildung 5.34 Bestimmung der relativen Enzymaktivität von HcPT bei variablen Inkubationsbedingungen (je drei biologische Wiederholungen). **A:** Einfluss des pH-Wertes. pH 5,0–7,0: MES; pH 7,5–11: TRIS-HCl. **B:** Einfluss unterschiedlicher Inkubationstemperaturen auf den Standard-Enzymassay in K_3PO_4 -Puffer

(Abbildung 5.34). Ein Effekt der eingesetzten Puffer-Konzentration wurde ebenfalls in einem Ansatz untersucht und führte zu dem Ergebnis, dass jede Abweichung von der Standard-Pufferstärke 100 mM – sowohl zu höheren als auch niedrigeren Konzentrationen – zu verminderter Enzymaktivität führte und somit nicht zu empfehlen war.

Eine Variierung der Inkubationstemperatur zeigte eine maximale Substratumformung bei 40 °C in einem nahezu symmetrischen Graphen (Abbildung 5.34). Eine Verringerung der Temperatur während der enzymkatalysierten Reaktion führte genauso wie ein Temperatur-Anstieg zu einer fast linearen Abnahme an enzymatischer Aktivität. Bemerkenswert war dabei, dass „HcPT“ bei 50 °C und darüber immer noch mehr als 50% der maximal beobachteten Enzymaktivität aufwies. Dieses Verhalten gegenüber Wärmeeinwirkung beruhte vermutlich auf der Membranintegrität von „HcPT“, welche die AS-PT durch Einbindung in die intakten Mikrosomen aus den Insektenzellen relativ gut gegen ein hitzebedingtes Denaturieren schützte – kein ungewöhnlicher Effekt bei der Charakterisierung pflanzlicher, membrangebundener AS-PTs, bei denen sogar Temperaturoptima von bis zu 70 °C gefunden wurden^[174,177]. Diese Widerstandskraft gegenüber Temperaturerhöhungen war auch letztlich der Grund, weshalb die Hitze-Denaturierung der untersuchten AS-PTs für die Negativkontrollen in den *in vitro*-Enzymassays recht lange dauerte und zusätzlich mit mehrfachem Vortexen kombiniert wurde, um Restaktivität komplett ausschließen zu können (siehe 4.5.5).

Die Geschwindigkeit des Substratumsatzes wurde durch variierende Konzentrationen sowohl für den Prenyldonor DMAPP (bei konstanter 1,3,6,7-THX-Konz.) als auch für den Prenylakzeptor 1,3,6,7-THX (bei konstanter DMAPP-Konz.) in Standard-Inkubationen bestimmt. Dabei erhaltene Datenreihen wurden aufgearbeitet und die Mittelwerte aus drei biologischen Wiederholungen nach nicht-linearer Regression in Form einer Sättigungshyperbel nach Michaelis-Menten gegeneinander aufgetragen (Abbildung 5.35). Durch dieses Auftragsverfahren konnten annäherungsweise mittels waagerechter Asymptote die maximale Umsatzgeschwindigkeit v_{max} , davon ausgehend die halbmaximale Geschwindigkeit und als zugehöriger x-Achsen-Abschnitt die Michaeliskonstanten (Substrat-Konzentration bei halbmaximaler Umsatzgeschwindigkeit) für beide Substrate ermittelt werden: $K_m = 87 \pm 5 \mu\text{M}$ für DMAPP und $K_m = 211 \pm 16 \mu\text{M}$ für 1,3,6,7-THX.

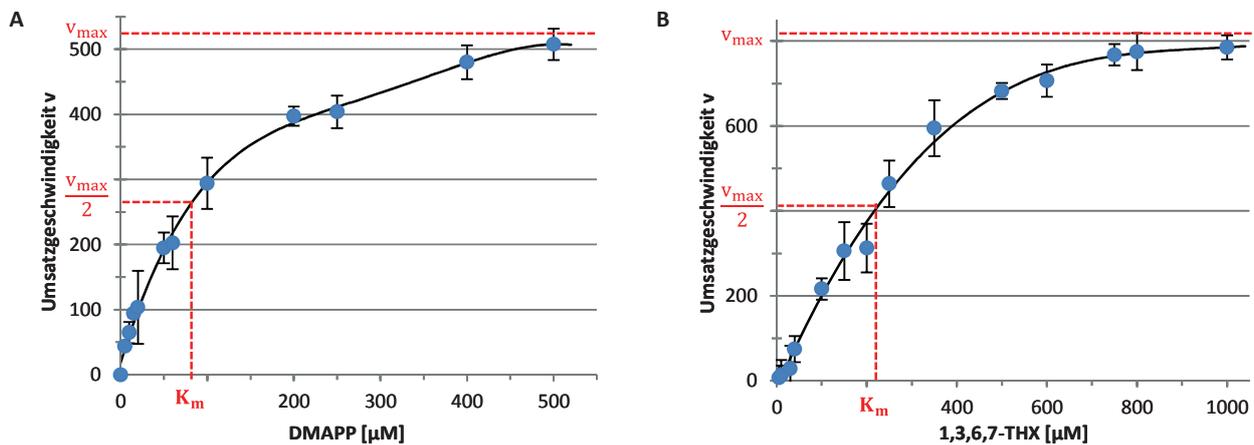


Abbildung 5.35 Untersuchung der Enzymkinetik von HcPT. **A:** Michaelis-Menten-Funktion zur Bestimmung von K_m (DMAPP) bei konstanter 1,3,6,7-THX-Konz. **B:** Michaelis-Menten-Funktion zur Bestimmung von K_m (1,3,6,7-THX) bei konstanter DMAPP-Konz.

Formel 5.1 Sättigungsfunktion eines Enzyms nach der Michaelis-Menten-Beziehung^[264,265]

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

- v enzymatische Umsatzgeschwindigkeit
- v_{max} maximale enzymatische Umsatzgeschwindigkeit
- $[S]$ Substratkonzentration
- K_m Michaeliskonstante



5.6.3.3. Aktivitätsnachweis mit 1,3,6,7-THX und Strukturaufklärung des Produktes „P2“ als Patulon

Unter Einsatz des neugewählten Standard-Puffers TRIS-HCl (pH 8,0) konnte in Inkubationen einerseits eine generelle Aktivitätszunahme von „HcPT“ – gemessen an dem Verbrauch des eingesetzten Substrates 1,3,6,7-THX – festgestellt werden. Zusätzlich konnte unter diesen Reaktionsbedingungen neben dem bereits identifizierten Produkt 1,3,6,7-TH8PX das in der Charakterisierung erstmalig entdeckte, zweite Reaktionsprodukt reproduziert werden. Der Peak von „P2“ erschien bei einer späteren Retentionszeit ($R_t = 14,3$ min) als das bereits detektierte „P1“ im HPLC-Chromatogramm. Diese verzögerte Elution von der RP-HPLC-Säule implizierte, dass das zweite enzymatische Produkt verstärkte hydrophobe Eigenschaften aufwies, d.h. mehr als nur eine Isopreneinheit beinhalten musste. Außerdem veränderte sich im Vergleich zum Ausgangssubstrat und „P1“ das UV-Spektrum dahingehend, dass das charakteristische Xanthon-Muster (drei UV-Maxima bei Absorptionswellenlängen um 255 nm, 315 nm und 365 nm) aufgelöst wurde – ein Indiz dafür, dass eine Modifizierung am aromatischen Grundgerüst stattfand.

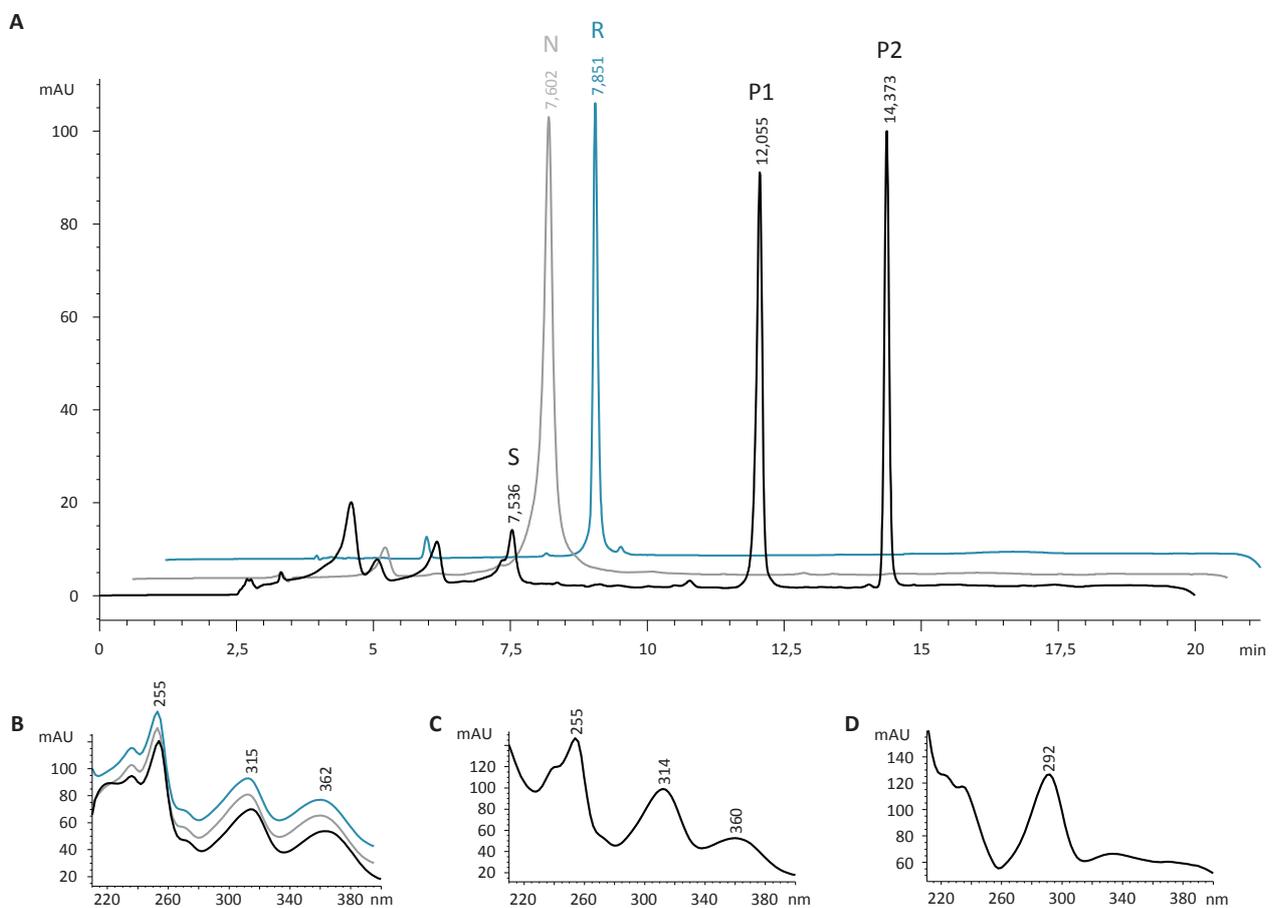


Abbildung 5.36 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer (Tabelle 4.14). **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 292$ nm. N: Negativkontrolle; P1: Produkt 1 (1,3,6,7-TH8PX); P2: Produkt 2 (Patulon); R: Referenz (1,3,6,7-THX); S: Substrat (1,3,6,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N/R“. **C:** UV-Spektrum von „P1“. **D:** UV-Spektrum von „P2“

Auch das Produkt „P2“ ($R_t = 14,3$ min) wurde mit der MS analysiert (Abbildung 5.37) und ein Signal für das Molekül-Ion $[M-H]^-$ bei $m/z = 395$ entdeckt. Da im negativen Ionisierungsmodus gemessen wurde, entsprach diese Masse dem Substrat 1,3,6,7-THX ($M = 260,03$ g/mol) plus der Masse von zwei angeknüpften Prenyleinheiten ($2 \times 69,13$ g/mol) abzüglich der Masse „3“ (zwei durch Isopren substituierte Wasserstoff-Atome mit je $M = 1,0$ g/mol sowie die Masse „1“ wegen des negativen Messmodus). Die Aufspaltung dieses

Produktsignals durch die MS/MS-Kopplung lieferte Peaks, die mit den Massen des einfach und doppelt deprenylierten Produktes ($m/z = 326$ und 258) korrelierten und zum eingesetzten Substrat 1,3,6,7-THX passten. Somit konnte eine vermutete Diprenylierung des Substrates während der Inkubation mit „HcPT“ bestärkt werden, die jedoch nicht die Veränderung des UV-Spektrums des Produktes „P2“ im Abgleich mit dem UV-Muster des eingesetzten 1,3,6,7-THX erklärte oder Aufschluss über die Position der Prenylsubstituenten gab.

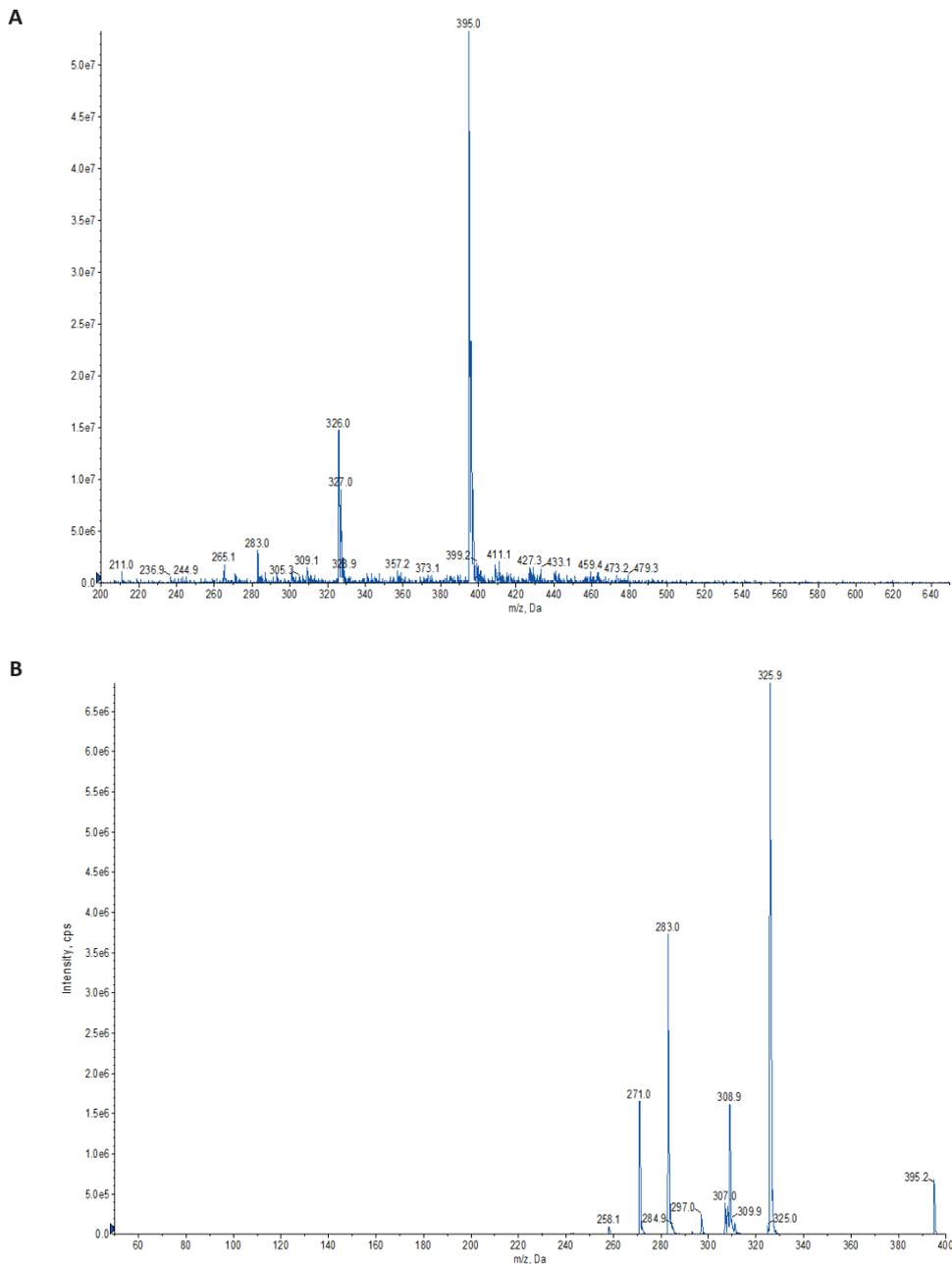


Abbildung 5.37 MS-Analyse des Produktes „P2“ einer Standard-Inkubation von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer. **A:** Massenspektrum (EMS ESI neg) des aus dem Inkubationsansatz isolierten Produktes „P2“. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI neg) der Fragmentierung des MS-Signals vom Molekül-Ion bei $m/z = 395$



Eine Strukturaufklärung war daher gerade wegen des für Xanthone ungewöhnlichen UV-Spektrums notwendig und hochinteressant. Weil sich jedoch ein Großansatz der untersuchten Inkubation zur Aufreinigung für eine eigene NMR-Untersuchung – wie zuvor bei der Identifizierung von „P1“ – nicht realisieren ließ, wurde stattdessen ein praktischer Umweg zur Strukturaufklärung eingeschlagen. Für die Identifizierung wurde eine Referenzsubstanz herangezogen, die als Folge einer Elicitor-Behandlung in Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* akkumulierte (siehe Anhang 10.4.1) und aus diesen Kulturen in größerem Maßstab von DR. MARIAM GAID gewonnen wurde (Daten unveröffentlicht). Die Ergebnisse von HPLC-Untersuchungen (Verschiebung der R_t des Metaboliten und einzelnes UV-Maximum bei 292 nm) und aus der MS-Spektrometrie (Molekül-Ion $[M-H]^-$ bei $m/z = 395$, Fragmente u.a. bei $m/z = 326, 283$), durchgeführt mit dieser Referenz, deckten sich exakt mit den experimentell gewonnenen Daten von „P2“ (Abbildung 5.36 und Abbildung 5.37) und bestätigten die Annahme, dass es sich bei Referenz und „P2“ um dieselbe Substanz handeln musste. Die Aufklärung der genauen Struktur mittels NMR-Spektroskopie konnte daher mit der aus den Zellsuspensionskulturen erhaltenen Referenzsubstanz durchgeführt werden (Abbildung 5.38). Die aus dem für Xanthone atypischen UV-Muster abgeleitete Annahme, dass beide Prenyleinheiten unter Aufhebung eines der beiden aromatischen Ringe von 1,3,6,7-THX auf ein und dasselbe C-Atom des Xanthon-Grundgerüsts übergingen, stellte sich durch die erhaltenen NMR-Daten als wahr heraus. Beide Prenyl-Seitenketten wurden an C–8 des Substrates geknüpft, wobei eine der aromatischen Doppelbindungen eliminiert und der Hydroxylsubstituent an der ursprünglichen Position C–7 zu einer Carbonylfunktion oxidiert wurde. Das von PROF. DR. LUDGER ERNST gewonnene ^1H -NMR-Spektrum der Referenz identifizierte diese bzw. das gesuchte Produkt „P2“ als Patulon – ein diprenyliertes Polyhydroxyxanthon, das zuvor ISHIGURO *et al.*^[289] in Form eines Phytoanticipins aus einer anderen Johanniskraut-Art isolierten und beschrieben.

Patulon (exp.)			Patulon (Lit.)		
H-Position	δ_H [ppm]	J [Hz]	H-Position	δ_H [ppm]	J [Hz]
HO–8	13,22 [1H]	s	HO–8	13,20 [1H]	s
HO–3	9,22 [1H]	s (breit)	HO–3	9,30 [1H]	s (breit)
H–4	6,56 [1H]	s	H–4	6,53 [1H]	s
H–5	6,39 [1H]	t, 2,2	H–5	6,38 [1H]	d, 1,83
H–7	6,27 [1H]	t, 2,1	H–7	6,26 [1H]	d, 1,83
H–2'	4,74 [2H]	t, 7,6	H–2'	4,74 [2H]	t, 7,6
H–1'	3,43 [2H]	dd, 13,7 & 7,5	H–1'	3,43 [2H]	dd, 13,7 & 7,6
H–1''	2,73 [2H]	dd, 13,6 & 7,7	H–1''	2,73 [2H]	dd, 13,7 & 7,6
H–4'	1,47 [6H]	s (breit)	H–4'	1,47 [6H]	s
H–5'	1,47 [6H]	s (breit)	H–5'	1,47 [6H]	s
GAID <i>et al.</i> (Daten unveröffentlicht)			ISHIGURO <i>et al.</i> ^[289]		

Abbildung 5.38 Identitätsvergleich der ermittelten ^1H -NMR-Daten für Patulon aus *H. calycinum*-Zellkultur (links) mit Literaturwerten (rechts). δ : Chemische Verschiebung in ppm mit Anzahl signalgebender Protonen; H–x: Proton-Position am Kohlenstoff-Grundgerüst; J [Hz]: Kopplungskonstante (mit Signal: s: Singlet; d: Duplett; dd: Duplett von Dupletts; t: Triplet) in Hertz

5.6.3.4. Aktivitätsnachweis mit 1,3,7-THX

Bei einem Austausch des Substrates hin zum etwas weniger hydrophilen 1,3,7-Trihydroxyxanthon (1,3,7-THX) zeigte die rekombinante „HcPT“ immer noch enzymatische Aktivität im HPLC-Screening. Wo in den Negativkontrollen mit zuvor denaturiertem Protein außer dem puren Substrat ($R_t = 8,5$ min) kein weiterer Peak gefunden wurde, erschien in HPLC-Chromatogrammen der Inkubationen in K_3PO_4 -Puffer ein einzelnes Produkt ($R_t = 12,6$ min; Abbildung 5.39). Bei vergleichbaren, Xanthon-typischen UV-Spektren (UV-Maxima um 255 nm, 315 nm und 365 nm) von Produkt und Substrat und einer um ca. 4,5 min verzögerten Elution von der lipophilen HPLC-Säule konnte ohne weitergehende Strukturaufklärung auf eine Monoprenylierung von 1,3,7-THX geschlossen werden. Bei gleichen Inkubationsbedingungen (Puffer und Inkubationsdauer) war das katalytische Verhalten von „HcPT“ – Monoprenylierung eines Xanthon-Grundgerüsts – somit qualitativ ähnlich wie beim Einsatz von 1,3,6,7-THX, nur dass die Substratumformung geringer ausfiel und folglich 1,3,7-THX ein weniger gut geeignetes Substrat darstellte.

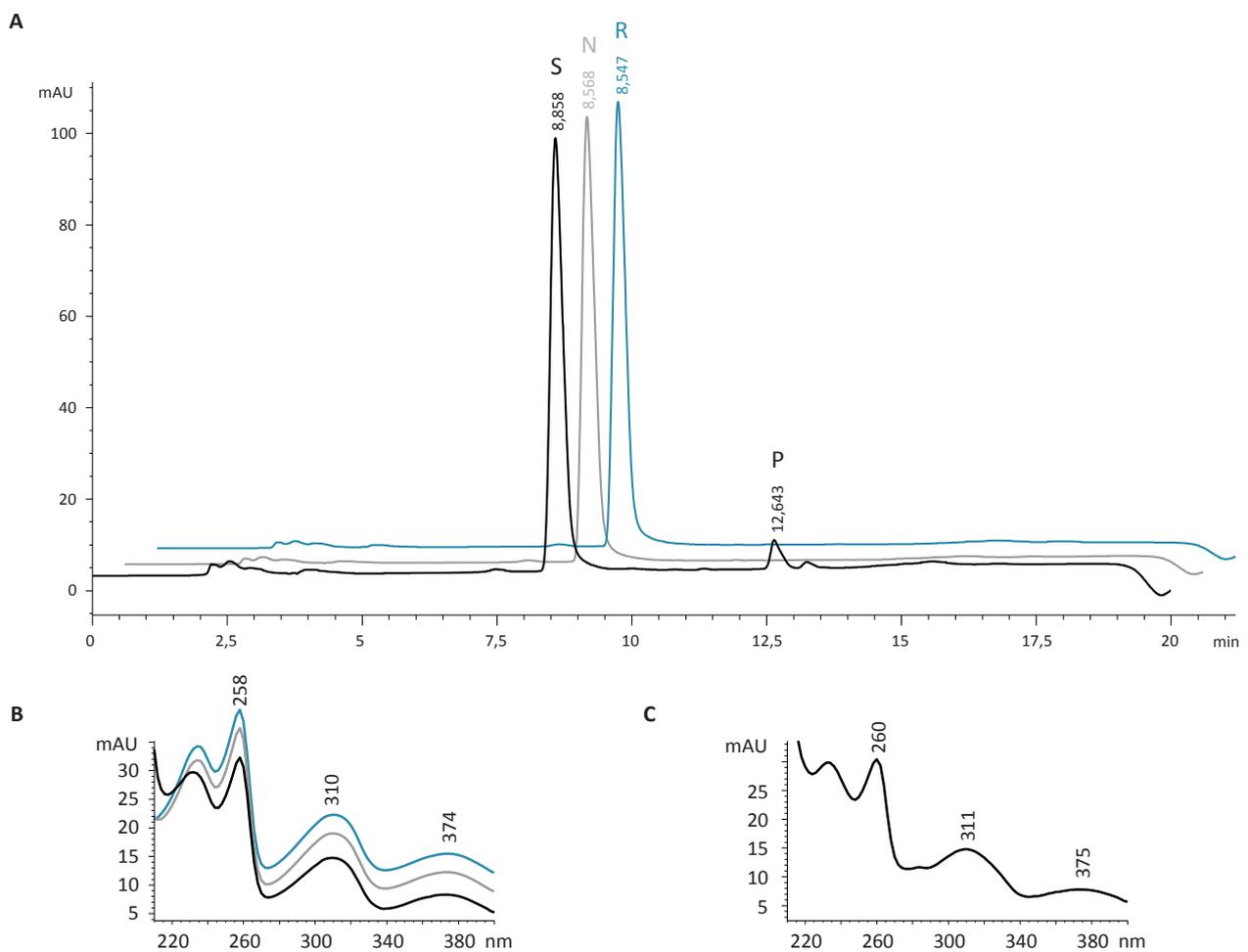


Abbildung 5.39 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT mit 1,3,7-THX und DMAPP in K_3PO_4 -Puffer (Tabelle 4.14). **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; R: Referenz (1,3,7-THX); S: Substrat (1,3,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N/R“. **C:** UV-Spektrum des Produktes

Wurde für die Inkubationen das Puffersystem TRIS-HCl (pH 8,0) eingesetzt, so zeigte sich dieses Mal keine Veränderung in der Qualität der PT-Aktivität bei selbigem Substrat. Durch Denaturierung inaktivierte „HcPT“ lieferte keine zusätzlichen Produktpeaks, sondern ausschließlich das eingesetzte Substrat vergleichbar mit der HPLC-Analyse der reinen Referenz 1,3,7-THX (Abbildung 5.40). Rekombinante „HcPT“ produzierte einen Extrapeak im Chromatogramm bei $R_t = 17,5$ min, der im Abgleich der UV-Spektren sehr große Ähn-



lichkeit zum eingesetzten Substrat zeigte und aufgrund der zeitlichen Verschiebung auf die enzymatische Anknüpfung von einem Isoprenrest schließen ließ. Über die Position der Anknüpfung konnte keine Aussage getroffen werden, weil sie nicht näher untersucht wurde – denkbar waren sowohl eine Anknüpfung an C–8, analog der Monoprenylierung von 1,3,6,7-THX durch „HcPT“, sowie an C–2, wie zuvor bereits in *Garcinia* spp. gefunden und beschrieben^[290,291]. Das Erscheinen eines zweiten enzymatisch gebildeten Produktes wie beim Substrat 1,3,6,7-THX blieb jedoch in diesem Fall aus. Lediglich die relative Umsetzung von 1,3,7-THX hin zum monoprenylierten Produkt war in TRIS-HCl-Puffer höher als in K_3PO_4 -Puffer, wie auch schon beim Einsatz von 1,3,6,7-THX. Daher konnte als Folge dieser Ergebnisse eine allgemein größere PT-Aktivität von „HcPT“ in TRIS-HCl-Puffer festgehalten werden.

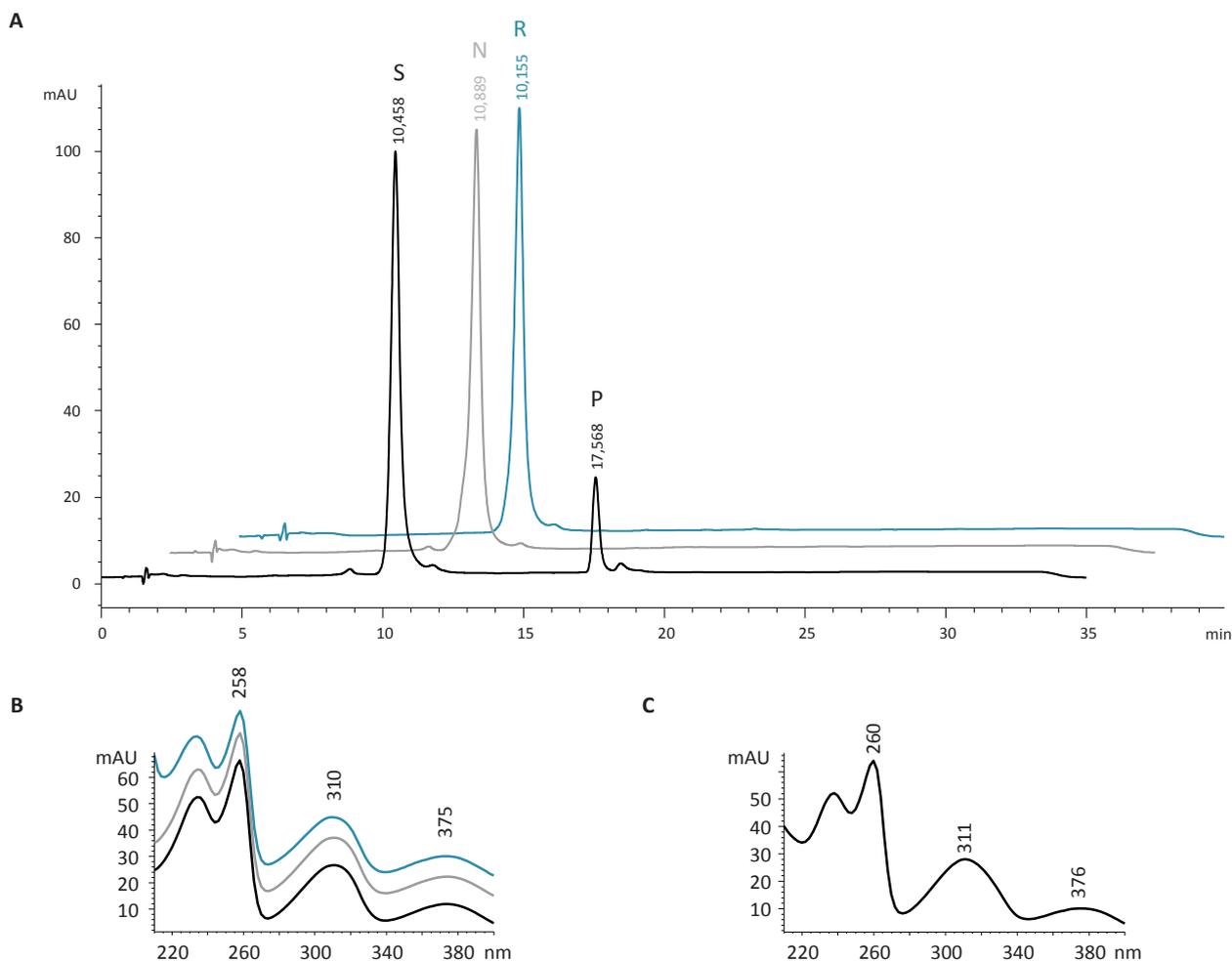


Abbildung 5.40 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer (Tabelle 4.14). **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 2 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; R: Referenz (1,3,7-THX); S: Substrat (1,3,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N/R“. **C:** UV-Spektrum des Produktes

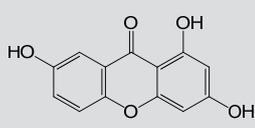
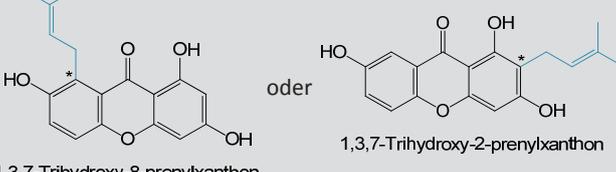
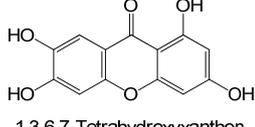
5.6.3.5. Aktivitätsnachweis mit 1,3,5,6-THX

Mit 1,3,5,6-Tetrahydroxyxanthon (1,3,5,6-THX) wurde ein strukturverwandtes Substrat getestet, das im HPLC-Chromatogramm in Spuren ein wahrscheinlich prenyliertes Produkt ergab. Da die Substratumformung jedoch im Vergleich zu den vorher beschriebenen mehrfach hydroxylierten Xanthonen derart gering war (kein deutliches Produktsignal, nur sehr ähnliches UV-Spektrum wie das Substrat), wurden intensivere Untersuchungen zur Methodenverbesserung und Steigerung dieser Umsetzung nicht weiterverfolgt.

5.6.4. Aktive HcPT-1 aus Sf9-Zellen

Die zweite aktive AS-PT aus *H. calycinum* zeigte auch in *in vitro*-Enzymassays, dass sie in der Lage war hydroxylierte Xanthon-Grundgerüste mit einem DMAPP-Rest zu versehen (Tabelle 5.14). Im Vergleich zur vorher beschriebenen „HcPT“ wurde von dieser PT das dreifach hydroxylierte Xanthon bevorzugt und besser umgesetzt als das vierfach hydroxylierte Substrat. Dabei war insgesamt betrachtet die Aktivität mit 1,3,7-THX auf ähnlichem Niveau, die Akzeptanz von 1,3,6,7-THX fiel jedoch stark und war nur noch in Spuren nachweisbar. Da bei den gleichen eingesetzten Substraten die gleichen monoprenylierten Produkte – identifiziert über Abgleiche von Elution (R_t) und UV-Spektren mit den Ergebnissen von „HcPT“ (siehe 5.6.3) – auftraten, wurde an dieser Stelle auf eine eigene HPLC-Dokumentation verzichtet (siehe Anhang 10.4.3).

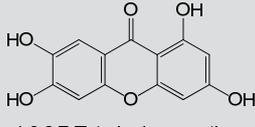
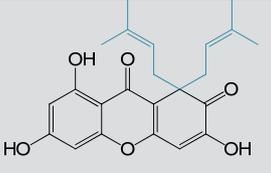
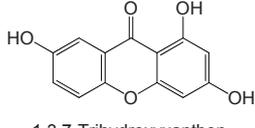
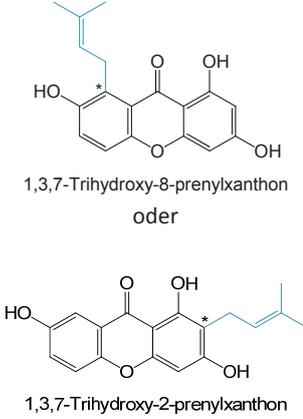
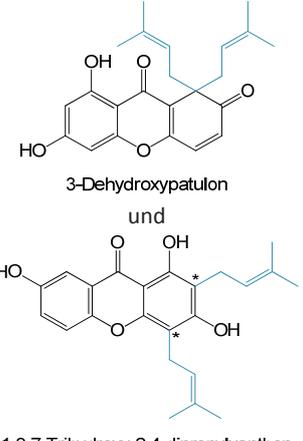
Tabelle 5.14 Übersicht der von HcPT-1 mit DMAPP umgesetzten Substrate

Substrate	Monoprenylierung
 1,3,7-Trihydroxyxanthon + DMAPP	 1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon oder 1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon
 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon + DMAPP	Spuren eines enzymatischen Produktes detektierbar

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenkette

5.6.5. Aktive HcPT-2 aus Sf9-Zellen

Tabelle 5.15 Übersicht der von HcPT-2 mit DMAPP umgesetzten Substrate

Substrate	Monoprenylierung	Diprenylierung
 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon + DMAPP	–	 Patulon
 1,3,7-Trihydroxyxanthon + DMAPP	 1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon oder 1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon	 3-Dehydroxypatulon und 1,3,7-Trihydroxy-2,4-diprenylxanthon

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenketten



Mit „HcPT-2“ stand eine dritte AS-PT aus *H. calycinum* für Aktivitätsassays bereit. Wie die beiden zuvor beschriebenen PTs fand sich das Substratspektrum auch hier im Bereich der mehrfach hydroxylierten Xanthone (Tabelle 5.15). Eine neue Aktivität im Vergleich zu „HcPT“ und „HcPT-1“ konnte nicht gefunden werden, jedoch war es die Art und Weise, wie sich die rekombinante „HcPT-2“ verhielt, die eine nähere Betrachtung interessant machte.

Inkubationen mit DMAPP und dem bevorzugten Substrat 1,3,6,7-THX in TRIS-HCl-Puffer (pH 8,0) verliefen wie bei „HcPT“, allerdings produzierte „HcPT-2“ nicht die monoprenylierte Zwischenstufe 1,3,6,7-TH8PX, sondern vollführte gleich zwei Prenylierungen ohne Intermediat-Freisetzung und formte das Substrat direkt zu Patulon um (Abbildung 5.41). Die Verschiebung der R_t und die charakteristische Veränderung des UV-Absorptionsspektrums von „S“ zu „P“ dienen als wichtigste Parameter zur Identifizierung des Reaktionsproduktes im Vergleich mit den Ergebnissen der Strukturaufklärung bei „HcPT“ (siehe 5.6.3.3).

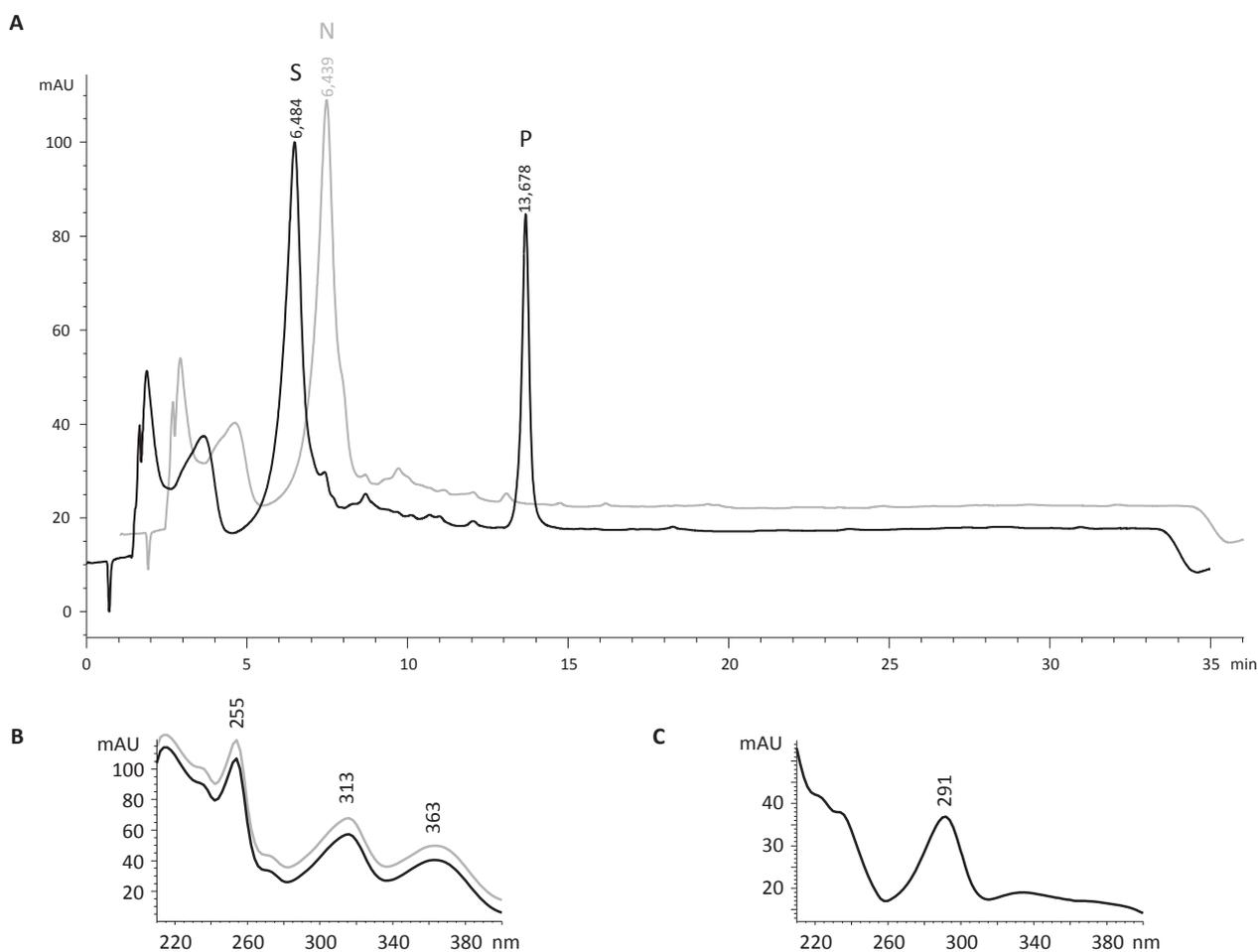


Abbildung 5.41 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT-2 mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 3, Detektion: $\lambda = 292$ nm. N: Negativkontrolle; P: Produkt (Patulon); S: Substrat (1,3,6,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum von „P“

Bei gleichen Reaktionsbedingungen wie zuvor wurde mit der Verwendung des weniger hydroxylierten Substrates 1,3,7-THX entgegen den Erwartungen sogar noch ein Produktpeak mehr detektiert als bei der bisher aktivsten „HcPT“. Angenommen worden war ein einzelner Produktpeak für 3-Dehydroxyapatulon, entsprechend der Aktivität mit 1,3,6,7-THX. Die Umformung verlief zwar nur in geringem Ausmaß, aber es waren neben dem monoprenylierten Produkt „P1“ ($R_t = 12,8$ min) und dem vermuteten Patulon-Derivat „P2“ ($R_t = 14,9$ min) mit „P3“ ein noch später eluierter Peak zu finden (Abbildung 5.42). Die Verschiebung

der R_t von „P1“ zu „P3“ um ca. 4–5 min war bei der hierbei verwendeten HPLC-Methode ein typisches Unterscheidungsmerkmal für die Anbindung einer Prenyleinheit, wie es bereits der Unterschied der Elutionen von Substrat und „P1“ zeigte. Auszugehen war also im Fall des zuletzt detektierten Produktes von einem zweifach prenylierten Xanthon-Grundgerüst, dessen aromatisches System während der Reaktion nicht verändert wurde (siehe Ähnlichkeit der UV-Spektren), dessen Lipophilie jedoch im Gegensatz zum ebenfalls diprenylierten Patulon-Ableger erhöht sein musste. Nur so ließ sich die verzögerte Detektion erklären, die auf die Anknüpfung der beiden lipophilen Kohlenwasserstoff-Seitenketten an unterschiedlichen C-Atomen^[292], wahrscheinlicher noch an unterschiedlichen Seiten des Substrates zur Maskierung hydrophiler Substituenten am Molekül, zurückzuführen war.

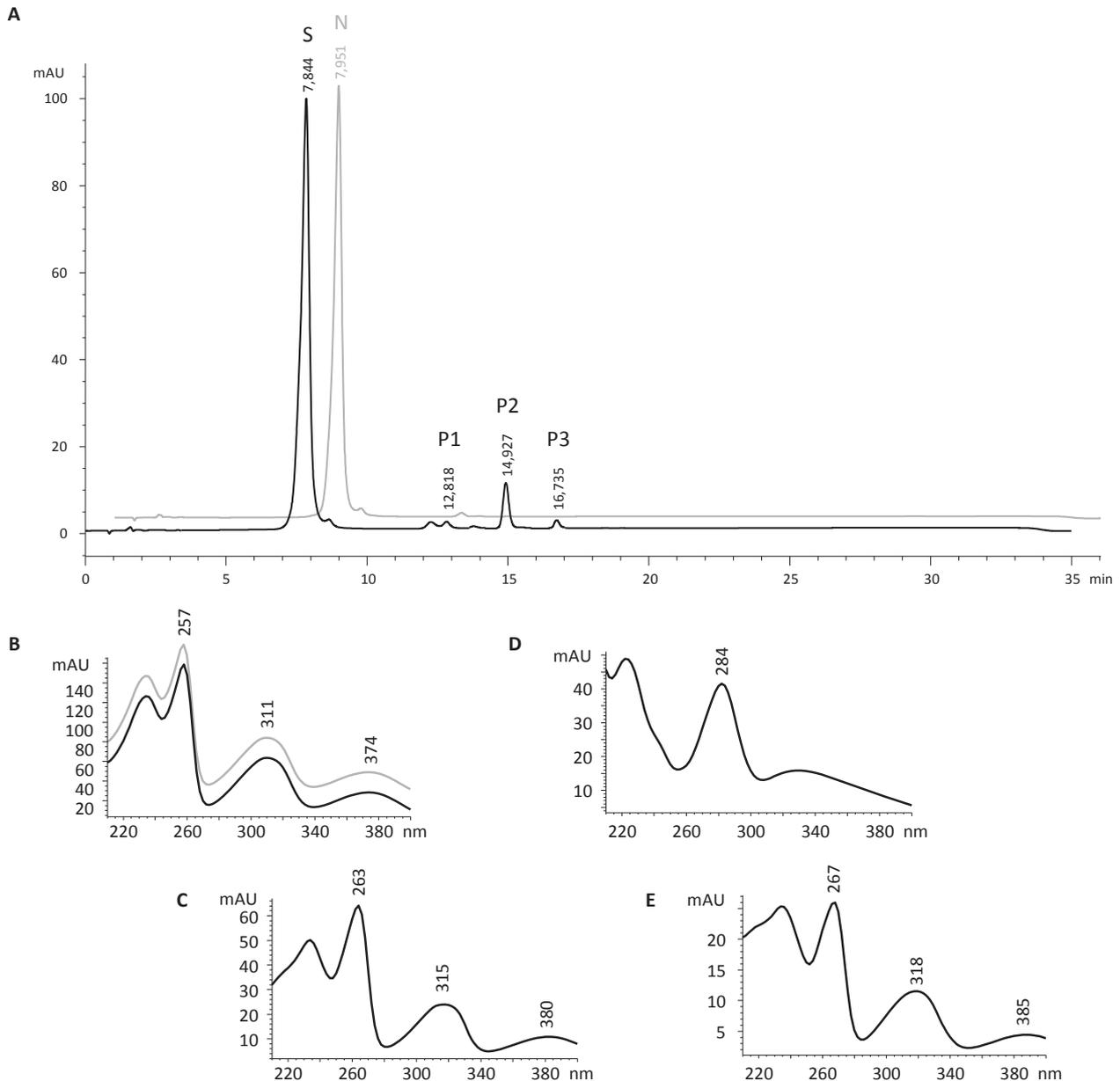


Abbildung 5.42 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT-2 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 3, Detektion: $\lambda = 292$ nm. N: Negativkontrolle; P1: Produkt 1 (1,3,7-TH8PX); P2: Produkt 2 (3-Dehydroxyapatulon); P3: Produkt 3 (1,3,7-TH6,8DPX); S: Substrat (1,3,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum von „P1“. **D:** UV-Spektrum von „P2“. **E:** UV-Spektrum von „P3“

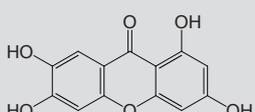
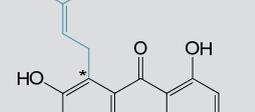
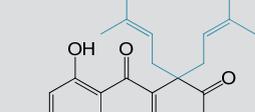
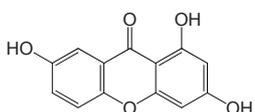
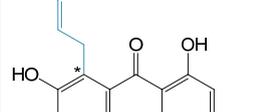
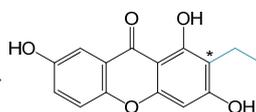


Da es neben der rekombinanten Volllänge-Version von „HcPT-2“ noch eine verkürzte („HcPT-2_oT“; siehe 5.4.3.2) und eine GFP-markierte („HcPT-2-GFP“) sowie eine verkürzte und gleichzeitig GFP-fusionierte PT-Variante („HcPT-2_oT-GFP“; siehe 5.4.3.3) gab, wurden auch diese exemplarisch mit 1,3,6,7-THX auf ihre Aktivität getestet. Die um das putative Transitpeptid N-terminal verkürzte „HcPT-2_oT“ zeigte im Vergleich zum natürlichen Enzym identische Aktivität, war also nicht in ihrer Funktion beeinflusst. Die fluoreszenzmarkierten Fusionsproteine hingegen verloren durch das Anheften des löslichen eGFPs ihre komplette Funktionalität, sei es einer Protein-Fehlfaltung während der Biosynthese oder aber einer sterischen Blockade des aktiven Zentrums bzw. wichtiger Bindungspositionen an „HcPT-2“ durch das Fluoreszenzprotein geschuldet.

5.6.6. Aktive HpPT-1 aus Sf9-Zellen

Rekombinante „HpPT-1“ zeigte qualitativ die gleiche enzymatische Aktivität wie „HcPT“ (Tabelle 5.16), quantitativ war diese AS-PT hingegen generell schwächer aktiv. Es wurde 1,3,7-THX einmal mit DMAPP prenyliert, und 1,3,6,7-THX erschien nach Extraktion des Reaktionsansatzes sowohl monoprenyliert als auch diprenyliert als Patulon (siehe Anhang 10.4.4). Ein Reaktionsprodukt von 1,3,5,6-THX und DMAPP, welches „HcPT“ schon nur in minimaler Menge lieferte, war mit „HpPT-1“ nicht zu detektieren.

Tabelle 5.16 Übersicht der von HpPT-1 mit DMAPP umgesetzten Substrate

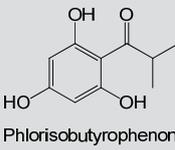
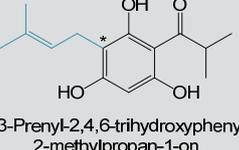
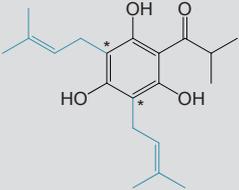
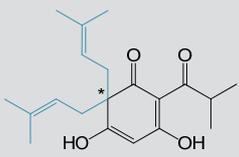
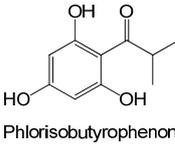
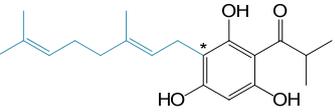
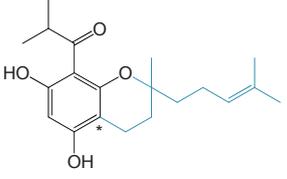
Substrat	Monoprenylierung	Diprenylierung
 + DMAPP 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon	 Patulon
 + DMAPP 1,3,7-Trihydroxyxanthon	 1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon oder  1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon	–

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenkette

5.6.7. Aktive HpPT-2 und HpPT-6 aus Sf9-Zellen

Die rekombinante „HpPT-2“ unterschied sich von allen bisherigen PTs aus Johanniskraut in ihrer Funktion. Hydroxylierte Xanthone, die bei den anderen untersuchten AS-PTs die besten Substrate darstellten, wurden von „HpPT-2“ nicht umgesetzt, jedoch wurde enzymatische Aktivität beim Einsatz des Acylphloroglucin-Derivates PIBP als Ausgangsstoff gefunden (Tabelle 5.17).

Tabelle 5.17 Übersicht des von HpPT-2 mit DMAPP oder GPP umgesetzten Substrates

Substrate	Monoprenylierung	Diprenylierung
 Phlorisobutyrophenon + DMAPP	 1-(3-Prenyl-2,4,6-trihydroxyphenyl)- 2-methylpropan-1-ol	 3',5'-Diprenylphlorisobutyrophenon oder  3,5-Dihydroxy-2-isobutyryl-6,6-bisprenyl- cyclohexa-2,4-dien-1-on
 Phlorisobutyrophenon + GPP	 3'-Geranylphlorisobutyrophenon und/oder  8-Isobutyryl-2-methyl-2-(prenylmethyl)chromanyl-5,7-diol	-

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenketten

5.6.7.1. Aktivitätsnachweis von HpPT-2 mit PIBP und Strukturanalyse des Produktes „P2“

Bei Verwendung des Prenyldonors DMAPP konnten im Gegensatz zur Negativkontrolle bei fast vollständiger PIBP-Umsetzung gleich zwei neue, zusätzliche Peaks im HPLC-Chromatogramm gefunden werden, die sich im UV-Spektrum nicht wesentlich von dem des Substrates unterschieden und hinter denen sich aufgrund der erfahrungsgemäßen Verschiebung in der Retentionszeit ein monoprenyliertes ($R_t = 13,5$ min) und ein zweifach prenyliertes Produkt ($R_t = 14,8$ min) verbargen (Abbildung 5.43). Bei dem einfach prenylierten Produkt war die Position der Anknüpfung am Aromaten höchstwahrscheinlich eines der freien C-Atome des Benzolringes, analog der bei ZHOU *et al.*^[293] oder BOUBAKIR *et al.*^[218] beschriebenen Katalyse. Für „P2“, das unter Einfluss von „HpPT-2“ mit zwei Isopreneinheiten verknüpft wurde, waren zwei unterschiedliche Varianten denkbar. Einerseits konnte an beiden unsubstituierten, aromatischen C-Atomen jeweils ein Prenylrest gebunden werden, jedoch war es auch möglich, dass wie bei der Biosynthese von Patulon (siehe 5.6.3.3) beide Moleküle DMAPP auf dasselbe C-Atom übertragen wurden bei gleichzeitiger Aufhebung des aromatischen Systems im Benzolring, wie es für PIBP und andere Acylphloroglucin-Derivate ebenfalls schon publiziert wurde^[151]. Ein Indiz für letzteren Reaktionsablauf mochte die Verschiebung des Maximalpeaks im UV-Spektrum von 286 nm des Substrates hin zu 291 nm sein, ähnlich der Absorptionswellenlänge des Patulons mit ähnlicher Partialstruktur. MS- und NMR-Untersuchungen müssen zur Strukturaufklärung jedoch künftig erst noch durchgeführt werden, um genauere Aussagen treffen zu können.

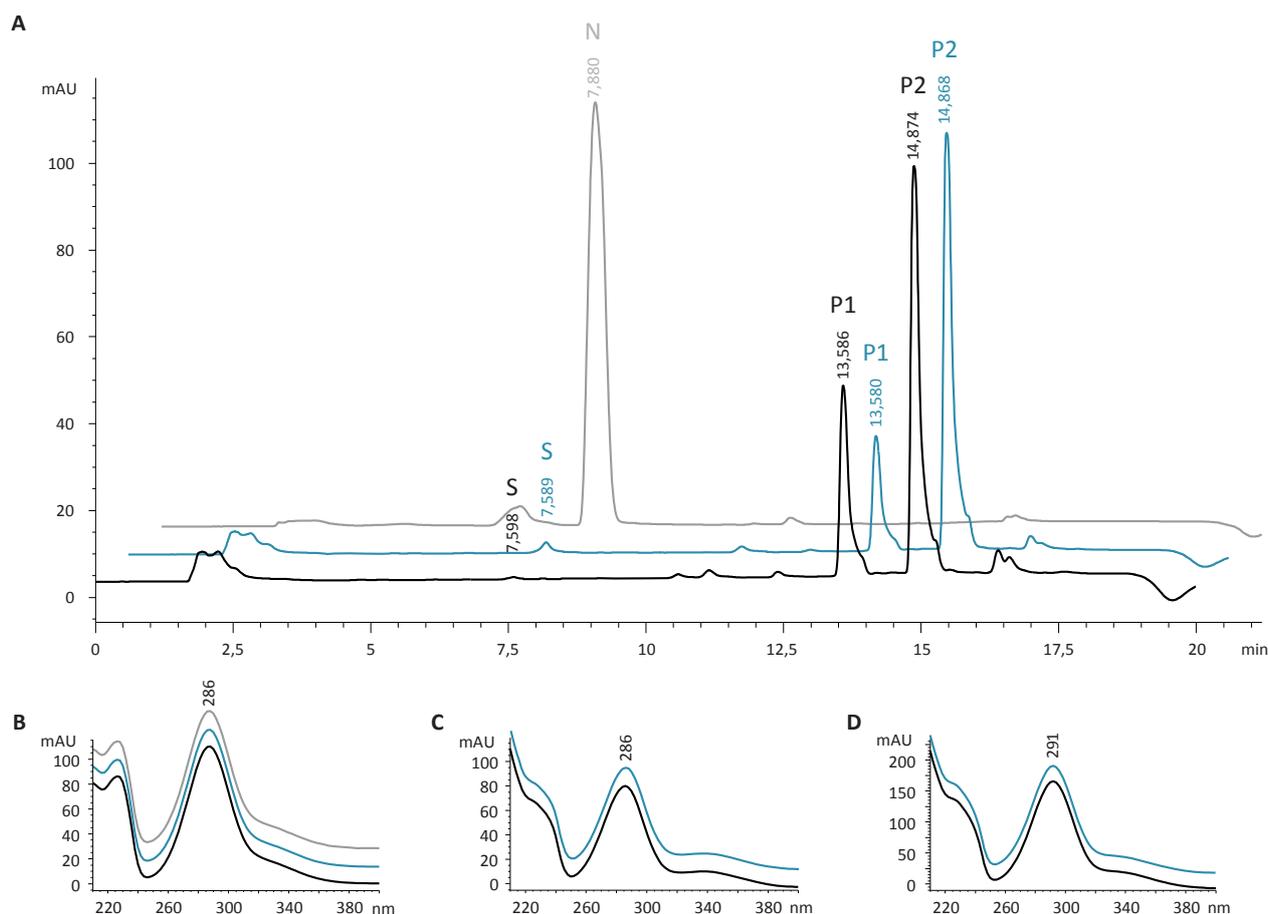


Abbildung 5.43 HPLC-Untersuchung von Standard-Inkubationen von HpPT-2 mit PIBP und DMAPP (schwarz) oder GPP (blau) in TRIS-HCl-Puffer. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 286$ nm. N: Negativkontrolle; P1: Produkt 1; P2: Produkt 2; S: Substrat (PIBP). **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektren von „P1“. **D:** UV-Spektren von „P2“

Wurde testweise für diese AS-PT mit GPP ein C_{10} -Terpenrest als Prenyldonor eingesetzt, so ließen sich interessanterweise ebenfalls zwei neue Produktpeaks im HPLC-Chromatogramm detektieren (Abbildung 5.43). Bei vergleichbar hoher Umwandlung von PIBP lieferten die Retentionszeiten ($R_t = 13,5$ min und 14,8 min) und auch UV-Spektren beider Produkte starke Ähnlichkeit zu den Daten aus der vorherigen Reaktion mit DMAPP, nur lässt dieses Ergebnis keine allzu einfache Schlussfolgerung zu. Das Auftreten und die R_t von „P1“ kann nur schwierig erklärt werden, da im Abgleich mit der Monoprenylierung mittels DMAPP in dieser Reaktion schließlich nicht auf eine Reaktion eines halben Moleküls GPP mit dem Substrat PIBP abgezielt werden kann. Es musste sich also entweder um Verunreinigungen des GPP aus der chemischen Synthese handeln, bei dem u.a. DMAPP als Nebenprodukt den Peak für „P1“ bewirkte, oder aber um einen Artefakt des GPP, das sich möglicherweise aufgrund einer Kohlenwasserstoffkettenfaltung ähnlich lipophil auf der RP-HPLC-Säule verhielt wie die nur halb so lange Kette des DMAPP zuvor. Für „P2“ konnte hingegen vereinfacht angenommen werden, dass es sich um monogeranyliertes PIBP handeln musste, weil in der Summe bei beiden Produkten „P2“ die gleiche zeitliche Verschiebung der Elution in der HPLC-Analyse auftrat und auf eine gleiche Anzahl angehängter C-Atome – nämlich jeweils zehn Stück – und somit gleich starke Erhöhung der Lipophilie schließen ließ. Die Anknüpfungsposition wurde ebenso wie bei der DMAPP-Reaktion an einem der beiden freien C-Atome des Aromaten vermutet^[294–296]. Da sich in diesem Fall das UV-Spektrum jedoch von dem des Substrates leicht unterschied, vergleichbar mit „P2“ aus der DMAPP-Reaktion, wurden Spekulationen über die Struktur des Produktes angestellt, die diese Verschiebung des UV-Maximums erklärten. Als mögliche Struktur wurde ein monogeranyliertes PIBP-Derivat postuliert (Tabelle

5.17), welches einen Ringschluss ähnlich dem Hyperxanthon E (Abbildung 4.7)^[27] durchlief. Dadurch könnte das aromatische System über das Belegen einer der phenolischen Hydroxylgruppen beeinflusst und gleichzeitig die Hydrophilie des Produkt-Moleküls herabgesetzt werden, was jedoch rein spekulativ ist.

Eine einmalig durchgeführte MS-Analyse mit gesammelten, extrahierten Inkubationsansätzen (Abbildung 5.44) lieferte zwei Hauptsignale von Molekül-Ionen $[M-H]^+$ bei $m/z = 195$ (Substrat im Negativmodus) und $m/z = 331$ („P2“), was der Masse des Substrates PIBP ($M = 196,20$ g/mol) plus der Masse des GPP ($M = 137,25$ g/mol) entsprach. Zwei Massen fehlten wegen eines durch die Geranyl-Seitenkette substituierten Wasserstoff-Atoms ($M = 1,0$ g/mol) und wegen der Messung im negativen Ionisierungsmodus. Sowohl zu der vorhergesagten, möglichen offenkettigen Produktstruktur als auch der cyclisierten Variante korrelierte dieses Produktsignal. Die Aufspaltung des Produktsignals durch die MS/MS-Kopplung lieferte u.a. einen Peak für das degeranylierte Acylphloroglucin-Grundgerüst ($m/z = 194$). Somit konnte eine vermutete Geranylierung des Substrates während der Inkubation mit „HpPT-2“ tatsächlich angenommen werden, was jedoch keiner Identifizierung der Molekülstrukturen gleichkam. Gerade bedingt durch das wahrscheinliche Vorliegen von Strukturisomeren war eine nachgeschaltete NMR-Untersuchung unabdingbar, um sowohl die Position des Geranylsubstituenten als auch die Frage nach der Cyclisierung der Geranyl-Seitenkette am Aromaten zu klären. Eine in großem Ansatz gewonnene Probe des geranylierten Produktes „P2“, gewonnen in unserer AG von MARCO GRULL, befindet sich in Vorbereitung zur NMR-Vermessung.

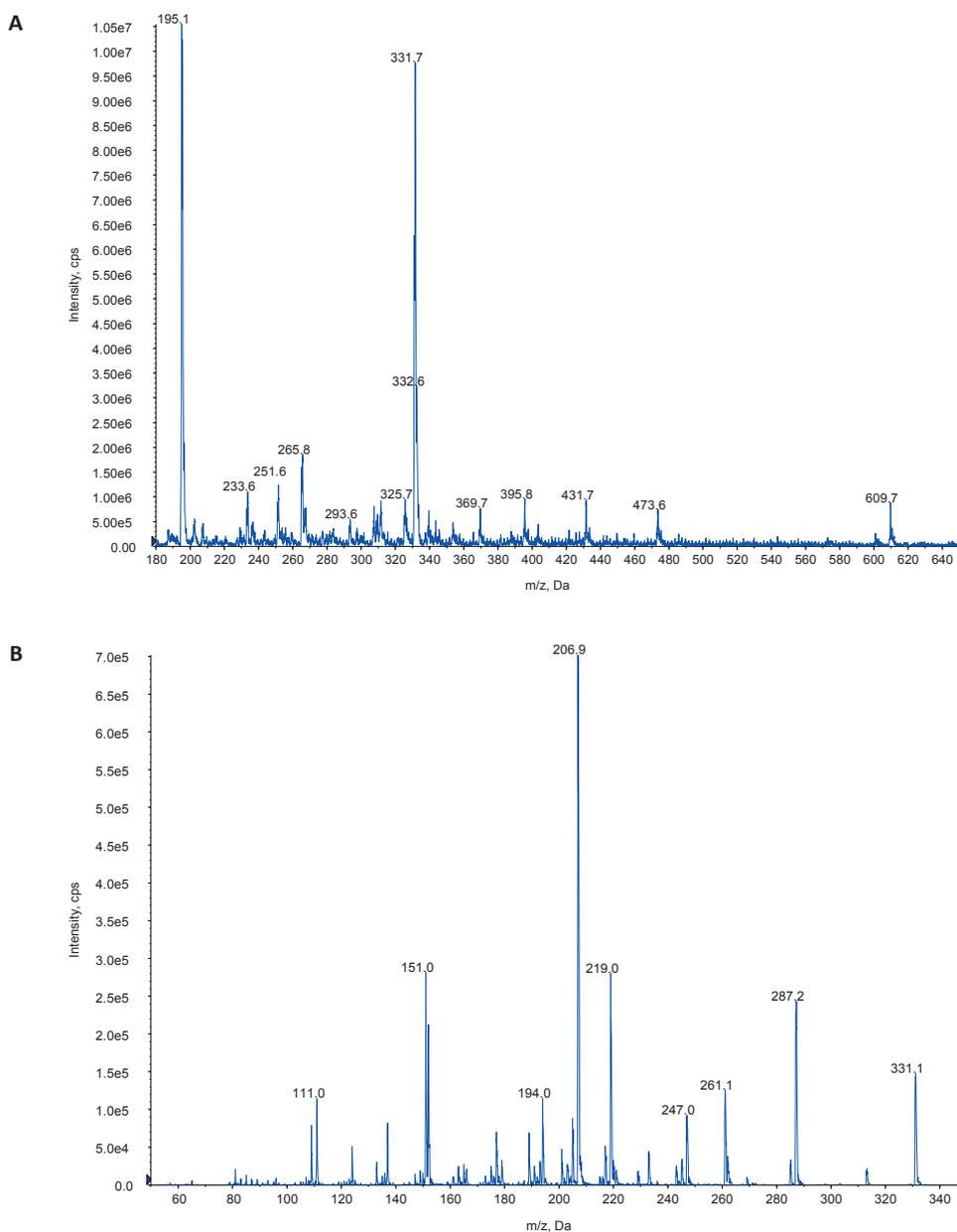
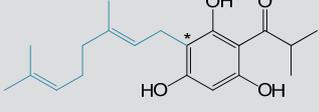
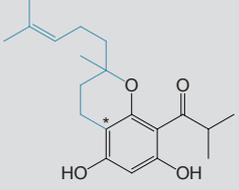
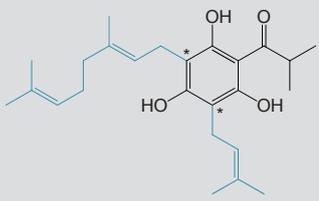
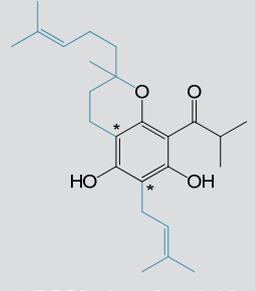
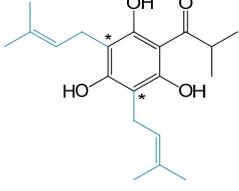


Abbildung 5.44 MS-Analyse des Produktes „P2“ aus einer Standard-Inkubation von HpPT-2 mit PIBP und GPP in TRIS-HCl-Puffer. **A:** Massenspektrum (EMS ESI neg) des aus dem Inkubationsansatz isolierten Produktes „P2“. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI neg) der Fragmentierung des MS-Signals vom Molekül-Ion bei $m/z = 331$

5.6.7.2. Aktivitätsnachweis von HpPT-6 mit dem monogerylierten Produkt von HpPT-2

Eine weitere Besonderheit wurde bei Experimenten mit der rekombinanten „HpPT-6“ entdeckt. Diese zeigte alleine keine enzymatische Aktivität beim Substratscreening mit vorausgewählten Aromaten (Abbildung 4.7), akzeptierte aber in testweise kombinierten Inkubationsansätzen mit „HpPT-2“ deren Produkte „P2“ (Abbildung 5.43).

Tabelle 5.18 Übersicht der von HpPT-6 mit DMAPP umgesetzten Substrate bzw. vermutlichen Produkte von HpPT-2

Substrate (Produkte von HpPT-2)	Monoprenylierung
 <p>1-(3-Geranyl-2,4,6-trihydroxyphenyl)-2-methylpropan-1-on</p> <p>oder</p>  <p>1-(5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-en-1-yl)chroman-8-yl)-2-methylpropan-1-on</p>	 <p>1-(3-Geranyl-5-prenyl-2,4,6-trihydroxyphenyl)-2-methylpropan-1-on</p> <p>oder</p>  <p>1-(5,7-Dihydroxy-2-methyl-2-(4-methylpent-3-en-1-yl)-6-prenylchroman-8-yl)-2-methylpropan-1-on</p>
 <p>1-(3,5-Diprenyl-2,4,6-trihydroxyphenyl)-2-methylpropan-1-on</p>	<p>Spuren eines enzymatischen Produktes detektierbar</p>

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenkette

Enzymassays, in denen PIBP und beide Prenyldonatoren DMAPP/GPP mit beiden rekombinanten AS-PTs inkubierten, zeigten nach Extraktion im HPLC-Chromatogramm (Abbildung 5.45) einen Hauptpeak ($R_t = 16,8$ min), der in vorherigen Untersuchungen und der Negativkontrolle nicht gefunden werden konnte und nur in dieser PT-Kombination auftrat. Gleiche Ergebnisse waren zu beobachten, wenn ausschließlich „HpPT-6“ in Verbindung mit DMAPP und den einzelnen, extrahierten Reaktionsmischungen von „HpPT-2“ (siehe 5.6.7.1) als Substrat getestet wurde. Die Verschiebung der R_t um ca. 2 min von „S2“ zu „P“ passte zu einer Addition von einem Molekül DMAPP, und auch das UV-Spektrum erschien dem des „S2“ nahezu identisch. Leider ließ sich im Rahmen dieser Arbeit erneut nur eine Annahme über die Struktur des Produktes aufstellen, die in zukünftigen Identifizierungsversuchen erst noch geprüft und bewiesen werden muss. Es ist jedoch aus der Erfahrung mit anderen untersuchten PTs heraus naheliegend, dass die in Tabelle 5.18 vorgeschlagenen Strukturen für „P“ eine sehr wahrscheinliche Lösung anbieten. Denkbar ist sonst nur noch eine Struktur, bei welcher sich Geranyl- und Prenylrest am selben C-Atom anlagern – vergleichbar Patulon oder den MPAPs nach Li *et al.*^[151]. Jedoch kann dies ohne MS und NMR nur spekuliert werden.

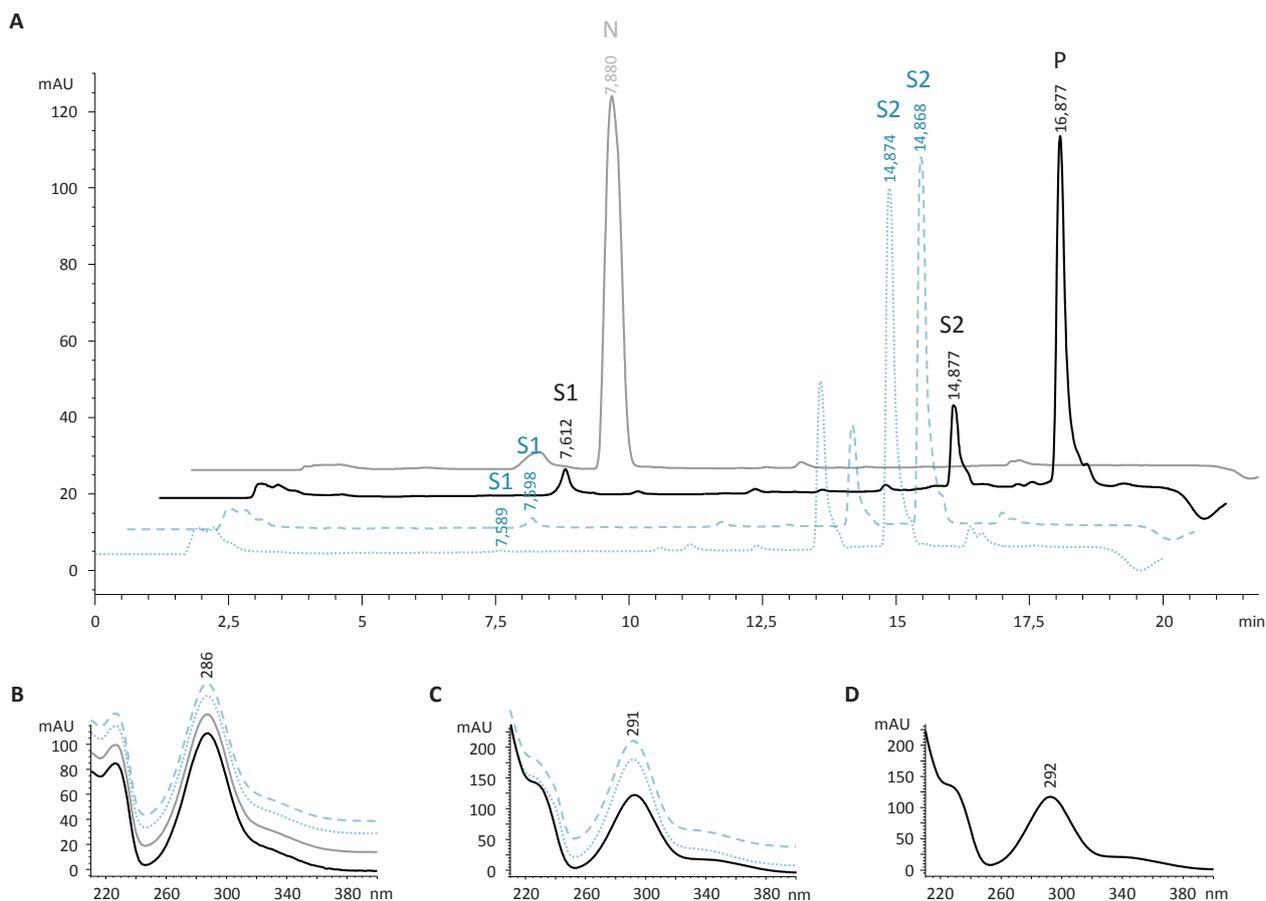
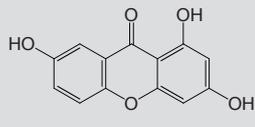
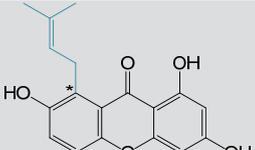
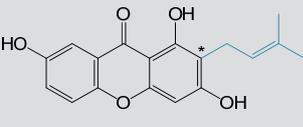
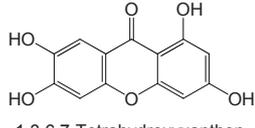
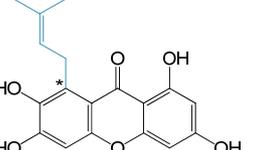


Abbildung 5.45 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-6 mit bereits von HpPT-2 prenyliertem PIBP und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer. **A:** HPLC-Chromatogramm (blau: Vergleichsläufe für HpPT-2 mit DMAPP/GPP), HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 286$ nm. N: Negativkontrolle; P: prenyliertes Produkt; S1: Substrat 1 (PIBP); S2: Substrat 2 = Produkt 2 aus HpPT-2-Ansatz (geranyliertes PIBP). **B:** UV-Spektren von „S1/N“. **C:** UV-Spektren von „S2“. **D:** UV-Spektrum von „P“

5.6.8. Aktive HpPT-5 aus Sf9-Zellen

Auch die rekombinante „HpPT-5“ zeigte PT-Aktivität mit mehrfach hydroxylierten Xanthon-Grundgerüsten und reihte sich neben „HcPT“, „HcPT-1“ und „HpPT-1“ in die Liste der AS-PTs ein, die sowohl an 1,3,6,7-THX als auch an 1,3,7-THX jeweils eine Isopreneinheit knüpften (Tabelle 5.19). Eine Besonderheit bei „HpPT-5“ war die wirklich gute Akzeptanz von 1,3,7-THX, welches spezifisch und so gut wie vollständig innerhalb der Standard-Inkubationszeit von 30 min zu einem monoprenylierten Xanthon umgesetzt wurde (Abbildung 5.46). „HpPT-5“ war somit die geeignetste PT aus Johanniskraut für 1,3,7-THX und formte zusätzlich aus dem anderen aktiven Substrat ein monoprenyliertes Produkt, qualitativ und quantitativ vergleichbar zu den katalysierten Reaktionen der zuvor betrachteten AS-PTs (siehe Anhang 10.4.5).

Tabelle 5.19 Übersicht der von HpPT-5 mit DMAPP umgesetzten Substrate

Substrate	Monoprenylierung
 1,3,7-Trihydroxyxanthon + DMAPP	 oder  1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon 1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon
 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon + DMAPP	 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenkette

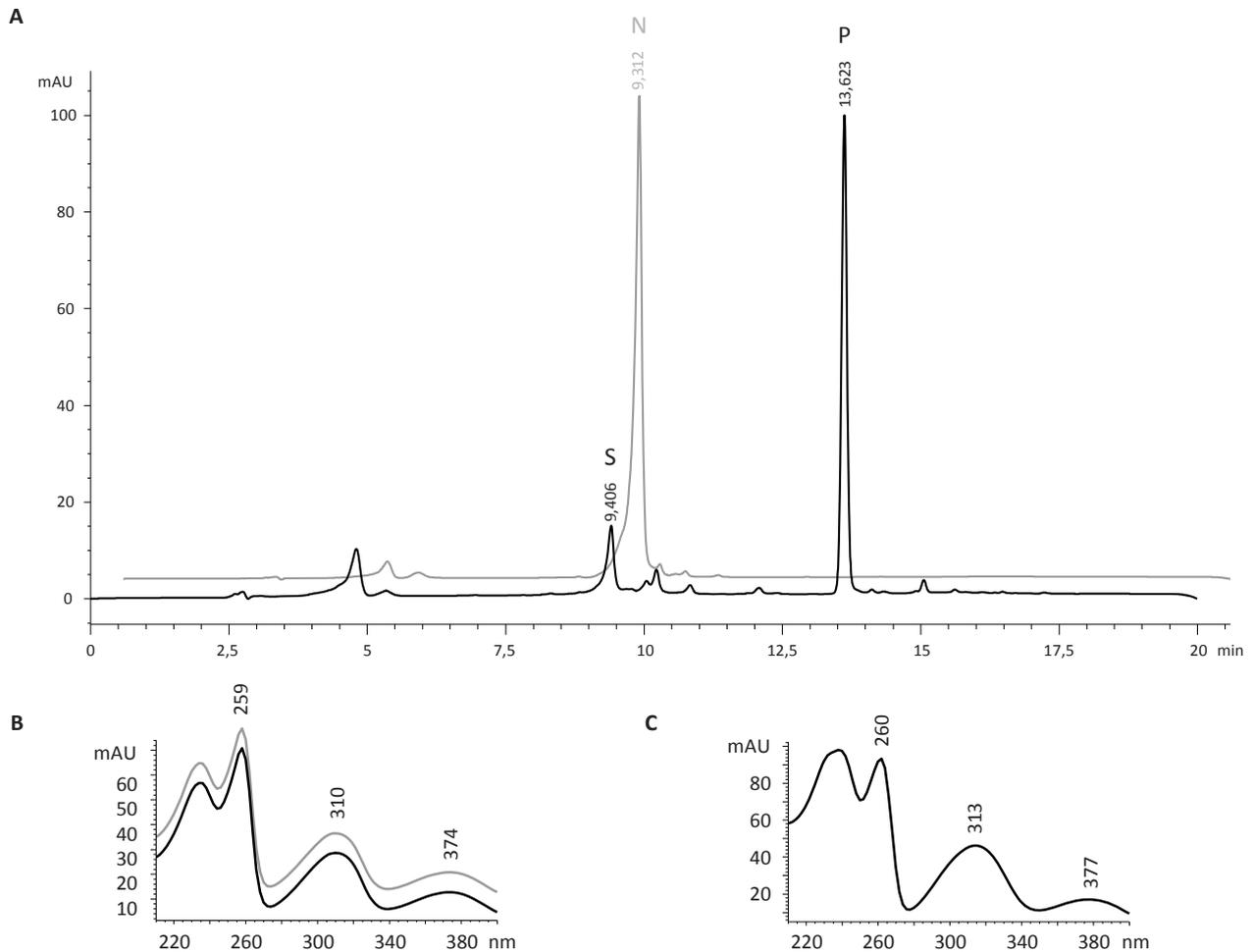


Abbildung 5.46 HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-5 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer (Tabelle 4.14). **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1 (Tabelle 4.16), Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; S: Substrat (1,3,7-THX). **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum von „P“

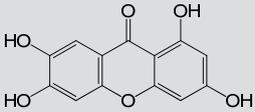
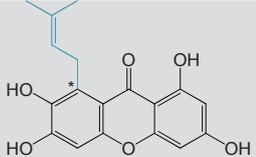
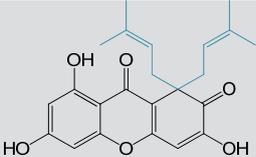
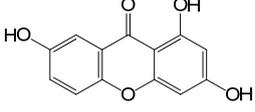
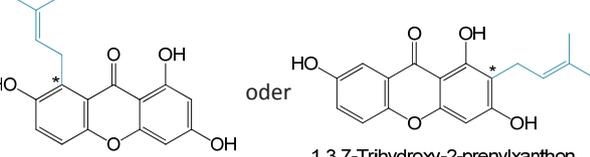
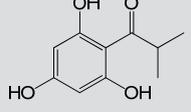
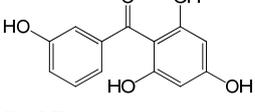
5.6.9. Aktive HpPT-8 aus Sf9-Zellen

Auch „HpPT-8“ zeichnete sich in den Testungen als eine PT mit Xanthon-Aktivität aus, wie sie bereits in gleicher Weise bei „HcPT“, „HcPT-1“, „HpPT-1“ und „HpPT-5“ beschrieben wurde (Tabelle 5.20). Die Sub-



strate 1,3,6,7-THX und 1,3,7-THX konnten nach Einwirkung von rekombinanter „HpPT-8“ mit DMAPP zu einem geringen Prozentsatz jeweils als ihre monoprenylierten Derivate in HPLC-Analysen detektiert werden (siehe Anhang 10.4.6). Für 1,3,6,7-THX konnte außerdem auch die Bildung von Patulon nachgewiesen werden. Zusätzlich zu diesen beiden Xanthonen waren im Substratscreening geringe Mengen von möglichen monoprenylierten Produkten aus PIBP und 2,3',4,6-THB anhand ihrer UV-Spektren zu entdecken. Für diese vermutete Aktivität bedarf es aber aufgrund beschränkter Substratmengen und der limitierten enzymatischen Produktbildung weiterer Untersuchungen bzw. Optimierungen, bevor sichere Aussagen getroffen werden können.

Tabelle 5.20 Übersicht der von HpPT-8 mit DMAPP umgesetzten Substrate

Substrate	Monoprenylierung	Diprenylierung
 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon + DMAPP	 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon	 Patulon
 1,3,7-Trihydroxyxanthon + DMAPP	 1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon oder 1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon	–
 Phlorisobutyrophenon + DMAPP	Spuren eines enzymatischen Produktes detektierbar	–
 2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon + DMAPP	Spuren eines enzymatischen Produktes detektierbar	–

* vermutete, d.h. nicht näher bestimmte Position der Prenyl-Seitenkette

6 DISKUSSION

6.1. Aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen

Die Prenylierung von Naturstoffen ist ein grundlegender Erklärungsansatz für deren große Diversität, und nicht selten ist eine Funktion oder vorhandene Bioaktivität solcher natürlichen Produkte zwingend von einer Prenylierung abhängig^[297]. Die Enzyme aus der Superfamilie der Prenyltransferasen (PTs) katalysieren dabei die notwendigen Kondensationsreaktionen von Prenyleinheiten auf sehr unterschiedliche Akzeptormoleküle, die von kleinen aliphatischen/aromatischen Biomolekülen bis zu den hochmolekularen Proteinen oder Nukleinsäuren reichen. Wie bereits in der Einleitung vorgestellt (siehe 1.3), sind für die vorliegende Arbeit die aromatischen Sekundärstoffwechsel-PTs (AS-PTs) von Interesse. Vertreter dieser großen PT-Untergruppe bevorzugen kleine aromatische Substrate (u.a. Acylphloroglucine (APs), Flavonoide, Xanthone, Cumarine, Indolalkaloide), aus denen sie durch den Transfer von hauptsächlich Dimethylallyl- und/oder Geranylresten – regulär über deren C–1- oder invers über deren C–3-Atom – bioaktive Sekundärmetabolite formen. Ausgehend von der Protein-Primärstruktur sowie den strukturellen und biochemischen Eigenschaften lassen sich die AS-PTs nach WINKELBLECH *et al.*^[158] weiter unterteilen (Abbildung 6.1).

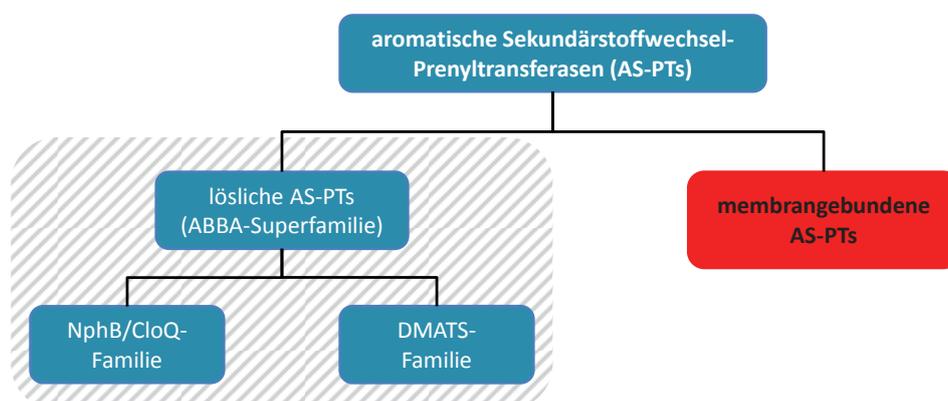


Abbildung 6.1 Einteilung von Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen. Grau schraffiert: AS-PTs aus Bakterien und Pilzen; NphB/CloQ: Phenol- / Naphthalin- / Phenazin-PTs; DMATS: Indol- / Tyrosin-PTs (Dimethylallyltryptophan-Synthasen); rot hinterlegt: Zielenzyme dieser Arbeit

In Bakterien (v.a. *Streptomyces*-Arten) und Pilzen (v.a. *Claviceps*- und *Aspergillus*-Arten) existieren cytosolische AS-PTs, die sich durch eine besondere Proteinstruktur auszeichnen. Vorliegende Röntgenkristallstrukturen zeigen, dass diese Enzyme in ihrer Sekundärstruktur ein 10-strängiges, antiparalleles β -Faltblatt aus fünf sich wiederholenden $\alpha\beta\alpha$ -Strukturmotiven (namensgebend für die Superfamilie der ABBA-PTs) bilden. Diese β -Faltblattstruktur formt innerhalb der löslichen AS-PTs einen Fass-ähnlichen Reaktionszylinder, in dem die Prenylierungen stattfinden^[158,162,167]. Durch die so entstehende, relativ große enzymatische Bindetasche lässt sich die für die ABBA-PTs typische breite Substratspezifität in Bezug auf Stickstoffhaltige und -freie aromatische Prenylakzeptoren erklären^[298,299]. Sowohl die Löslichkeit im Cytosol als auch die verhältnismäßig weitgefaste Akzeptanz unterschiedlicher aromatischer Substrate sind Unterscheidungsmerkmale zu den Charakteristika von membranständigen AS-PTs aus Pflanzen^[158,300], die bereits bei der theoretischen, bioinformatischen Vorab-Klassifizierung angesprochen wurden (siehe 5.2.3). Für die löslichen Enzyme ist darüber hinaus auch ihre Primärstruktur charakteristisch: Sie besitzen keine Aspartat-reichen konservierten Motive im Vergleich zu den pflanzlichen AS-PTs. Nicht einmal das verkürzte erste Motiv (N/D)DxxD, was bei den zuletzt genannten PTs für die Anlagerung von divalenten Kationen zur Bindung des Prenyldiphosphats notwendig ist^[276,301], taucht in den Proteinsequenzen auf. Demzufolge ist es auch nicht



verwunderlich, dass sich die katalysierten Reaktionen von löslichen AS-PTs der ABBA-Superfamilie nicht von zweiwertigen Kationen abhängig zeigen – einzige Ausnahme ist die Mg^{2+} -abhängige „NphB“^[162]. Positiv geladene Aminosäuren im aktiven Zentrum übernehmen stattdessen die Funktion des Mg^{2+} ^[302]. Obwohl sie viele strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten zeigen sowie evolutionär miteinander verbunden sind^[166,303], lassen sich dennoch die ABBA-PTs nicht nur aufgrund ihres unterschiedlichen Ursprungs, sondern auch anhand ihrer Sequenzen und Substratspezifitäten in zwei Untergruppen einteilen^[158,297,304]. Auf der einen Seite stehen die bakteriellen AS-PTs aus der NphB/CloQ-Familie, die bevorzugt Chinone, Naphthaline und Phenazine prenylieren. Auf der anderen Seite finden sich die aus Pilzen stammenden Dimethylallyltryptophan-Synthasen (DMATS; u.a. „FgaPT2“, „CymD“), deren Substrate vorzugsweise Indol- und Tyrosin-Grundgerüste sind und die große Sequenzähnlichkeit zu der zu allererst entdeckten Tryptophan-PT „DmaW“ (aus *Claviceps purpurea*, beteiligt an der Mutterkornalkaloid-Biosynthese) zeigen^[305,306]. Innerhalb ihrer Familien treten bei beiden PT-Gruppen homologe Sequenzen auf, jedoch zeigen sich keine bedeutenden Sequenzähnlichkeiten der beiden großen Untergruppen untereinander.

Alle zwölf im Rahmen der vorliegenden Arbeit (um-)klonierten und untersuchten Enzyme zeigen erwartungsgemäß keine Ähnlichkeiten zu den PTs der ABBA-Superfamilie. Dies war einerseits vorhersehbar, da es sich beim Johanniskraut um einen pflanzlichen Organismus handelt und ABBA-PTs bisher ausschließlich in Pilzen und Mikroorganismen beschrieben waren^[301]. Andererseits wurde mit der gewählten Isolierungsstrategie selbst gewährleistet, dass nur Enzyme im Johanniskraut erfasst werden, welche die typischen Eigenschaften pflanzlicher AS-PTs (siehe 5.2.3) besitzen. Beispielsweise wurden nur cDNA-Sequenzen aus der subtraktiven cDNA-Datenbank von *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen von MÜLLER^[220] extrahiert und vervollständigt, die sich in Primärstruktur-Abgleichen mit bekannten pflanzlichen AS-PTs aufgrund großer Sequenzhomologie qualifizierten. Weiterhin wurden für die Klonierung der ersten AS-PT „HpPT-1“ aus *H. perforatum*, die nach Sequenzvervollständigung fortan für alle weiteren PT-Sequenzsuchen und -Klonierungen als Prototyp herangezogen wurde, spezielle degenerierte Primer verwendet (siehe 5.4.4.1). Diese Oligonukleotide wurden von zwei Aspartat-reichen Motiven von Flavonoid-/Homogentisat-PTs, zu denen auch die funktionell neuartige und für die Hyperforin-Biosynthese interessante „HIPT-1“^[152,238] gehörte, abgeleitet – zwei hochkonservierte Sequenzabschnitte, die ausschließlich bei pflanzlichen AS-PTs vorkommen und durch deren Einbindung theoretische ABBA-PTs von Beginn an aussortiert wurden^[158]. Eben diese Motive „NQxxDxxxD“ und „KDxxDxxGD“ waren also ein zentraler Ausgangspunkt für die molekularbiologischen Aufgaben im Rahmen dieser Arbeit. Sie wurden durch die Pionierarbeiten auf dem Gebiet der pflanzlichen AS-PTs von PROF. DR. KAZUFUMI YAZAKI (Universität Kyōto, Japan) und seiner AG^[163,168,175–177,238,301,307] entdeckt und anhand erster vorliegender Sequenzen als ein generell charakteristisches AS-PT-Familienmerkmal prognostiziert. Wann auch immer in der vorliegenden Arbeit nun Sequenzvergleiche oder BLAST-Analysen durchzuführen waren, wurden diese Aspartat-reichen Motive herangezogen. Beim initialen Erstellen der degenerierten Primer zum Fischen von PT-cDNA-Fragmenten aus *H. perforatum* (siehe 5.4.4.1) standen der noch jungen Hypothese allerdings die verhältnismäßig geringe Anzahl an bekannten Volllänge-Sequenzen zum Vergleich und zum Ableiten der Oligonukleotide gegenüber. Ohne vorliegende Genom- bzw. Transkriptom-Datenbank des Echten Johanniskrauts bot sich jedoch zum damaligen Zeitpunkt kein alternativer pragmatischer Klonierungsansatz. Trotz der eher kleinen Stichprobenanzahl wurde sich daher dennoch auf den publizierten Erfahrungsschatz verlassen, was sich im Nachhinein durch die identifizierte Struktur der Johanniskraut-PTs aus dieser Arbeit sowie weiterer zwischenzeitlich publizierter pflanzlicher AS-PTs als allgemeingültig richtig herausstellte (Abbildung 6.2). Wie das nun erweiterte Alignment beweist, sind nicht nur die Aminosäuren Asparagin (N) und Asparaginsäure (D) innerhalb der angesprochenen Motive hochkonserviert. Zusätzlich fällt auf, dass auch fast alle weiteren Aminosäuren dazwischen sehr ein-

heitlich erscheinen, d.h. auch diese Positionen aus einer eng limitierten Auswahl unterschiedlicher Aminosäuren heraus besetzt werden (zwischen 2–5).

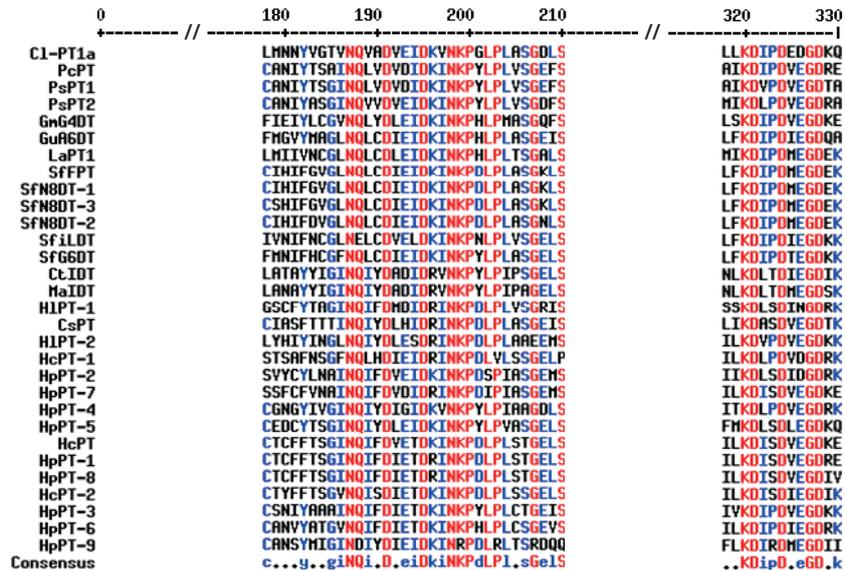


Abbildung 6.2 Illustration hochkonservierter Aspartat-reicher Motive von publizierten pflanzlichen AS-PTs und klonierten Johanniskraut-AS-PTs aus der vorliegenden Arbeit im Aminosäure-Sequenzvergleich (für PT-Informationen siehe 8.1; für vollständiges Alignment siehe Anhang 10.3). Rot: hochkonservierte Aminosäuren; blau: semikonservierte Aminosäuren

Zwei weitere typische Proteinmerkmale aller bisher bekannten AS-PTs aus Pflanzen sind das Vorhandensein mindestens einer, erfahrungsgemäß eher mehrerer transmembranärer α -Helices (TMHs) und eines N-terminalen Transitpeptids^[163,177,238]. Mit den beiden validierten Online-Tools TMHMM und SOSUI (siehe 3.9) wurden die zuverlässigsten und einheitlichsten Vorhersagen für hydrophobe Protein-Domänen erhalten, die tatsächlich auf Integrität in Biomembranen schließen lassen. Für alle zwölf untersuchten Johanniskraut-PTs wurden mindestens fünf und maximal neun TMHs prognostiziert, was den Anforderungen an pflanzliche AS-PTs genügt. Die Laser-mikroskopischen Analysen der als repräsentatives Beispiel herangezogenen, rekombinanten fluoreszenzmarkierten „HcPT-2“ (siehe 5.2.3.3) stützen die theoretischen Berechnungen und Annahmen zur Membranständigkeit. In den Biomembranen welcher Zellorganellen letztlich die Johanniskraut-PTs ihren natürlichen Bestimmungsort haben bzw. in heterologen Expressionssystemen ihren Ausweichort finden, konnte mit den gegebenen technischen Möglichkeiten bisher nicht detailliert aufgeklärt werden. „LePGT-1“ als erste publizierte AS-PT^[168,301] ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu finden, und alle weiteren Familienmitglieder, bei deren Veröffentlichung auf die Lokalisierung eingegangen wird, sind als plastidäre Membranproteine beschrieben^[u.a. 169–171,173,174]. Neun der hier untersuchten Enzyme aus Johanniskraut zeigen in Berechnungen ebenfalls ein putatives N-terminales Chloroplasten-Transitpeptid (cTP), was auf ein ähnliches Verhalten *in planta* wie für die publizierten Vertreter rückschließen lässt. Mit „HcPT-2“ und „HpPT-3“ sind darüber hinaus zwei voraussichtlich in Mitochondrien vorkommende AS-PTs vorhanden, und „HcPT-1“ lässt trotz unterschiedlicher Vorhersage-Strategien keine definitive Aussage über einen möglichen Bestimmungsort zu. Es erfüllen somit alle analysierten Johanniskraut-PTs auch diese dritte Voraussetzung für Mitglieder aus der Enzymfamilie der pflanzlichen AS-PTs und grenzen sich somit immer weiter von den ABBA-PTs ab. Von allen drei festgelegten AS-PT-Merkmalen sollte sich im Fall der vorliegenden Johanniskraut-PTs jedoch am wenigsten auf die putative Funktion und Richtung der TPs verlassen werden. Die Komplexität dieser Erkennungssequenzen ist ein bisher nur unzureichend verstandenes Mysterium, v.a. weil es keine allgemeinen, einheitlichen oder gar konservierten



Aminosäuren/Aminosäureabfolgen innerhalb pflanzlicher PTs gibt und sie sich auch in ihrer Länge drastisch unterscheiden können („HpPT-2“: 12 aa, „HpPT-5“: 77 aa). Folglich sollten die Vorhersagen durch Software-Anwendungen mit Vorsicht betrachtet werden, da deren zugrunde liegenden Logarithmen/Quellcodes gerade bei exzessiver Heterogenität der Anfragen Grenzen gesetzt sind – so wie jeder theoretischen Voraussage. In Bezug auf die Verlässlichkeit von Software-gestützten Prognosen kann mit der phylogenetischen Analyse (siehe 5.2.3.4) ein weiterer Aspekt aufgerufen werden. Auf der einen Seite erscheinen alle Johanniskraut-PTs erwartungsgemäß nah beieinander und in eng verwandten Kladen, und auch die Nähe zu den Acylphloroglucin (AP)-PTs der Cannabaceae und Flavonoid-PTs der Moraceae entspricht unter funktionellen Aspekten den Erwartungen. Auch die klare Abtrennung zu Enzymen des Primärstoffwechsels entspricht gänzlich den Vermutungen. Andererseits treten aber auch zwei unerklärliche Eingruppierungen auf: Die evolutionsbezogene Platzierung von „HpPT-4“ bei den Plastochinon-PTs des Primärstoffwechsels widerspricht den übrigen detektierten Enzymeigenschaften pflanzlicher AS-PTs, und „HcPT-1“ wird trotz struktureller Charakteristika eines Sekundärstoffwechsel-Enzyms erst gar nicht zu all den anderen AS-PTs aus Pflanzen zugeordnet, sondern zeigt mehr Verwandtschaft zu der Primärstoffwechsel-PT „FPPS“ aus einem Säuger-Organismus. Natürlich darf auch diese Vorhersage nicht überbewertet werden und beunruhigen. Bedenkt man, dass es sich nur um eine hypothetische Prognose zur reinen Veranschaulichung mit Standardeinstellungen handelt, d.h. kein Anspruch an eine optimierte, ideale phylogenetische Analyse besteht, so relativiert sich diese vermeintliche Ungereimtheit. Ein weiterer Einflussfaktor auf die Verteilung ist das Vorliegen polymorpher PT-Gene im Johanniskraut (siehe 5.4), d.h. es existieren zu nahezu jedem klonierten Gen weitere beinahe identische Varianten, die auf Protein-Ebene zu Isoformen der AS-PTs führen (Daten unveröffentlicht). Um den Aufwand des Expressions- und Aktivitätsscreenings praktikabel zu halten, wurde sich im Rahmen dieser Arbeit aber nur auf jeweils eine Genvariante (und somit auch Johanniskraut-PT) konzentriert, die mehrfach unabhängig aus Johanniskraut isoliert und kloniert werden konnte. Diese Tatsache lässt Interpretationsspielraum, ob bereits derart geringfügige Abänderungen der PT-Struktur vielleicht eine andersartige Gruppierung verursachen, was jedoch als vernachlässigbar erachtet werden kann. Da all diese bioinformatischen Veranschaulichungen keinen Einfluss auf die vorliegenden Resultate haben, sondern nur die Entwicklung und die strategische Ausrichtung der Arbeiten mitgestalteten, wird nicht näher auf derartige Spekulationen eingegangen. All dem Abwägen nach liegt die Wahrheit über Proteinursprung, -eigenschaften und -verhalten höchstwahrscheinlich zwischen all den Vorhersagen und jeglichen Berechnungen der vorliegenden und anderer Arbeiten^[u.a. 220], und nur fortlaufende Untersuchungen werden den tatsächlichen Ist-Zustand in Zukunft aufdecken. Vor kurzem wurde daher bereits von ELINE BIEDERMANN (AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig) mit entsprechenden Lokalisations-Experimenten im Modell-Organismus Tabak (*N. benthamiana*) als homologem/adäquatem Expressionssystem begonnen. Tatsächlich zeigten dabei erste untersuchte AS-PTs (u.a. mit YFP C-terminal markierte „HcPT-2“) entgegen der mitochondrialen Voraussage eine membranständige, Chloroplasten-assoziierte Anordnung *in planta* (Daten unveröffentlicht).

Ein zusätzliches Attribut pflanzlicher gegenüber bakteriellen oder aus Pilzen stammenden AS-PTs ist deren obligate Abhängigkeit von divalenten Kationen als Cofaktor. Über das Aspartat-reiche Motiv N(Q/D)xxDxxxD binden sie zweiwertige Metallionen, über die sich unter Komplexbildung die Diphosphatreste der jeweiligen Prenyldonatoren anlagern können. Die zweiwertigen Kationen sind somit unerlässlich als Bindeglied für die Katalyse-Reaktion pflanzlicher PTs, wohingegen sie bei ABBA-PTs mit Ausnahme der Mg²⁺-abhängigen „NphB“ nur optional sind. Stattdessen dienen dort positiv geladene Aminosäuren (v.a. Arginin und Lysin) im aktiven Zentrum zur Bindung und Ausrichtung der Prenyldiphosphate und übernehmen die Funktion divalenter Kationen^[297,308]. In einigen Fällen wurde allerdings eine durch Ca²⁺ oder Mg²⁺ signifikant gesteigerte PT-Aktivität von Enzymen der NphB/CloQ- und DMATS-Familie beobachtet^[158,309]. Die-

jenigen Johanniskraut-PTs, für die nun im Rahmen der vorliegenden Arbeit katalytische Aktivität nachgewiesen wurde („HcPT“, „HcPT-1–2“ und „HpPT-1, -2, -5, -6, -8“), zeigen dieselbe enzymatische Abhängigkeit von divalenten Cofaktoren wie alle bis heute publizierten AS-PTs aus Pflanzen auch, was mit dem hochkonservierten ersten Motiv und der phylogenetischen Verwandtschaftsnähe zu ähnlich funktionellen Enzymen leicht begründet werden kann. Getestete Substrate, die in das im Vergleich zu den ABBA-PTs sehr limitierte Substratspektrum in Hinblick auf Prenylakzeptoren fielen, wurden von den aktiven Johanniskraut-PTs ausschließlich im Beisein von Mg^{2+} im Reaktionsansatz in ihre prenylierten Produkte überführt. „HcPT“, die bisher als einzige rekombinante AS-PT aus Johanniskraut mit unterschiedlichen Cofaktoren getestet wurde (siehe 5.6.3.2)^[263], zeigt zwar auch mit anderen zweiwertigen Ionen Enzymaktivität, die jedoch um mehr als die Hälfte im Vergleich zu Mg^{2+} verringert ist. Beim Einsatz von Fe^{2+} – in einer früheren Publikation bezüglich PT-Aktivität aus *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen als geeignetstes Kation evaluiert^[218] – sank sie sogar auf ein Viertel der effektivsten Umsetzung ab. Für die hier vorgestellten PTs aus Johanniskraut gilt demnach genauso wie für übrige rekombinante, pflanzliche AS-PTs, dass Mg^{2+} den besten Cofaktor repräsentiert.

Zusammenfassend ist mit den diskutierten Charakteristika eine Ein- und im Speziellen eine Abgrenzung zu anderen Klassen von AS-PTs recht einfach möglich. Für ungeklärte Grenzfälle oder eine detailliertere Betrachtung stehen weitere Eigenschaften zur Verfügung, die man sich zunutze machen kann – z.B. ein generell hoher pI-Wert, der nicht ungewöhnlich bei Membranproteinen im Gegensatz zu cytosolischen Proteinen ist, oder ein enger pH-Bereich im neutralen bis leicht alkalischen Milieu, bei dem pflanzliche AS-PTs am besten arbeiten. Auch diese Merkmale sind bei den vorliegenden Johanniskraut-PTs zu finden, fehlen aber bei den ABBA-PTs. Sie dienen als zusätzlicher Hinweis und stützen die Vorhersagen zu den Enzymen, sind aber keine primären Unterscheidungsmerkmale und ohne ausgeprägte Aussagekraft. Daher werden sie hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt, spielen jedoch wie auch in anderen Publikationen keine gewichtige Rolle als weitverbreitete Abgrenzungs- und Charakterisierungsparameter. Allein die theoretischen Möglichkeiten die identifizierten und isolierten PT-Gene sowie deren Genprodukte zu analysieren, u.a. mit ausführlichen BLAST-Analysen gegenüber der NCBI-Datenbank, gäben ausreichend Diskussionsstoff für ein eigenes Extrakapitel. Mit einem anders ausgerichteten Fokus sei jedoch nur kurz erwähnt, dass alle betrachteten AS-PTs Sequenzähnlichkeiten zu PTs des Plastochinon- und Vit. E-Stoffwechsels sowie schwächer ausgeprägt zur Ubichinon-Biosynthese aufweisen, was sich erwartungsgemäß aus der phylogenetischen Analyse ableiten ließ. Letztlich ist die wichtigste Schlussfolgerung, dass alle zwölf Enzyme aus Johanniskraut die bedeutendsten Merkmale der pflanzlichen AS-PT-Familie aufweisen, sich wie alle bekannten Vertreter verhalten und sich als vielversprechende Kandidaten für Expressionsanalysen zur Aufklärung von Sekundärstoffwechsel-Vorgängen im Johanniskraut qualifizieren.

6.2. Heterologe Expression membranassoziierter Prenyltransferasen

Eine der größten Hürden beim Arbeiten mit den membranständigen AS-PTs aus Johanniskraut war das Finden eines nachweislich funktionierenden Expressionssystems, das zuverlässig rekombinante, intakte Fremdproteine in ausreichender Menge produzieren kann. Mit dem natürlicherweise eukaryotischen Protein-Charakter der pflanzlichen AS-PTs und der vorhergesagten Membranständigkeit der zu untersuchenden PT-Gene sprechen bereits generell alle Voraussetzungen gegen den Einsatz eines prokaryotischen Expressionsorganismus. Mit diesen Überlegungen im Einklang steht auch, dass weder die von MÜLLER^[220] klonierte PT „Contig 339(HcPT-3)“ in *E. coli* zu exprimieren war noch andere pflanzliche, publizierte AS-PTs in Bakterien zur Aktivität gebracht, geschweige denn charakterisiert wurden^[u.a. 151,169–171,173,175,260]. Dennoch unternahm in unserer AG DR. MARIAM GAID einen Expressionsversuch von „HcPT“ und „HcPT-2“ in dem speziellen, kommerziell erwerblichen *E. coli*-Stamm „Lemo21(DE3)“ (New England Biolabs) – optimiert zur



Produktion von Membranproteinen durch fein abstimmbare/titrierbare Kontrolle der T7-RNA-Polymerase-vermittelten Überexpression mit dem Inhibitor T7-Lysozym^[310,311]. Zwar erlaubte dieses System die Produktion von membranständigen Fremdproteinen in nachweisbaren Mengen (SDS-PAGE), aber enzymatische PT-Aktivität in *in vitro*-Assays konnte mit Proteinen aus diesem *E. coli*-Stamm nicht beobachtet werden (Daten unveröffentlicht), weshalb selbst das als geeignet beworbene Lemo21(DE3)-System als letztmögliche prokaryotische Option für die Expressionsuntersuchungen der AS-PTs ins Abseits geriet.

Als einfachster, anspruchslosester und schnellster eukaryotischer Expressionsorganismus bieten sich die einzelligen Hefen wie *S. cerevisiae* an, aus denen die Mehrzahl aller bis heute publizierten AS-PTs aus Pflanzen, die kloniert und als rekombinante Proteine untersucht wurden, stammen. „CsPT-1“^[172] wurde zusätzlich noch in Insektenzellen, „LePGT1“ und „HIPT-1“ ausschließlich in Insektenzellen^[152,260] sowie „PcPT“^[170] und „PsPT1/2“^[169] in Tabak (*N. benthamiana*) exprimiert und analysiert. Im Gegensatz zu den zuvor erwähnten, publizierten AS-PTs konnte MÜLLER^[220] jedoch keine erfolgreiche Expression seiner untersuchten PT-Gene aus Johanniskraut in Hefe nachweisen. Da schlussfolgernd nicht ein einzelnes, gleichermaßen gut geeignetes Expressionssystem für alle pflanzlichen AS-PTs zu existieren scheint, war das Wirtssystem mit der besten Eignung empirisch zu ermitteln. Von diesem Blickwinkel ausgehend wurden daher exemplarisch die neu-entdeckte „HpPT-1“ aus *H. perforatum* und die überlassene „HcPT-2“ aus *H. calycinum* in Hefe getestet, jedoch ohne nachweisliche Expression und enzymatische Aktivität. Ähnliche Erfahrungen mit pflanzlichen AS-PTs sind beschrieben, und die Suche nach einer Erklärung wurde durch den erfahrenen PT-Forscher PROF. DR. KAZUFUMI YAZAKI (Universität Kyōto, Japan) unterstützt. Als Fazit der gemeinsamen Diskussionen ist demnach anzunehmen, dass heterologe Wirtszellen Fremdproteine nicht einheitlich gut oder schlecht produzieren können, aber generell u.a. wegen unterschiedlicher Codon-Nutzung Schwierigkeiten bereiten. Gerade auch Organismus-fremde Signalpeptide bereiten Probleme, da sie wie im Beispiel „HpPT-1“ das rekombinante pflanzliche Zielprotein mit Chloroplasten-Transitpeptid zu Organellen leiten sollen, die im heterologen Wirt *S. cerevisiae* jedoch gar nicht vorhanden sind. Dadurch kann es vorkommen, dass die Wirtszelle keine Destination für das rekombinante Membranprotein hat und es aufgrund eines fehlenden Zielortes entweder – bedingt durch die hydrophoben Transmembranregionen der AS-PTs – fehlgefaltet und inaktiv im Cytosol verbleibt (Proteinaggregate, *engl.* inclusion bodies) oder an einem Ausweichort in eine nicht dafür vorgesehene Membran eingebaut wird, was höchstwahrscheinlich mit Fehlfaltungen und einer räumlichen Trennung zu den möglichen Biosynthese-Substraten einhergeht. Einen dahingehend praktikablen Lösungsansatz setzten als Erste SHEN *et al.*^[174] und AKASHI *et al.*^[176] um, die teilweise das vorhergesagte Transitpeptid ihrer PTs entfernten und so zu enzymatischer PT-Aktivität gelangten. Das Verkürzen der beiden bereits als Volllänge-Gen überexprimierten Johanniskraut-AS-PTs resultierte in den PT-Varianten „HpPT-1_oT“ und „HcPT-2_oT“, die jedoch entgegen den Erwartungen ohne putative Transitpeptide das gleiche, negative Resultat ohne Enzymaktivität wie zuvor lieferten. Diesbezügliche Erklärungsversuche greifen erneut die Fehlfaltung im Cytoplasma und verminderte Proteinstabilität im fremden Organismus auf. Es ist auch bisher nicht bekannt, ob die AS-PTs aus Johanniskraut einem posttranslationalen Modifizierungsmechanismus unterliegen, der von *S. cerevisiae* nicht oder nicht korrekt prozessiert werden kann, jedoch grundsätzlich für die Enzymaktivität notwendig ist. Ein einzelner dieser aufgeführten Gesichtspunkte kann bereits Grund genug sein, dass Hefezellen keine aktiven rekombinanten PTs bereitstellen, und im schlimmsten anzunehmenden Fall muss sogar von einer Summierung der beschriebenen Fehlerquellen ausgegangen werden.

Immer noch unter der Voraussetzung, dass überhaupt rekombinante AS-PTs in den heterologen Wirtszellen produziert und angeboten werden, muss die etablierte Methode der Gewinnung von Protein-Fractionen kritisch betrachtet werden. Es ist sicherlich nicht der Enzymstabilität förderlich, dass das Protokoll zum Zellaufschluss ein (händisches) Schütteln der Hefezellen mit Glaskugeln für 20 min vorsieht. Dadurch

wird die Probe während der Isolierung von Protein relativ lange einer starken Scherbelastung ausgesetzt und trotz Arbeitens bei 4 °C Umgebungstemperatur durch abgegebene Handwärme während des Schüttelns thermisch belastet. Erfolgreiche Hefe-Expressionsexperimente innerhalb unserer AG mit anderen rekombinanten Membranproteinen (u.a. pflanzliche Cytochrom P450-Monooxygenasen)^[229], bei denen ein vergleichbares Protokoll auf Grundlage von POMPON *et al.*^[258] Anwendung findet, lassen aber eine Denaturierung/Inaktivierung von Proteinen während ihrer Extraktion als unwahrscheinlich erscheinen. Bei all diesen möglichen Diskussionsansätzen zur ausgebliebenen Enzymaktivität bleibt unweigerlich die berechnete Frage, ob trotz der bei Membranproteinen sehr häufig auftretenden erfolglosen Expression und dem vollständigen Verlust von enzymatischer Aktivität^[175] vielleicht doch aktive Johanniskraut-PTs gewonnen werden konnten. Es ist schließlich durchaus denkbar, dass vorliegenden, funktionstüchtigen AS-PTs in den *in vitro*-Assays nur solche aromatische Substrate angeboten wurden, die außerhalb ihrer Substrat-Spezifität liegen. Dieser letzte Ansichtspunkt erscheint jedoch früher wie heute sehr fragwürdig, v.a. da sich bei der Auswahl aromatischer Prenylakzeptoren an einfachste Grundgerüste von in beiden behandelten Johanniskraut-Arten natürlich vorkommenden prenylierten (Sekundär-)Metaboliten gehalten wurde.

All diese Erklärungsansätze beschäftigen sich mit dem Vorhandensein funktionsunfähiger rekombinanter AS-PTs aus *S. cerevisiae*, die anhand abwesender PT-Aktivität in *in vitro*-Enzymassays als inaktiv deklariert werden. Auch wenn generell von einem intakten Expressionsablauf ausgegangen werden kann, so geben die Ergebnisse der Protein-Gelelektrophorese allerdings einen zusätzlichen Anlass zur Diskussion, weil im SDS-Gel keine Zunahme der spezifischen Proteinmenge detektiert werden kann. Deswegen ist nicht nur die Fehlbildung und der beschleunigte Abbau von Fremdprotein im heterologen Wirt zu beachten, sondern es muss auch angenommen werden, dass erst gar keine oder maximal unterschwellige Expression stattfindet. Technische bzw. handwerkliche Fehler – nämlich im Produktions-, Extraktions- und Aufarbeitungsablauf bis hin zu den Nachweisen mittels Enzymassays – können anhand von biologischen Wiederholungen der Experimente und Abgleich mit positiven Versuchen an anderen Proteinen in unserer AG ausgeschlossen werden. Hingegen kann überlegt werden, ob in den Wirtszellen möglicherweise die Induktion fehlschlug oder so schwach war, dass die Fremdprotein-Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag. Das könnte plausibel erklären, dass die Überexpression womöglich gar nicht oder nur in einem geringen Ausmaß stattfindet. Folglich werden die von den Hefezellen produzierten AS-PTs wegen einer kaum sichtbaren Zunahme der Bandenintensität nicht vor dem proteinreichen Hintergrund der extrahierten Protein-Fractionen im SDS-Gel ausgemacht. Betrachtet man bisherige Untersuchungen von pflanzlichen AS-PTs in Hefen, so lassen diese Ergebnisse in Verbindung mit den obigen Ausführungen den Schluss zu, dass die Protein-Gelelektrophorese keine geeignete Nachweismethode für den Expressionserfolg von AS-PTs in Hefezellen ist. Unabhängig von positiven oder negativen Aktivitätstests kann in keinem Fall in gefärbten Protein-Gelen die gesuchte PT-Bande detektiert werden^[170,171,175,220].

Das Projekt nach wiederholt inaktiven AS-PTs aus Hefe auf das Insektenzell-Baculovirus-System neu auszurichten, entpuppte sich als persönlicher Meilenstein der Erforschung rekombinanter AS-PTs aus Johanniskraut. Einerseits gelang es mit diesem Expressionssystem erstmalig die Produktion rekombinanter Fremdproteine nachzuverfolgen und optisch zu belegen. Da nämlich die Kontrolle mittels Protein-Gelelektrophorese ähnlich wie bei den Hefezellen keine stichfesten Belege einer PT-Expression lieferte, wurde zunächst mit dem fluoreszierenden Marker-Protein eGFP gearbeitet. Dadurch kann eine erfolgreiche Genexpression im Wirt leicht visuell nachverfolgt werden, weil sowohl die Wirtszellen selbst als auch die extrahierten Protein-Fractionen durch das grün-fluoreszierende Protein leuchtend gefärbt werden. Dass also letztlich die SDS-Gele nicht aufgrund mangelhafter PT-Expression, sondern nur deren Dimension im Hinblick auf produzierte Fremdproteine unauffällig erscheinen, veranschaulichen die mit eGFP infizierten Sf9-Zellen: Bereits bei Tageslicht und ohne Zellaufschluss leuchten die Kulturen stark grün (Abbildung 6.3), was erfolgreiche Überexpression und ein funktionierendes Produktionssystem impliziert. Zusammenfassend ist



die SDS-PAGE nur bedingt geeignet und nicht Methode der Wahl, um Expressionserfolg oder gar -niveau rekombinanter AS-PTs aus Hefe- und Insektenzellen zu überprüfen. Vermutlich haben auch andere Forschergruppen mit derartigen Schwierigkeiten zu kämpfen, weshalb die Protein-Gelelektrophorese zum aktuellen Zeitpunkt nur in einer einzigen Veröffentlichung zu pflanzlichen AS-PTs mit aufgenommen wurde, und das auch nur zur Nachverfolgung eines erstmalig beschriebenen Aufreinigungsverfahrens^[260]. Geeigneter wäre die SDS-PAGE in zukünftigen Untersuchungen nur nach Vorab-Markierung zu exprimierender PTs mit einem Protein-Tag und anschließender Aufreinigung. Zusätzlich oder alternativ käme eine Protein-Gelelektrophorese mit nachgeschaltetem Western Blot unter Verwendung eines PT-/Tag-spezifischen Antikörpers in Frage, was jedoch bislang in unserer AG nicht zur Wahl steht. Die C-terminale Markierung einer in Tabak überexprimierten, rekombinanten Johanniskraut-PT mit einem fusionierten *Strep*-Tag durch ELINE BIEDERMANN (AG Wittstock, Institut für Pharmazeutische Biologie, TU Braunschweig), die diesen Lösungsansatz aufgreift, war bisher allerdings auch noch nicht zielführend. Eine Aufreinigung ist bis heute mehrfach fehlgeschlagen und aufgrund komplett ausbleibender Enzym-Aktivität – sowohl mit gereinigter Proteinfraction als auch der standardmäßig verwendeten mikrosomalen Fraktion – muss vermutet werden, dass das angehängte Epitop die PT-Aktivität negativ beeinflusst (Daten unveröffentlicht).

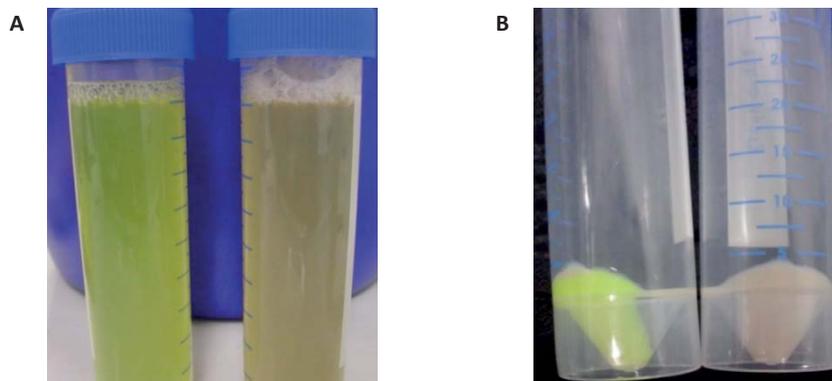


Abbildung 6.3 Vergleich Baculovirus-infizierter Sf9-Zellkulturen mit eGFP und HcPT-2 (links: Sf9-Zellen mit exprimiertem eGFP; rechts: Negativkontrolle). **A:** Insektenzellkulturen. **B:** Pelletierte Insektenzellen ohne Medium

Auf der anderen Seite konnte mit dem Einsatz des Insektenzell-Baculovirus-Systems zum allerersten Mal überhaupt rekombinante Enzymaktivität für Johanniskraut-PTs registriert werden. Bereits zuvor tauchten in der entsprechenden Literatur aktive, rekombinante AS-PTs aus Insektenzellen auf^[152,172,260] und bewiesen, dass Sf9-Zellen befähigt sind alle notwendigen Schritte der Transkription, Translation und anschließenden Modifikation durchzuführen. Auf Basis dieser Informationen wurden erste Untersuchungen mit Johanniskraut-PTs in Insektenzellen durchgeführt. Mit dem ersten Aktivitätsnachweis im Screening wurde recht schnell die offensichtliche Toleranz verwendeter Sf9-Zellen gegenüber den AS-PTs deutlich, und nach dem Eignungsnachweis war es dank intensiver Bemühungen letztlich möglich Enzymaktivität für acht der insgesamt zwölf verfügbaren AS-PTs zu dokumentieren. Gearbeitet wurde dabei stets mit den mikrosomalen Fraktionen der aufgeschlossenen Insektenzellen und nicht mit aufgereinigten, überexprimierten Enzymen. Zwar gibt es mittlerweile ein Protokoll zur Polyhistidin-Tag-Markierung und Aufreinigung einer pflanzlichen AS-PT aus *Lithospermum erythrorhizon*^[260], jedoch stellt diese Methode eher die Ausnahme von der Regel dar. Durch das Auflösen von Mikrosomen-Membranen können darin enthaltene Membranproteine leicht ihre Funktion verlieren: Einerseits ist aufgrund fehlender Einbettung generell die Proteinstabilität außerhalb der Biomembran verringert, andererseits dürfen die AS-PTs von den eingesetzten Detergenzien (im publizierten Beispiel Natriumdesoxycholat und Digitonin) nicht denaturiert werden, sondern müssen gleichzeitig in Lösung gehalten als auch in ihren Raumstrukturen bewahrt werden. Darüber hinaus ist zu beachten, dass

die Anknüpfung eines Aufreinigungs-Tags selbst schon die native Proteinfaltung und Membranintegrität behindern und inaktive Proteine zur Folge haben kann. Außerdem ist über den fusionierten Marker nicht automatisch eine Selbstverständlichkeit gegeben, dass die Aufreinigung darüber auch möglich sein muss – durch (teilweises) Maskieren des Markers durch nicht abgetrennte Detergenzien oder Einschluss des Tags innerhalb von Mizellen kann es zu verringerter Funktionalität kommen. Die Arbeit mit mikrosomalen Fraktionen bietet daher einen gesunden Mittelweg zwischen überladendem Protein-Rohextrakt, der noch sämtliche Proteine aus den Wirtszellen enthält, und nur schwerlich generierbaren, aufgereinigten Proteinen. Es spricht zusätzlich für diese Vorgehensweise, dass bis auf die oben genannte Ausnahme^[260] auch alle weiteren publizierten AS-PTs aus mikrosomalen Fraktionen heraus untersucht wurden (siehe entsprechende, gelistete Literaturstellen). Nachteilig wirkt sich eine fehlende Aufreinigung nur später bei der quantitativen Bestimmung von Protein-Parametern (Umsatzrate, katalytische Effizienz) aus, bei der exakte Mengen an zu bestimmendem Protein notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit beschränkt sich die Analyse der Johanniskraut-PTs allerdings auf rein qualitative Aspekte, was keine Schwierigkeiten mit sich bringt. Die einzige Ausnahme ist „HcPT“, für die im Rahmen der Charakterisierung^[263] die annähernde Geschwindigkeit des Substratumsatzes bestimmt wurde. Um die Vergleichbarkeit verschiedener Bestimmungsdurchläufe zu gewährleisten, wurde daher jeweils nur aus einer Charge der exprimierten „HcPT“ gearbeitet – somit wird der mögliche Einfluss einer von Charge zu Charge variierenden Expressionsrate nach Infektion der Sf9-Wirtszellen genauso eliminiert wie auch nur minimal abweichende Inkubationszeiten unterschiedlicher Inkubationsansätze.

Als Fazit bleibt festzuhalten, dass Hefe- und Insektenzellen derzeit die geeignetsten Expressionssysteme für rekombinante membranständige Fremdproteine aus der Familie der AS-PTs bieten, wobei Johanniskraut-PTs ganz eindeutig Sf9-Zellen als Wirte bevorzugen. Neueste Forschungsergebnisse aus unserer AG zeigen, dass es auch mit erheblichem Optimierungsaufwand – sowohl am Kulturmedium, dem Expressionsprotokoll als auch in der Proteinextraktionsmethode – nicht möglich war, „HcPT-2“ und „HpPT-1“ in Hefezellen zu exprimieren und Aktivität *in vitro* nachzuweisen. Inzwischen konnten aber immerhin mit „HpPT-2“ und „HpPT-5“ zwei andere aktive, rekombinante Johanniskraut-PTs mit einem optimierten Protokoll in *S. cerevisiae* produziert werden (GRULL *et al.*, Daten unveröffentlicht). Deren Aktivität bleibt allerdings hinter der prozentual abgeschätzten Substratumwandlung der rekombinanten Enzyme aus Insektenzellen zurück. Unabhängig davon, ob Pro- oder Eukaryoten verwendet werden, bleibt es schlussendlich eine besondere Herausforderung, membrangebundene Fremdproteine und im Speziellen pflanzliche AS-PTs in heterologen Organismen zu exprimieren, nachzuweisen und zur Aktivität zu bringen (siehe auch OHARA *et al.*^[301]).



6.3. Aktivität aromatischer Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen aus Johanniskraut-Arten

6.3.1. Die Hyperforin-Biosynthese

In den 1970er Jahren wurde das PPAP Hyperforin als Hauptinhaltsstoff im Echten Johanniskraut entdeckt^[82]. Seither sind nahezu alle wissenschaftlichen Fakten zu Struktur, Vorkommen mit pflanzlicher Gewebeverteilung und Kumulation sowie physikochemischer Stabilität bis hin zum pharmakologischen Profil veröffentlicht (siehe 1.2.2). Selbst die organisch-chemische Synthese ist auf einem Forschungsstand angelangt, der eine stereoselektive, enantiomerenreine Nachbildung erlaubt^[215,216]. Einzig der Ablauf der natürlichen Biosynthese entzieht sich bis heute hartnäckig der Aufklärung, so dass ausschließlich Hypothesen bezüglich der pflanzlichen Produktion existieren^[269,312,313].

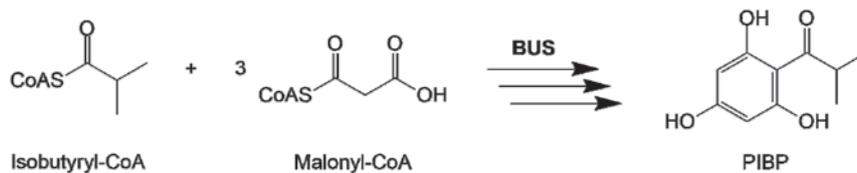


Abbildung 6.4 Erster Schritt der Hyperforin-Biosynthese: Bildung des aromatischen Grundgerüsts^[149]. BUS: Isobutyrophenon-Synthase; CoAS: Coenzym A-Thioester; PIBP: Phlorisobutyrophenon

Wissenschaftlich gesichert ist bislang nur die Bildung des aromatischen AP-Grundgerüsts vom Hyperforin (PIBP; Abbildung 6.4). ADAM *et al.*^[145] zeigten mittels Fütterungsexperimenten mit radioaktiv markierter Glucose, dass diese im Johanniskraut über die Aminosäure Valin zum Acyl-Starter Isobutyryl-CoA umgewandelt wird und demnach PIBP über einen Mechanismus des Polyketidweges produziert werden muss – ebenso wie das strukturell verwandte Grundgerüst der Hopfensäuren (PIVP) in *H. lupulus*^[148]. Entsprechend dieser Biosynthese-Vorhersage wurde in Hopfen mit der VPS (Typ III-PKS) bereits das verantwortliche Enzym für die PIVP-Produktion entdeckt und beschrieben^[150], und kurze Zeit später konnte in Protein-Präparationen aus Johanniskraut-Zellkulturen eine ähnlich funktionale Typ III-PKS (BUS) identifiziert werden, die aus Isobutyryl-CoA und drei Molekülen Malonyl-CoA das Hyperforin-Skelett PIBP formen konnte^[149].

In die weiteren Schritte der Hyperforin-Biosynthese sind Johanniskraut-PTs involviert. Laut Vorhersage prenylieren diese AS-PTs die unsubstituierten C-Atome des zentralen AP-Ringes mit zwei Molekülen DMAPP und einem Molekül GPP zu einer Colupulon-ähnlichen Struktur. Diese Behauptung deckt sich mit der generellen These, dass alle PPAPs über die Zwischenstufen der MPAPs biosynthetisiert werden^[21]. Vergleicht man jedoch gesammelte Ergebnisse von Arbeiten mit dem Johanniskraut, so kommen Zweifel auf, ob die Hyperforin-Produktion wirklich über ein solches Intermediat abläuft. Das stärkste Argument gegen diese Behauptung ist das Fehlen solcher Zwischenstufen im Inhaltsstoffprofil von *H. perforatum*. Bis heute gibt es keine Anzeichen und Veröffentlichungen darüber, dass MPAPs im nativen Johanniskraut gefunden wurden. Die einzig bekannte Ausnahme bilden die Wurzelkulturen von *H. perforatum* aus unserer AG^[314], die ein außergewöhnliches, sehr interessantes *in vitro*-System anbieten. Es ist nämlich nicht nur ungewöhnlich, dass diese Kulturen im Sekundärstoffprofil die MPAPs Colupulon und Adlupulon enthalten – auch die Fähigkeit Hyperforin in Wurzelgewebe zu produzieren ist erstaunlich, da die Wurzeln der natürlich wachsenden und angebauten Johanniskraut-Pflanzen frei von Hyperforin sind. Außerdem werden mit den Hyperforin-Derivaten Seco- und Adsecohyperforin noch zwei weitere PPAPs in den *in vitro*-Wurzelkulturen gebildet, die ausschließlich in Zellkultursystemen beschrieben wurden und der Arzneipflanze vorenthalten sind^[190,315]. Aufgrund dieser deutlichen biologischen und biochemischen Unterschiede wäre es wissenschaftlich naiv, dieses *in vitro*-System direkt mit seiner natürlichen Stammpflanze zu vergleichen und somit



ein Vorliegen von MPAPs in *H. perforatum* rechtfertigen zu wollen – es legt aber nahe, dass die genetischen Voraussetzungen für MPAP-Synthese-Enzyme gegeben sind.

Tabelle 6.1 Für und Wider einer Beteiligung von MPAP-Strukturen an der Hyperforin-Biosynthese

Pro	Contra
<ul style="list-style-type: none"> ▪ allgemein anerkannter Mechanismus für die Biosynthese aller PPAPs verläuft über MPAPs 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ kein Vorkommen von MPAPs im Johanniskraut bekannt, nachgewiesen oder publiziert
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Biosynthese von MPAPs in Hopfen aufgedeckt → identischer Weg wie für <i>H. perforatum</i> angenommen 	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ MPAPs in <i>H. perforatum</i>-Wurzelkulturen gefunden: gleiches Genom → gleiche Enzymausstattung → Biosynthese-Voraussetzungen gegeben 	
<ul style="list-style-type: none"> ▪ heterogenes Metabolon kann MPAPs als Zwischenstufen produzieren und direkt prozessieren ohne Akkumulation 	

Folglich bleiben zwei mögliche Argumentationsansätze, warum keine MPAPs im Johanniskraut detektierbar sind: Die unwahrscheinlichere wäre eine Hyperforin-Biosynthese ganz ohne Beteiligung von MPAPs, die als besondere Ausnahme nicht dem naturwissenschaftlich logischen, allgemein akzeptierten Schema der PPAPs folgt^[22]. Die plausiblere Erklärung basiert aber auf der katalytischen Effizienz der gesamten chemisch-enzymatischen Umwandlung und der Frage, wo der enzymatische Biosynthese-Komplex ansetzt. Da in den pflanzlichen Zellen keine prenylierten Zwischenstufen des Hyperforins akkumulieren, scheint der Biosyntheseweg – entweder komplett zwischen dem ursprünglichen Acyl-Starter und dem finalen Endprodukt oder wenigstens ausgehend vom PIBP – mit hoher Umsatzrate und Affinität und folglich ohne Freigabe prenylierter Intermediate abzulaufen. Rein theoretisch könnte dabei eine einzelne AS-PT allein hinter allen Prenylierungsschritten bis zum Hyperforin vermutet werden, die überhaupt nicht erst Zwischenprodukte bildet, sondern in einem schnellen, äußerst komplexen Reaktionsschritt aus dem AP direkt das Endprodukt generiert. Diese Behauptung kann aber ganz klar entkräftet werden: Einerseits sind die klonierten AS-PTs des Johanniskrauts mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 390 Aminosäuren vergleichsweise klein, und wegen ihrer Membranständigkeit sind zusätzlich bestimmte Proteindomänen nicht einmal katalytisch nutzbar. Geläufige multifunktionelle Enzyme wie die Cytoplasmatische C–1-Tetrahydrofolat-Synthase (C1-THF-Synthase) oder das Bifunktionelle Purinsyntheseprotein (ATIC oder PURH), die in der Lage sind drei bzw. zwei Reaktionsschritte zu katalysieren, sind hingegen löslich und um den Faktor 1,5–2,5 größer^[316,317]. Bei kleinerer Proteingröße müssten die klonierten Johanniskraut-PTs demnach sogar noch mehr Reaktionsdomänen aufweisen und damit vier Prenylierungen sowie einen Ringschluss katalysieren können, was sehr widersprüchlich erscheint. Abgesehen von der Proteingröße zeigen andererseits alle bekannten und publizierten pflanzlichen AS-PTs eine enge Substratspezifität und katalysieren alle klar abgegrenzte, einzelne Prenylierungsschritte an strukturell ähnlichen aromatischen Substraten. Für die im Rahmen dieser Arbeit klonierten und aktiven AS-PTs aus dem Johanniskraut wurde ein ähnliches Verhalten in den *in vitro*-Enzymassays nachgewiesen (siehe 5.6), was eine sequenzielle Mehrfach-Prenylierung durch eine einzige AS-PT äußerst unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Statt eines einzelnen „Super-Enzyms“ kann hingegen die Theorie eines heterogenen, multifunktionellen Metabolons (Abbildung 6.5) eine schlüssige Antwort liefern. In diesem Fall würden sich alle involvierten Biosynthese-Enzyme räumlich nah zusammenfinden und miteinander kooperieren, so dass alle Reaktionsschritte nahezu zeitgleich bzw. nahtlos aneinander angeschlossen ablaufen könnten – vergleichbar einem abgeschlossenen Produktionstunnel, ohne Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes und ohne Freigabe



von MPAP-Zwischenstufen^[318,319]. Die Existenz solch eines membrangebundenen, rekombinanten AS-PT-Komplexes wurde erst kürzlich für die Humulon- und Lupulon-Biosynthese im Hopfen, die eng mit der des Hyperforin im Johanniskraut verwandt zu sein scheint, nachgewiesen und erscheint als logischste Erklärung^[151]. Im Generellen deutet letztlich alles auf einen effizienten Biosynthese-Mechanismus hin, und das unabhängig davon ob ein multifunktionelles Enzym oder ein heterogener Enzym-Komplex vorliegt. Untermauert wird dies auch durch die Tatsache, dass die Biosynthese von Hyperforin wie auch von Hypericin sowohl durch chemische Elicitoren als auch Herbivoren-Befall induzierbar ist^[320,321]. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass Hyperforin Teil des spezifischen, pflanzlichen Abwehrsystems ist und bei einsetzendem Stress schnellstmöglich bereitgestellt werden muss – was durch unmittelbare Hochregulierung und einen effektiven, Metabolon-vermittelten Biosynthese-Mechanismus ohne viele Reaktionsstufen und Transportvorgänge zu unterschiedlichen Synthese-Orten auf jeden Fall gewährleistet werden kann. Es muss jedoch auch gesagt sein, dass die Geschwindigkeit der pflanzlichen Antwort auf Pathogen- bzw. Herbivoren-Befall vornehmlich von der Geschwindigkeit der veränderten Genexpression (Transkription, Translation, ggf. Modifikation) beteiligter Enzyme limitiert wird, die viel mehr Zeit in Anspruch nimmt als die enzymkatalysierte Sekundärstoffbiosynthese selbst. Darüber hinaus würde das gewebespezifische Abspeichern von Biosynthese-Intermediaten eine Bildung des gewünschten Sekundärstoffes beschleunigen können, da nicht die gesamte Produktionskette durchlaufen werden müsste. Das Johanniskraut produziert aber auch ohne Stressfaktoren über seinen gesamten Vegetationszyklus hinweg Hyperforin und speichert es als defensive Schutzkomponente in Teilen seines Gewebes^[195], wo es mit zunehmendem Alter immer höhere Gehalte erreicht und in den reproduktionsabhängigen Pflanzenteilen akkumuliert^[84,86]. Unter Berücksichtigung all dieser Ausführungen kann somit von hier an durchaus ein Metabolon-vermittelter und bei Bedarf hochregulierbarer Biosynthese-Mechanismus akzeptiert werden, der auch ohne auf gespeicherte Zwischenprodukte zugreifen zu müssen schnell aus frühesten Vorstufen über beteiligte MPAP-Strukturen das Endprodukt Hyperforin bereitstellen kann.

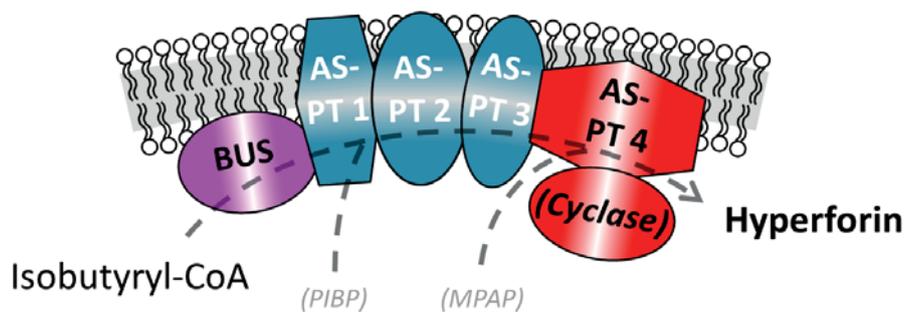


Abbildung 6.5 Vorschlag eines möglichen Metabolons zur schrittweisen Biosynthese von Hyperforin (in Anlehnung an JØRGENSEN *et al.*^[319]). Nach Eintritt von Isobutyryl-CoA in den Biosynthese-Komplex wird als Endprodukt Hyperforin aus dem Metabolon entlassen; ein theoretischer Quereinstieg der Intermediate PIBP oder MPAP in den Biosyntheseweg ist denkbar; die theoretische Beteiligung einer Cyclase ist spekulativ. AS-PT: aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferase; BUS: Isobutyrophenon-Synthase; MPAP: monocyclisches polyprenyliertes Acylphloroglucin; PIBP: Phlorisobutyrophenon

Unter Berücksichtigung der eigenen Ergebnisse und der aktuellen Literatur kann als gesichert angenommen werden, dass der Biosyntheseweg vom PIBP zum MPAP über einen schrittweisen, sequenziellen Prenylierungsmechanismus verläuft. ADAM *et al.*^[145] stellten dies für Hyperforin erstmalig theoretisch vor – ohne dabei auf eine bestimmte Prenylierungsreihenfolge zu verweisen. Drei Jahre später erfolgte ein erster Beleg dieser Vorhersage, als gezeigt wurde, dass ein Johanniskraut-Proteinextrakt *in vitro* einen einzelnen DMAPP-Rest an ein unsubstituiertes C-Atom des Aromaten PIBP addiert^[218]. Aufbauend auf diesem Ergebnis prognostizierte daraufhin BEERHUES^[269] erstmalig einen detaillierten, schrittweisen Hyperforin-

Biosyntheseweg im Johanniskraut, der alle bisherigen Hypothesen bezüglich AS-PTs, MPAPs und der generellen PPAP-Formulierung respektierte und dabei die Addition von DMAPP an das PIBP als ersten Prenylierungsschritt festlegte. Dass diese Vorhersage anscheinend nah an der Wahrheit zu sein scheint, zeigten später die Entdeckungen zweier AS-PTs, die das gesuchte enzymatische Profil erfüllen: Die pflanzliche AS-PT „HIPT-1“ aus Hopfen ist an der sehr ähnlich ablaufenden Biosynthese der strukturverwandten, mehrfach prenylierten Hopfensäuren (MPAPs) beteiligt. Sie vermittelt dabei nicht nur die einfache Prenylierung des bevorzugten Substrates PIVP im Hopfen, sondern akzeptiert ebenso das Hyperforin-Grundgerüst PIBP als Substrat^[151,152]. Die zweite AS-PT „AnaPT“ (XP_001258078) stammt aus dem Pilz *Neosartorya fischeri* und ist ursprünglich an der Biosynthese prenylierter Indol-Alkaloide beteiligt, kann allerdings auch einen Dimethylallylrest an PIBP und PIVP addieren^[293]. Sowohl im Pflanzen- als auch dem Pilzreich existieren also nachweislich AS-PTs, die durchaus Einfach-Prenylierungen von PIBP durchführen können – so wie es die älteren Untersuchungen und Annahmen für das Johanniskraut ebenso andeuten (Abbildung 6.7). Die verfügbaren Informationen müssen jedoch vorsichtig und differenziert betrachtet werden. Gerade die Untersuchungen von BOUBAKIR *et al.*^[218] am Johanniskraut werfen Fragen auf. Erstens wurde nicht mit der Pflanze Johanniskraut, sondern *in vitro*-Zellkulturen gearbeitet; zweitens stammten diese von *H. calycinum* und nicht dem Hyperforin-produzierenden *H. perforatum*; drittens wurde Protein-Gesamtextrakt (störanfälliger für Protein-Interaktionen und mögliche Artefakte während der Analysen) statt eines einzelnen, durch Überexpression rekombinant produzierten Enzyms bearbeitet; viertens wurde dabei untypischerweise auch noch die höchste PT-Aktivität in der löslichen statt der mikrosomalen Fraktion gefunden, was im Vergleich zu allen bis heute bekannten, pflanzlichen AS-PTs, die membranständig sind, eine Ausnahme darstellt. Auch wenn sich nun die oben erwähnte Pilz-AS-PT als ebenfalls lösliches Enzym funktionell wie der Johanniskraut-Zellkultur-Extrakt verhält, so muss dies nicht automatisch deren Ergebnisse bestärken: PIBP ist nämlich nicht das eigentliche, beste Substrat von „AnaPT“, sondern wird neben PIVP, Benzophenon und Benzoesäure-Derivaten quasi unspezifisch nur als einer von vielen Prenylakzeptoren umgesetzt. Obwohl natürlich zu berücksichtigen ist, dass „AnaPT“ einem komplett anderen Reich entspringt, ist die cytosolische Lokalisation und die breite Substrat-Akzeptanz dennoch erwähnenswert atypisch – ebenso wie ihre Aminosäure-Sequenz (v.a. Länge und konservierte Motive), die mit publizierten pflanzlichen AS-PTs (und

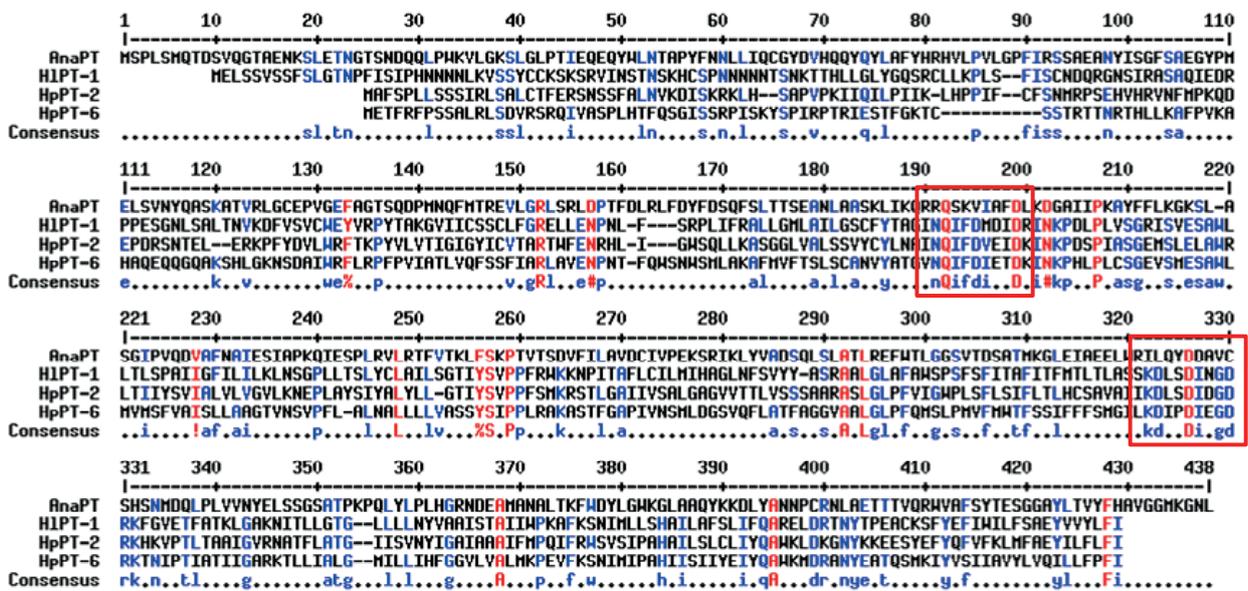


Abbildung 6.6 Aminosäure-Sequenzvergleich von pilzlicher AnaPT mit pflanzlichen, PIBP-umsetzenden AS-PTs. Rot: hochkonservierte Aminosäuren; blau: semikonservierte Aminosäuren; rote Markierung: konservierte Aspartat-reiche Sequenzmotive pflanzlicher AS-PTs („NQxxDxxxD“ und „KDxxDxxGD“)



speziell Johanniskraut-AS-PTs) kaum nennenswerte Übereinstimmungen zeigt und bezüglich der Prenylierung von PIBP eher auf einen unspezifischen Zufallstreffer schließen lässt (Abbildung 6.6). Zwar können somit sowohl die PT-Aktivität aus dem Johanniskraut-Zellkultur-Extrakt als auch die von „AnaPT“ als funktionelle Indikatoren eintreten, erlauben aber nur bedingt einen Rückschluss auf die Umstände im Johanniskraut und die Hyperforin-Biosynthese.

Einen größeren Einfluss auf die Untersuchung der Prenylierungsschritte hin zum Hyperforin hat hingegen „HIPT-1“ aus Hopfen. Diese pflanzliche AS-PT erfüllt nicht nur nominell alle Charakteristika der gesuchten Enzymfamilie – Aspartat-reiche Motive, mehrere TMHs und ein vorhergesagtes TP – und hält strukturellen Vergleichen stand. Sie katalysiert auch eine ähnliche Biosynthese-Reaktion wie die gesuchte Prenylierung in der Hyperforin-Biosynthese und akzeptiert als Substrat sogar PIBP, so dass ihre Gensequenz als vielversprechendes Template zur letztlich auch erfolgreichen PT-Suche und für Identitätsabgleiche mit Johanniskraut-Transkriptomen eingesetzt wurde. Dazu tritt eine weitere erstaunliche Parallele zwischen den bisherigen PT-Aktivitäts-Untersuchungen in Hopfen und Johanniskraut auf: Sowohl die Prenylierung von PIVP als Vorstufe der Hopfensäuren als auch von PIBP als Hyperforin-Grundgerüst wurden beide zuerst mit Proteinextrakten untersucht, wobei jeweils höchste PT-Aktivität (beide Male Einfach-Prenylierung mit DMAPP) in der löslichen Fraktion beschrieben wurde^[153,218]. Für Hopfen konnte die anfängliche Vermutung inzwischen widerlegt werden, als durch Transkriptom-Analysen die cDNA von „HIPT-1“ entdeckt und nachfolgend diese AS-PT als membranständiges Enzym charakterisiert wurde^[152,238]. Eine ähnliche Situation – erste PT-Aktivität aus löslicher Fraktion, später widerlegt durch eine membranständige AS-PT – trat auch bei den Untersuchungen im Hanf auf^[172,322]. Für Johanniskraut erfolgt jetzt mit den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit eine ganz ähnliche Aufklärung: Die Fähigkeit der rekombinanten, membranständigen AS-PT „HpPT-2“ aus *H. perforatum*, das Substrat PIBP sowohl einfach als auch zweifach mit DMAPP zu prenylieren (siehe 5.6.7.1), widerspricht einerseits der Theorie einer löslichen Johanniskraut-PT, entspricht aber exakt dem in entsprechender Publikation^[218] beschriebenen und prognostizierten ersten Prenylierungsschritt zu monoprenyliertem PIBP, das als Metabolit auch schon in einer *Hypericum*-Art entdeckt wurde^[268]. Folglich scheint wie im Hopfen die erste Prenylierung des unsubstituierten AP-Grundgerüsts eindeutig geklärt, allerdings ist dies in Bezug auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit nur die halbe Wahrheit. „HpPT-2“ kann nämlich den Aromaten PIBP auch mit GPP reproduzierbar und ebenso effektiv wie mit DMAPP prenylieren. Ein derart C-geranyliertes PIBP ist bereits sogar aus einigen *Hypericum*-Arten – z.B. als Vorstufe der beiden APs Hyperjovinol A und B – bekannt^[294–296,323–327], und sein vermutliches Vorkommen im Echten Johanniskraut, wenn auch nur als Übergangszustand, kann daher als ebenso wahrscheinlich angenommen werden wie ein C-prenyliertes PIBP. Weiterhin wurden im Rahmen dieser erwähnten Publikationen auch aus dem monogeranylierten PIBP abgeleitete Strukturen wie cyclisierte Derivate oder auch O-geranyliertes PIBP bei Untersuchungen gefunden – diese treten allerdings nicht in der Hyperforin-relevanten Johanniskraut-Art *H. perforatum* auf und können daher bei der weiteren Diskussion vernachlässigt werden.

Durch die generelle Fähigkeit von „HpPT-2“ sowohl DMAPP als auch GPP an das unsubstituierte Substrat PIBP zu knüpfen ist zunächst die Frage offen, welcher Prenylrest nun wahrscheinlich als erstes angeknüpft wird (Abbildung 6.7). Einen Hinweis liefert diesbezüglich „HpPT-6“, die mit den enzymatischen Produkten von „HpPT-2“ untersucht wurde. Dabei war es möglich zu zeigen, dass monogeranyliertes PIBP mit DMAPP weiter prenyliert werden konnte – andersherum konnte mit DMAPP mono-/diprenyliertes PIBP über „HpPT-6“ nicht mit GPP und nur in marginalen Spuren mit DMAPP weiterreagieren. Demzufolge scheint unter Berücksichtigung beider rekombinanter und einzeln getesteter AS-PTs in der Hyperforin-Biosynthese die Geranylierung vor der Prenylierung mit DMAPP abzulaufen. Eine testweise Co-Inkubation mit zwar getrennt überexprimierten, aber während der Reaktion vereinten AS-PTs mit PIBP und beiden Prenyl-

donatoren lieferte schließlich ein identisches Ergebnis im HPLC-Chromatogramm wie die zuvor beschriebene, stufenweise Reaktion über „HpPT-2“ und im Anschluss deren Produkt-Prenylierung durch „HpPT-6“. Letztlich macht es für das aufgestellte Metabolon-Konzept keinen Unterschied, welcher Prenylierungsschritt nun welchem zuvorkommt, da beide Wege im Einklang mit der aufgestellten Theorie stehen. Trotz verdichtender Anzeichen bleibt somit momentan der zweite Abschnitt der Hyperforin-Biosynthese – ohne nachweisbare Zwischenstufen im Johanniskraut und abschließende Charakterisierung der AS-PT-Spezifitäten – weiterhin eine Theorie.

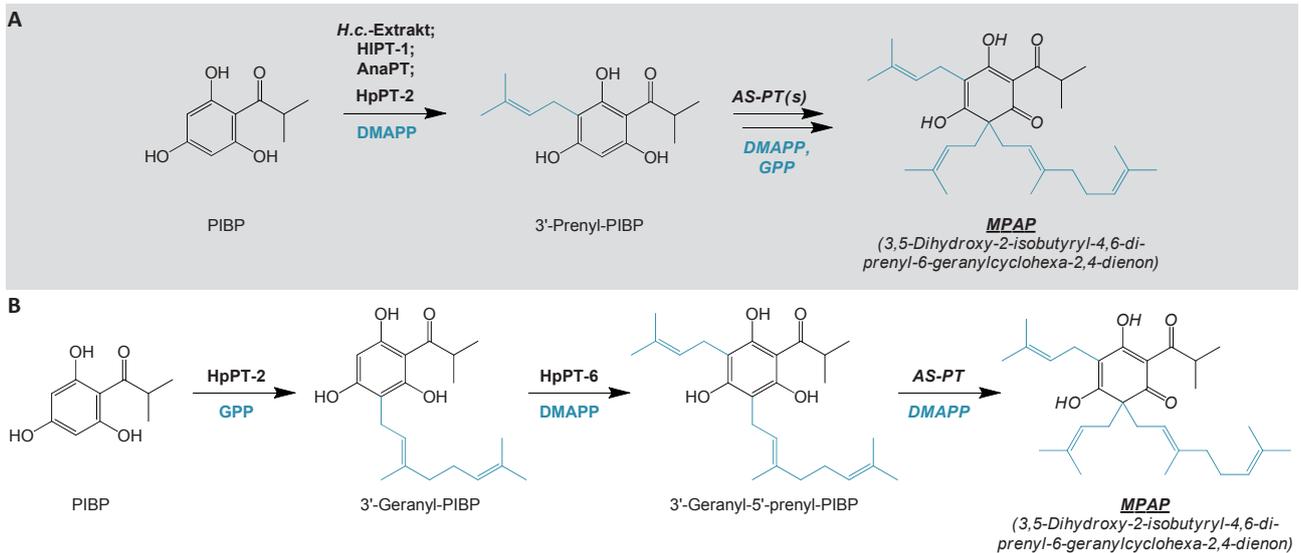


Abbildung 6.7 Alternative zweite Abschnitte der Hyperforin-Biosynthese. **A:** Prenylierung von PIBP mit DMAPP und anschließende, unbekannte MPAP-Bildung^[152,218,293 u.a.]. **B:** Geranylierung von PIBP mit GPP durch HpPT-2, folgende Prenylierung mit DMAPP durch HpPT-6 sowie anschließende, unbekannte Prenylierung zur MPAP-Struktur (siehe 5.6.7). AS-PT: aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferase; DMAPP: Dimethylallyldiphosphat; GPP: Geranyldiphosphat; *H.c.*: *Hypericum calycinum*; MPAP: monocyclisches polyprenyliertes Acylphloroglucin; PIBP: Phlorisobutyrophenon

Der weitergehende, dritte Biosyntheseschritt vom MPAP zum PPAP wurde bisher weder untersucht noch konnte er im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysiert werden, so dass weiterhin das allgemeine PPAP-Biosynthese-Schema sowie die daran angelehnte Vorhersage zur Formulierung von Hyperforin akzeptiert ist^[21,269,312]. Durch einen PT-katalysierten, nukleophilen Angriff der Kern-nahen Doppelbindung des Geranylrestes auf ein weiteres Molekül DMAPP mit Diphosphat als Abgangsgruppe entsteht ein Carbokation als instabiler Übergangszustand. Über einen weiteren, enzymatisch-vermittelten nukleophilen Angriff der Enol-Doppelbindung am C-1'-Atom wird die reaktive Zwischenform unter Ausbildung eines Bicyclus stabilisiert und vollendet den angenommenen Biosynthese-Mechanismus des Hyperforins (Abbildung 6.8). Dabei ist es vollkommen unbekannt, ob der intramolekulare Ringschluss zum PPAP-Grundgerüst von der zuletzt beteiligten AS-PT beeinflusst wird, ob ein zusätzliches Enzym mit Cyclase-Aktivität am Metabolon beteiligt ist (Abbildung 6.5) oder die Stabilisierung rein chemisch und spontan abläuft. Letzteres Szenario ist allerdings höchst unwahrscheinlich, da es insgesamt drei unterschiedliche PPAP-Typen gibt (siehe 1.2), die sehr heterogen und nicht gleichmäßig verteilt vorkommen und sich erst über den stereochemisch zielgerichteten Cyclisierungsschritt definieren.

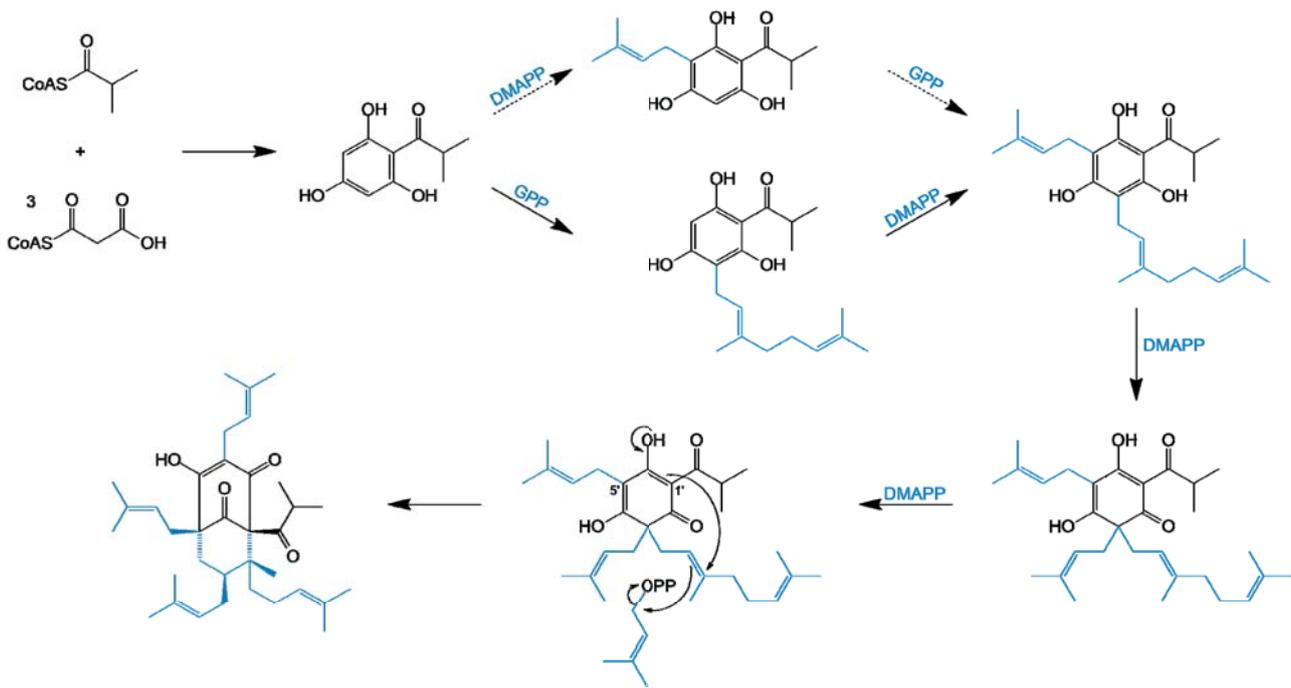


Abbildung 6.8 Vorschlag des möglichen Biosyntheseweges von Hyperforin (abgeändert nach BEERHUES^[269]). CoAS: Coenzym A-Thioester; DMAPP: Dimethylallyldiphosphat; GPP: Geranyldiphosphat; OPP: Diphosphatrest

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Aufdeckung des Hyperforin-Biosyntheseweges im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein gutes Stück vorangetrieben werden konnte. Dank der Vorarbeiten von KÜHLE^[219] und MÜLLER^[220] war es möglich die ersten beiden Prenylierungsschritte durch zwei unterschiedliche AS-PTs zu beweisen. Die Entdeckung der nächsten Johanniskraut-PT, welche die Fortbildung des MPAPs katalysiert, scheint in Anlehnung an die hier gewonnenen Ergebnisse nur eine Frage der Zeit zu sein. Ausreichend Johanniskraut-PT-Sequenzen zur weiteren Analyse stehen aus dieser Arbeit zur Verfügung, und zusätzliche mögliche PT-Genfragmente sind aus den erschöpfenden Untersuchungen der Online-Transkriptome klonierungsbereit. Ein limitierender Faktor bei der experimentellen Betrachtung der einzelnen Biosynthese-Stufen ist jedoch immer noch die mangelnde/ingeschränkte Verfügbarkeit der nominellen Zwischenstufen, die als Substrate für die *in vitro*-Enzymassays benötigt werden und bereits in dieser Arbeit für Schwierigkeiten sorgten. Denkbar sind in Zukunft neben neu klonierten und getesteten AS-PTs aber auch weitere kombinierte Enzymassays (mit bekannten und/oder neuen Johanniskraut-PTs), bei der mehr als zwei AS-PTs zusammen in einem Reaktionsansatz kooperieren. Wie das vorhergesagte Metabolon könnten sie dadurch ggf. einen oder mehrere Biosynthese-Schritte anhängen und somit den molekularen Weg zum Hyperforin mehr und mehr ebnen.

6.3.2. Xanthon-spezifische Prenyltransferasen

Xanthone stellen innerhalb der Klasse der pflanzlichen APs eine Gruppe von Sekundärstoffen mit heterocyclischem Dreiringssystem dar. Sie werden hauptsächlich von Pflanzen aus den Familien Gentianaceae, Clusiaceae und Hypericaceae gebildet und sind ein induzierbarer Teil der chemischen Abwehr gegen mikrobiellen Pathogen-Befall^[204,328–330]. Über den Polyketidweg werden sie – ausgehend von einem aktivierten Benzoessäure-Starter – über eine Benzophenon-Zwischenstufe zum Dibenzo- γ -pyron-Grundgerüst aufgebaut (siehe 1.1). In *H. perforatum* kommen sie nur marginal und außerhalb der als Arzneidroge verwendeten Pflanzenteile vor, stellen in anderen Johanniskraut-Arten wie *H. calycinum* allerdings den Großteil an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Wie andere Sekundärstoffklassen sind auch die Xanthone, und insbe-



sondere (mehrfach) prenylierte Xanthone, durch ihre Bioaktivitäten in den Fokus von Naturwissenschaftlern gerückt, weil sie in zahlreichen Untersuchungen bereits ein ähnlich interessantes pharmakologisches Profil wie die zuvor ausgiebig betrachteten PPAPs anbieten (Abbildung 6.9)^[331–333].

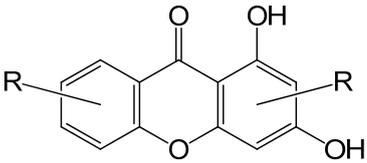
Strukturformel	Wirkung	Quelle
 <p>Xanthon-Grundgerüst</p>	antibakteriell	[12,286,329,334,335]
	antidemotiv / neuroprotektiv	[336–340]
	antidepressiv (MAO-Hemmung)	[205,206]
	antidiabetisch	[341–344]
	antiinflammatorisch	[290,329,345–347]
	antioxidativ	[12,345,348]
	antiparasitär (Trypanosomen)	[349]
	antiplasmodisch (Malaria)	[290,350–352]
	urikostatisch (Gicht)	[353]
	zytotoxisch / antitumoral	[14,27,38,228,286,290,292,335,354]

Abbildung 6.9 Auswahl nachgewiesener Bioaktivitäten von (prenylierten) pflanzlichen Xanthonen (*in vitro* und *in vivo*)

GAID *et al.*^[214] zeigten, dass Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* einer Elicitor-Behandlung zuerst mit der Produktion des zuvor nicht detektierbaren, einfach prenylierten Xanthons Hyperxanthon E^[27] begegneten. Dabei korrelierte die Hochregulierung der beiden an der Bildung von Benzoyl-CoA (Starter-Molekül in der Polyketid-Biosynthese des Hyperxanthon E-Grundgerüsts 1,3,6,7-THX; Abbildung 1.2) beteiligten Enzyme PAL (Phenylalanin-Ammoniak-Lyase) und CNL (Cinnamat:CoA-Ligase) zeitlich mit der nachfolgenden Zunahme dieses Phytoalexins, das bei 24 h einen maximalen Gehalt von ca. 4 mg/g Trockengewicht aufwies. Aufbauend auf diesen Beobachtungen und dem vorhergesagten Biosyntheseweg für Hyperxanthon E untersuchte MÜLLER^[220] auf Transkript-Ebene putative AS-PT-Gene aus *H. calycinum*, deren Expression nach Elicitor-Zugabe anstieg. Ein vermuteter Zusammenhang zwischen der erhöhten Expression von Johanniskraut-PTs und der Zunahme von prenylierten Xanthonen konnte allerdings erst später im Rahmen der nun vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden. Durch Etablierung des Insektenzell-Baculovirus-Expressionssystems konnten „HcPT“, „HcPT-1“ und „HcPT-2“ erstmals aktiv rekombinant produziert und extrahiert werden, so dass schnell die Idee aufkam unprenylierte Xanthone, die aus Johanniskraut-Arten bekannt sind^[347,355–358], als Enzym-Substrate mit diesen AS-PTs *in vitro* zu testen. Besonderes Interesse kam dabei den beiden möglichen, prognostizierten Zwischenstufen 1,3,7-THX und 1,3,6,7-THX zu: Eine einfache Prenylierung an Position C–8 dieser Xanthone ist ein essentieller, vorgelagerter Biosynthese-Schritt für die Ausbildung von kondensierten 2*H*-Pyranen bzw. 2,3-Dihydropyranen an Xanthonen wie Hyperxanthon E, Toxyloxanthon B oder Paxanthon (Abbildung 6.10).

Tatsächlich sind aus Johanniskraut-Arten – vornehmlich aus Zellkulturen – mehrfach hydroxylierte Xanthone mit einem offenkettigen Isopren-Substituenten am C–8-Atom bekannt^[12,355,358,359], und exakt eine dahinführende, gesuchte Enzymaktivität bietet die bereits charakterisierte „HcPT“ *in vitro* durch die C–8-spezifische Einfach-Prenylierung von 1,3,6,7-THX mit DMAPP (siehe 5.6.3.2)^[263]. Alternative Positionen der Isopren-Addition (C–2, C–4, C–5) sind in *Hypericum*-Arten zwar auch bekannt^[12,355,360], konnten durch analytische Methoden zur Strukturaufklärung jedoch ausgeschlossen werden (siehe 5.6.3.1). Daher ist die Annahme berechtigt, dass „HcPT“ den vorletzten Schritt der Hyperxanthon E-Biosynthese katalysiert und ein weiteres Enzym mit Cyclase-Aktivität den Ringschluss zur Dihydropyran-Teilstruktur verantworten muss (vermutlich ähnlich dem intramolekularen Ringschluss zum Hyperforin; siehe 6.3.1). Auch in Bezug auf die

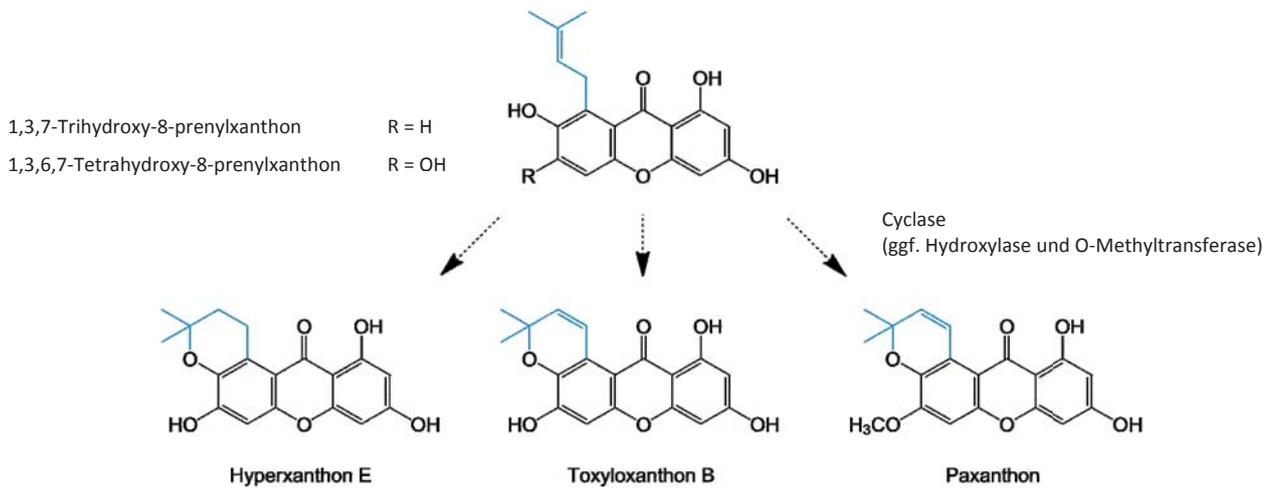


Abbildung 6.10 Dihydropyrano- bzw. 2H-Pyrano-xanthone aus *Hypericum*-Arten (abgeleitet aus 1,3,7-TH8PX / 1,3,6,7-TH8PX)

zuvor angesprochenen Untersuchungen des Transkriptionsausmaßes (semiquantitative RT-PCR) von MÜLLER (S. 141)^[220] ist die Reaktion in den *H. calycinum*-Kulturen logisch zu erklären – nicht nur die funktionelle Aktivität, sondern auch ein zügiger Anstieg des „HcPT“-Expressionsniveaus nach Elicitierung spricht für eine Involvierung in die Hyperxanthon E-Biosynthese. „HcPT“-Transkripte steigen nämlich von den drei untersuchten AS-PTs am schnellsten an und erreichen bereits nach 8 h ein Maximum. Die parallel betrachtete Sekundärstoffproduktion setzt wegen der zwischengeschalteten Transkription und Translation der AS-PTs und weiterer beteiligter Enzyme erwartungsgemäß zeitverzögert auf den Stress-Reiz ein, so dass ca. 4–6 h nach Zugabe des Elicitors als erste biochemische Antwort Hyperxanthon E detektiert werden kann. Somit ist die natürliche biochemische Abwehr-Antwort auch mit den vorgeschalteten Vorgängen auf genetischer Ebene im chronologischen Einklang und unterstützt die zuvor aufgestellte Vorhersage einer „HcPT“-Beteiligung. Die Tatsache, dass 1,3,6,7-TH8PX nicht als Metabolit bzw. gespeicherte Zwischenstufe aus *H. calycinum* bekannt ist, lässt für das Phytoalexin Hyperxanthon E ebenfalls einen vermutlich Metabolon-vermittelten Biosynthese-Mechanismus schlussfolgern. Dieser Erklärungsversuch ist jedoch lange nicht so wahrscheinlich und alternativlos wie im Fall des bereits diskutierten Hyperforin-Biosyntheseweges, da die dort betrachteten Zwischenstufen im Johanniskraut komplett unbekannt sind – hingegen sind einfach prenylierte Xanthone wie das gesuchte 1,3,6,7-TH8PX in *Hypericum*-Arten generell keine Seltenheit (siehe oben). Daher bleibt letztlich festzuhalten, dass trotz nachgewiesener Beteiligung von „HcPT“ nur ein weiterer Schritt der Hyperxanthon E-Bildung entdeckt wurde, der endgültige Biosyntheseweg jedoch noch weiter erforscht werden muss.

Weitergehende Untersuchungen des Sekundärstoffprofils der induzierten *H. calycinum*-Kulturen ergaben im späteren Verlauf, dass bei einer höheren R_t ein zweites, vermutlich diprenyliertes Xanthon auftritt (GAID *et al.*, Daten unveröffentlicht; siehe Anhang 10.4.1). Dieser Sekundärstoff wurde nach 24 h das erste Mal detektiert und nahm von da an im Zeitverlauf stetig zu, während der Gehalt an Hyperxanthon E nach und nach absank. MÜLLER^[220] fand bei seinen Arbeiten neben Hyperxanthon E ebenfalls ein solches Signal und vermutete, allerdings ohne weitere Strukturaufklärung, als Weiterreaktion ein prenyliertes 2,3-Dihydropyran-Xanthon auf Grundlage der Hyperxanthon E-Struktur, ähnlich dem bekannten Garcinon B aus *H. patulum*, *H. androsaemum* oder *Garcinia*-Arten^[347,358,361,362]. Ein einfaches und typisches Dreiring-Xanthon-Grundgerüst mit zwei offenkettigen Isoprenresten ist hingegen aber eine ebenso plausible Möglichkeit, da diese schließlich häufig im Pflanzenreich beschrieben sind und u.a. mit γ -Mangostin oder Patulon auch diprenylierte Xanthone ohne cyclisierte Seitenketten in *Hypericum*-Arten bekannt sind (Abbildung 6.11)^[289,347,358,359]. Inzwischen ist die vollständige Strukturaufklärung dieses aus 1,3,6,7-THX abgeleiteten

Sekundärstoffes abgeschlossen, und das zweifach prenylierte Xanthon wurde tatsächlich nicht als ein Pyra-
noxanthon, sondern als Patulon identifiziert (Daten unveröffentlicht; siehe 5.6.3.3 und Anhang 10.4.2).

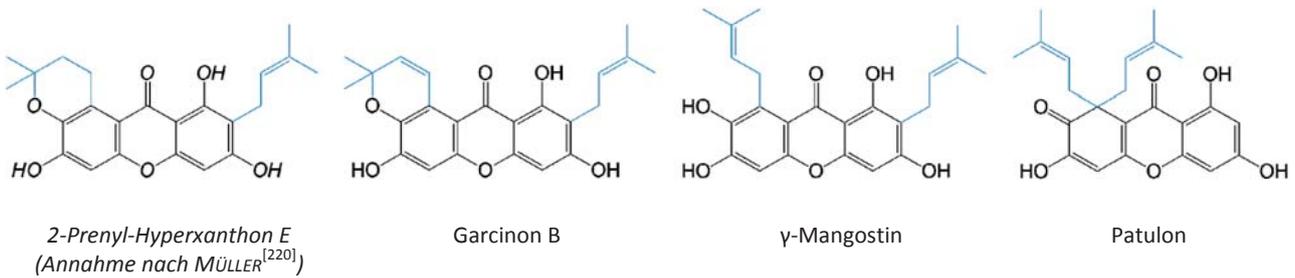


Abbildung 6.11 Ausgewählte Strukturformeln als Beispiele diprenylierter Xanthone aus *Hypericum*-Arten

Auch die *in vivo*-Bildung dieses zweiten Phytoalexins aus den *H. calycinum*-Kulturen kann durch rekombinante AS-PTs aus der vorliegenden Arbeit erklärt werden. Nach der erfolgten funktionellen Charakterisierung von „HcPT“^[263] wurde in weiterführenden *in vitro*-Untersuchungen auch ein zweites, zusätzliches Produkt aus der Reaktion von 1,3,6,7-THX und DMAPP entdeckt, das sich in den parallel untersuchten, Elicitor-behandelten Zellkulturen als Patulon herausstellte. Unter gleichen Bedingungen wurde darüber hinaus auch noch dasselbe diprenylierte Xanthon von „HcPT-2“ gebildet, nur in diesem Fall als einziges enzymatisches Produkt ohne die monoprenylierte Vorstufe 1,3,6,7-TH8PX. Somit konnte gezeigt werden, dass gleich zwei Johanniskraut-PTs durch doppelte Kondensation von Isopreneinheiten an dasselbe C-Atom des gleichen Substrates dasselbe Produkt generieren können. Die ermittelte R_f von Patulon implizierte aus der Erfahrung heraus, dass zwei Prenylreste angehängt sein müssen, was mittels MS leicht bestätigt wurde. Dass es sich dabei um eine eher atypische Xanthonstruktur handelte, wurde in den frühesten HPLC-Analysen bereits anhand des für Hydroxyxanthone ungewöhnlichen UV-Spektrums festgestellt. Begründet durch die Dearomatisierung eines der beiden Benzol-Ringe wird das gesamte Absorptionsverhalten beeinflusst: Durch Wegfall einer der konjugierten C–C-Doppelbindungen verkleinert sich das delokalisierte π -Elektronensystem im Grundgerüst und es folgt eine Verschiebung der UV-Absorptionseigenschaften in den kurzwelligeren UV-Bereich (hypsochromer Effekt), was einerseits die sog. „Blauverschiebung“ des Absorptionsmaximums von ca. 315 nm (1,3,6,7-THX) zu ca. 290 nm (Patulon) erklärt, auf der anderen Seite aber auch bereits durch die im Tageslicht deutlich blässere Farbe von Patulon im Vergleich zum intensiv gelb-gefärbten Substrat 1,3,6,7-THX ersichtlich ist. Weil die produzierten Mengen aus den *in vitro*-Enzymassays für eine eigene komplette Strukturaufklärung zu gering waren, erfolgte die zweifellose Identifizierung des enzymatischen Produktes als Patulon letztlich über eindeutige analytische 1:1-Abgleiche (HPLC (R_f), UV, LC-MS/MS-MS) mit der aus den Zellsuspensionskulturen isolierten, aufgereinigten und NMR-identifizierten Referenz. Somit ist außer der Hyperxanthon E-bildenden AS-PT „HcPT“ auch die Funktion von „HcPT-2“ im Sekundärstoffwechsel des Johanniskrauts aufgedeckt, die ausgehend von 1,3,6,7-THX ein zweites natürliches Phytoalexin mitproduziert. Die Ergebnisse der zuvor bereits erwähnten Genexpressionslevel harmonieren auch in Bezug auf „HcPT-2“ mit dem Verhalten der induzierten *H. calycinum*-Zellkulturen: Im Gegensatz zu den auf Stress-Reize *in planta* schnell/früh hochregulierten Genen der Hyperxanthon E-Biosynthese, die auch die erste biochemische Abwehrreaktion darstellt, steigen die „HcPT-2“-Transkriptmengen erst später und auch langsamer an bis zu einem Maximum bei ca. 16 h, was in den zeitlichen Kontext der verzögert auftretenden, späteren Patulon-Produktion als sekundäre phytochemische Verteidigungsstrategie im Zellkultursystem passt. Wie auch bei „HcPT“ sind die semiquantitativen Transkript-Analysen von MÜLLER^[220] ein unterstützendes Hilfsmittel zur Argumentation und Einbettung der AS-PTs in die Biosynthese-Vorgänge, und neuere qPCR-Untersuchungen von ELINE BIEDERMANN (AG Wittstock, Institut für Phar-



mazeutische Biologie, TU Braunschweig) bestätigten und reproduzierten die Expressionskurven erfolgreich (Daten unveröffentlicht), was die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse unterstützt und validiert.

Die generelle enzymatische Aktivität mit weiteren Substraten, besonders weiteren Xanthonen, liefert keinen auswertbaren Zugewinn. Beide zuvor beschriebenen AS-PTs akzeptieren auch 1,3,7-THX und können entsprechend der Aktivität an 1,3,6,7-THX dieselben Reaktionen katalysieren. Die Umsetzung des Substrates ist bei 1,3,7-THX nur deutlich geringer, was auf einen positiven Effekt der Hydroxylgruppe an C-6 des Xanthon-Grundgerüsts für die Ausrichtung des Substrates im aktiven Zentrum der Johanniskraut-PTs oder für die Stabilität des Enzym-Substrat-Komplexes spricht. Auch scheint die C-7-Hydroxylgruppe einen wichtigen Einfluss auf die Substratbindung und die Umsetzung zu haben, da es beispielsweise bei 1,3,5,6-THX zu keiner bzw. nahezu keiner Umsetzung durch „HcPT“ und „HcPT-2“ kommt. Mechanistische Prognosen auf molekularer Ebene sind jedoch nicht zielführend, solange es keine Enzym-Substrat-Interaktionsstudien oder idealerweise Kristallstrukturen der AS-PTs gibt – insofern sind die Ideen zur (Nicht-)Akzeptanz von Xanthon-Substraten mit Vorsicht zu behandeln. Ebenso sind die Überlegungen bezüglich der Positionen, an denen die Prenylreste am Xanthon gebunden werden, nur abgeleitet von bereits bekannten pflanzlichen Sekundärstoffstrukturen – mit Ausnahme der NMR-identifizierten „HcPT“-Produkte von 1,3,6,7-THX und DMAPP. Auch wenn ähnliche Voraussetzungen bestehen und es sogar andere *Hypericum*-Arten sind, auf die verwiesen werden kann, sollten erst weitere Strukturuntersuchungen der *in vitro*-Ergebnisse vorgenommen werden, will man sich der weiteren Prenylxanthane sicher sein – ist doch beispielsweise in Xanthon-haltigen Pflanzen sowohl die Bildung eines mit DMAPP an C-2-, C-5- oder auch C-8-substituierten 1,3,6,7-THX bekannt^[12,286,359]. Eine generelle Frage, die stellvertretend und exemplarisch die Notwendigkeit einer detaillierteren Aufklärung veranschaulichen soll, ist außerdem auch, ob es zwangsläufig überhaupt zu Prenylierungen an C-Atomen kommen muss, wovon im Rahmen dieser Arbeit am Johanniskraut grundsätzlich ausgegangen wird. Ein UV-Spektrum ließe sich nämlich durch die Prenylierung einer Hydroxylgruppe am Xanthon kaum von dem C-prenylierten oder sogar nicht-prenylierten Substrat unterscheiden, da es maximal zu geringfügigen induktiven Effekten am aromatischen Zentrum der phenolischen OH-Gruppe käme, die jedoch nur minimal die UV-Absorptionseigenschaften beeinflussen würden. Auch eine MS-Analyse könnte keine näheren Aufschlüsse liefern, da die gesamte Molekülmasse sowohl bei C- als auch O-prenylierten Strukturen identisch wäre (jeweils Austausch eines H-Atoms gegen einen Prenylrest) und in der Fragmentierung jeweils die reine Kohlenstoff-Seitenkette im Ganzen abgespalten werden würde. Anhaltspunkte liefern diesbezüglich, wenn keine NMR-Analyse möglich ist, also nur die Vergleiche mit der Literatur, die für pflanzliche Xanthane – im Gegensatz zu deren Analoga aus Pilzen^[363] – ausschließlich die Anknüpfung von Prenyleinheiten an C-Atome beschreibt. Selbst bei cyclisierten Strukturen wie dem 5-Methoxy-2-deprenylrheediaxanthon aus den Wurzeln von *Hypericum*-Arten^[329,364], bei dem theoretisch zuerst eine O-Prenylierung und anschließend ein Ringschluss angenommen werden könnte, wird stattdessen am C-Atom invers prenyliert und nachfolgend über die Hydroxylgruppe cyclisiert. Solche Substrat-Prenylierungen über das C-3 des DMAPPs sind zwar generell auch in Pflanzen selten, aber im Vergleich zu O-Prenylierungen an Xanthonen immerhin bekannt und wurden sogar schon in einer *Hypericum*-Art nachgewiesen^[365]. Außerdem kann bei vorliegender, aufgeklärter Struktur die Biosynthese anhand der Position der Methylsubstituenten des ursprünglichen Prenyldonors leicht rückwärts nachverfolgt werden. Schlussendlich erscheint es also logisch und wahrscheinlich zugleich, dass die vorhergesagten Strukturen der durch „HcPT“ und „HcPT-2“ *in vitro* prenylierten Xanthane (siehe 5.6.3, 5.6.5) die wahren Strukturformeln und gleichzeitig den tatsächlichen Zustand im Zellkultursystem/Johanniskraut widerspiegeln. Ein endgültiger Beweis mit definierter Anknüpfungsposition kann dennoch nur durch aufklärende Verfahren nach Produktion im Großmaßstab erbracht werden, wie am Beispiel der Charakterisierung von „HcPT“ gezeigt.

Für „HcPT-1“ aus den Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* sowie „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ aus *H. perforatum* wurde ebenfalls enzymatische Aktivität an Xanthonen gefunden. All diese AS-PTs arbeiten wie schon „HcPT“ und „HcPT-2“ ausschließlich mit denselben, bereits diskutierten Xanthon-Substraten und formen sie in gleicher Weise um. Gerade wegen des ausbleibenden funktionellen Zugewinns und der niedriger ausfallenden enzymatischen Umsetzung kann eine gesonderte Diskussion dieser Ergebnisse vernachlässigt werden. Einzige erwähnenswerte Besonderheit liefert „HpPT-5“, die im Vergleich nicht nur als einzige Xanthon-prenylierende Johanniskraut-PT das Substrat 1,3,7-THX dem hydrophileren 1,3,6,7-THX vorzieht, sondern dieses auch mit der größten relativen Umformung aller getesteten AS-PTs fast komplett zum monoprenylierten Produkt umsetzt. Auch hier gilt, dass es unklar ist wie die Struktur des einfach prenylierten Xanthons aussieht, da es im Rahmen der vorliegenden Arbeit zu keiner Strukturklärung kam – eine C-8-Prenylierung in Analogie der charakterisierten „HcPT“-Produkte ist genauso wahrscheinlich wie beispielsweise die C-2-Prenylierung zum 1,3,7-TH2PX, das bereits mehrfach in Pflanzen verwandter Familien beschrieben wurde^[290,291,349]. Dass die Bildung prenylierter Xanthone für „HcPT-1“ und die anderen AS-PTs aus *H. calycinum* nicht verwunderlich ist, liegt an dem natürlichen Vorkommen entsprechender Sekundärstoffe im Großkelchigen Johanniskraut als Ausgangspunkt dieser rekombinanten Enzyme. Ungewöhnlich erscheint dieser Fall hingegen für die verbliebenen aktiven AS-PTs aus *H. perforatum*. Xanthone repräsentieren nämlich keine mengenmäßig relevante Inhaltsstoffgruppe im Echten Johanniskraut, und sie kommen nachgewiesenermaßen auch nicht in der Arzneidroge (oberirdische Pflanzenteile), sondern in unterirdischen Organen vor. Unter diesen Xanthonen sind auch prenylierte Derivate wie Paxanthon, Toxyloxanthon B und die atypische Verbindung 5-Methoxy-2-deprenylrheediaxanthon bekannt, die gehäuft in Zellkulturen von *H. perforatum* auftreten^[12,355], jedoch nur sehr selten in den Wurzeln der Arzneipflanze zu finden sind^[204,329]. Umso mehr überraschte es nun, dass die getesteten „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“, die aus den blütenassoziierten Reproduktionsorganen isoliert und kloniert wurden, alle dieselben Xanthon-Grundgerüste prenylierten. Dabei entpuppte sich „HpPT-1“ sogar als das funktionelle „HcPT“-Pendant aus *H. perforatum*, da beide AS-PTs in gleicher Weise und auch vergleichbarem Umfang dieselben Reaktionen an denselben Xanthon-Substraten katalysieren – was bei einer 86%igen Sequenzähnlichkeit der beiden Enzyme untereinander auf den ersten Blick keine zu erwartende Selbstverständlichkeit ist. Bei genauerer Untersuchung kann aber festgestellt werden, dass mehr als die Hälfte der Sequenzunterschiede auf den N-terminalen Bereich entfällt, welcher die vorhergesagten Transitpeptide der beiden AS-PTs beinhaltet. Lässt man diese höchstwahrscheinlich nicht für die katalytische Enzymaktivität wichtigen Präsequenzen außen vor, so verringert sich die Anzahl an Sequenzunterschieden nochmals um mehr als die Hälfte, so dass die eigentliche Enzym-Ähnlichkeit viel höher ist und eine ähnliche Substratspezifität wieder wahrscheinlicher erscheint. Wieso nun letztlich aber drei an Xanthonen aktive AS-PTs in Knospen und Blüten von *H. perforatum* gefunden wurden, obwohl in der gesamten Arzneipflanze keine prenylierten Sekundärstoffe mit Ähnlichkeit zu den Produkten der Enzymassays bekannt sind, bleibt die abschließend zu klärende Frage. Dass überhaupt erst Xanthon-spezifische PTs in der Pflanze Echtes Johanniskraut existieren, wurde zu Beginn der Überlegungen aus eben diesem Grund nicht einmal für wahrscheinlich gehalten. In fast allen Zellkultursystemen von *H. perforatum* – seien es Kallus-, Suspensions-, Wurzel- oder Sprössling-Kulturen – können jedoch nach Hormon- oder Elicitor-Behandlung prenylierte Xanthone detektiert werden, die zuvor nicht nachzuweisen waren. Das legt die Vermutung nahe, dass die Möglichkeit der enzymatischen Prenylierung von Xanthonen ausschließlich bei Stress-Reizen relevant ist und genutzt wird, um einem beispielhaften Pathogen- oder Herbivoren-Befall mit diesen prenylierten Phytoalexinen zu begegnen^[12,366]. Gesundes, nicht infiziertes Johanniskraut sollte demnach auch kaum nachweisbare Prenylxanthone enthalten, wie es gemeinhin beschrieben ist – mit Elicitoren behandeltes oder absichtlich einem Pathogen ausgesetztes Johanniskraut müsste allerdings eine gleiche Reaktion wie die Kultursysteme zeigen und in ähnlicher Weise dazu in der Lage sein stressinduziert diese



Abwehrstoffe in größerer Menge zu produzieren. Derartige Untersuchungen und Publikationen stehen allerdings zum aktuellen Zeitpunkt noch aus. Die grundlegend geringen Mengen bzw. die gänzliche Abwesenheit prenylierter Xanthone in der intakten Arzneipflanze bei gleichzeitigem Vorkommen anderer Sekundärstoffe in größeren Mengen sind darüber hinaus eine Erklärung der epigenetischen Verteidigungsstrategie des Echten Johanniskrauts, die auch PASQUA *et al.*^[367] ähnlich formulieren: In frühen Entwicklungsstadien sowie im Zustand undifferenzierter Gewebe und Einzelzellen (Kallus, Zellsuspension) stellen (prenylierte) Xanthone die wahrscheinlich einfachste, wichtigste und effizienteste Inhaltsstoffgruppe dar, während keine anderen Sekundärstoffgruppen zur biochemischen Abwehr gebildet werden (können). In Wachstums- und Reproduktionsphasen können dann durch Differenzierung von Geweben sowie Ausbildung sekretorischer, anatomischer Strukturen im weiteren Verlauf neue und komplexere, spezifischer wirksame Sekundärstoffe wie die PPAPs und Naphthodianthrone produziert und gespeichert werden, wodurch die Notwendigkeit der Xanthon-Produktion sinkt. Somit lässt sich zumindest schon die Ungleichheit der Sekundärstoffprofile von Zellkultur und reifem Johanniskraut erklären, jedoch nicht die Expression der AS-PT-Gene für prenylierte Xanthone in davon freiem Gewebe – auf den ersten Blick ein überflüssiger Stoffwechselfvorgang. Theoretisch sind die Voraussetzungen von Grund auf gegeben, da weitläufig bekannt die genetische Ausstattung jeder einzelnen Zelle – sei es aus Zellkulturen oder der intakten Pflanze – identisch ist und somit auch in den Xanthon-freien Blüten die Proteinbiosynthese von dafür relevanten AS-PTs stattfinden kann. Durch die Klonierung der entsprechenden PT-cDNAs aus mRNA wurde in dieser Arbeit letztlich selbst der Beweis erbracht, dass tatsächlich eine wahrscheinlich konstitutive Expression der Gene von „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ in den geschlechtlichen Reproduktionsorganen von *H. perforatum* stattfinden muss. Ein praktischer Vergleich, ob wenigstens auch zeitgleich die Expression in Wurzeln (einzige Xanthon-haltige Gewebe) der intakten Arzneipflanze stattfindet, ist an dieser Stelle nicht direkt möglich – eine molekularbiologische Analyse von Wurzelgewebe wurde zugunsten der Untersuchung Hyperforin-haltiger Gewebe (oberirdische Pflanzenteile) vernachlässigt. Als Lösung wäre ein qualitativer Nachweisversuch von „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ in den Wurzeln durch eine RT-PCR – wie bei der Klonierung der drei betrachteten AS-PTs – möglich (siehe 5.4.4, 5.4.8 und 5.4.11), sofern auch extrahierte RNA aus Wurzelmaterial als Matrize eingesetzt wird. Quantitativ wären darüber hinaus qPCR-Analysen geeignet, um das Ausmaß der Expression zu bestimmen. Da jedoch weder Wurzelgewebe untersucht wurde noch die Technik der qPCR während der hier diskutierten Laborarbeiten zur Verfügung stand, können zumindest die FPKM-Werte aus dem MPGR-Transkriptom zur Argumentation herangezogen werden (siehe 4.3.1). BLAST-Analysen der klonierten Volllänge-cDNAs von „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ gegen die MPGR-Datenbank (siehe 3.9; Modus: blastn; Datenbank: *H. perforatum* sequence assembly – MSU vf) zeigen dabei, dass die den AS-PTs entsprechenden, d.h. zuordenbaren Transkripte auch wirklich gleichzeitig sowohl in Blüten als auch den Wurzeln vorhanden sind (Tabelle 6.2).

Offensichtlich werden alle drei Xanthon-relevanten AS-PTs zur selben Zeit in unterschiedlichen Pflanzenteilen exprimiert, unabhängig von spezifischer Differenzierung und umgebendem Sekundärstoffprofil. In Wurzeln, dem einzigen Synthese- und/oder Speicherort von Xanthonen im Echten Johanniskraut, ist die räumliche Nähe von Substrat und AS-PT gegeben, auch wenn bis auf wenige seltene Ausnahmen keine prenylierten Produkte aus einer möglichen Reaktion publiziert sind^[204,329]. Die ursprüngliche Ausgangsfrage, warum aber überhaupt „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ ohne erkennbare Funktion exprimiert werden und dann auch noch außerhalb der erwarteten Pflanzengewebe zu finden sind, konnte auch durch die bisherige Argumentation noch nicht beantwortet werden. Wie die bis hierhin führende Diskussion zeigt, können argumentativ nur die Rahmenbedingungen beim derzeitigen Ergebnisstand verdeutlicht und erklärt werden, so dass letztlich folgende Interpretationsansätze vermutet werden und bleiben: Auf der einen Seite steht die Theorie, dass Xanthone eine Gruppe von akzeptierten Aromaten sind, sie jedoch nicht die


Tabelle 6.2 Übersicht der MPGR-BLAST-Ergebnisse von Xanthon-assoziierten AS-PTs aus *H. perforatum*

AS-PT	MPGR Sequenz-ID	Gewebe als Quelle der gefundenen Transkripte	FPKM-Werte
HpPT-1 / HpPT-8	hpa_locus_27262 / 29170	Blüten <i>flower-whole buds; flower bud-pistil stamen sepals</i>	21,1; 14,6 / 28,7; 17,5
		Wurzeln <i>oldest part of root; middle aged part of root / middle aged part of root; oldest part of root</i>	14,3; 12,9 / 6,5; 5,3
HpPT-5	hpa_locus_11003	Wurzeln <i>oldest part of root; middle aged part of root</i>	9,5; 5,0
		Blüten <i>flower-whole bud petal; flower-whole mature</i>	0,5; 0,4

einzigsten und v.a. nicht die eigentlich physiologischen Substrate darstellen, es folglich noch weitere, bessere Substrate für die drei Johanniskraut-PTs gibt. Berechtigterweise bleibt aber die Gegenfrage, um welche bisher noch unentdeckten Substrate es sich dabei handeln soll, da das Sekundärstoffprofil von *H. perforatum*, insbesondere aus den als Arzneidroge verwendeten Teilen, ausgiebig untersucht und bekannt ist. Außerdem sind bereits im Substratscreening unterschiedliche aromatische Grundgerüste getestet worden und keine dieser Strukturen wurde jeweils umgesetzt. Zusätzlich spräche dieser Zustand gegen die weithin bekannte enge Substratspezifität von pflanzlichen AS-PTs. Auf der anderen Seite ist es denkbar, dass das Johanniskraut eine Art Standby-Zustand zur biochemischen Abwehr aufrechterhält. Dahinter steckt der Gedanke, dass sich in einem geringen Ausmaß die Biosynthese-Gene in einer konstitutiven Expressionsphase befinden, welche es dem Johanniskraut ermöglicht bei Pathogen- oder Fraßbefall quasi augenblicklich und ohne zwischengeschaltete Proteinbiosynthese Xanthone als Abwehrstoffe (Erstlinienantwort) zu produzieren. Auch diese Vermutung ist aber aus zweierlei Hinsicht nicht zufriedenstellend. Einerseits wurde bis heute noch nie von prenylierten Xanthonen, wie sie durch „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ gebildet werden, in der Arzneipflanze berichtet – selbst von einem unterschweligen Vorkommen in ebenso geringer Menge wie die detektierten Transkripte der AS-PTs in der Pflanze ist nichts bekannt. Andererseits zeigten GAID *et al.*^[214] in Zellsuspensionskulturen, dass weiter vorgeschaltete Enzyme im Xanthon-Biosyntheseweg eben nicht permanent exprimiert werden und somit die Bildung des benötigten Starter-Moleküls Benzoyl-CoA ebenso wie das unsubstituierte Xanthon-Grundgerüst nicht dauerhaft und auf Abruf zur Verfügung stehen. Als dritter potentieller Erklärungsansatz kann die Möglichkeit einer zweiten enzymatischen PT-Funktion neben der Prenylierung von Aromaten vermutet werden. Neueste, jedoch bisher nicht valide Ergebnisse aus unserer AG deuten nach vorläufiger

Auswertung nämlich einen ebensolchen Sachverhalt an: In einem Standard-*in vitro*-Assay einer anderen AS-PT mit DMAPP als einzigem Prenyldonor konnte erstaunlicherweise ein monogeranyliertes Produkt entdeckt werden, was für eine Dimethylallyltransferase-Aktivität (GPP-/FPP-Synthase) spräche. Sollte sich diese zusätzliche kettenverlängernde, aliphatische PT-Aktivität entgegen aller Erwartungen – es besteht zum Einen nur geringe Sequenzähnlichkeit mit GPP-/FPP-Synthasen (ca. 20%; Abbildung 6.12) und zum Anderen ist eine solche enzymatische Doppelfunktion bisher in der Natur unbekannt – bewahrheiten, so könnte dies auch für „HpPT-1“, „HpPT-5“ und „HpPT-8“ eine mögliche Begründung für deren verbreitetes Auftreten in *H. perforatum* sein. Da GPP in unterschiedlichsten Vorgängen des Sekundärmetabolismus (aber auch im Primärstoffwechsel) benötigt wird, wäre sowohl die konstitutive Expression entsprechender Gene als auch das gleichzeitige Auftreten in verschiedenen, ausdifferenzierten Geweben stichhaltig erläutert. All diese Spekulationen werden sich allerdings erst ausräumen lassen, wenn zukünftig weitere Untersuchungen an den jeweiligen Johanniskraut-PTs, u.a. möglicherweise auch mit linearen, aliphatischen Substraten oder ausschließlich mit Prenyldiphosphaten untereinander, durchgeführt wurden.



7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Acylphloroglucine (APs) sind weitverbreitete Sekundärstoffstrukturen in Pflanzen, zu denen u.a. auch die polycyclischen polyprenylierten APs (PPAPs) zählen. Sie zeichnen sich durch faszinierende, komplexe Molekülstrukturen und interessante, potente Bioaktivitäten aus. Das bekannteste und bestuntersuchte PPAP ist Hyperforin, der Hauptinhaltsstoff des seit der Antike und bis heute als Arzneipflanze verwendeten Echten Johanniskrauts (*Hypericum perforatum* L.). Ihm werden aus aktueller wissenschaftlicher Sicht eine zentrale Rolle an der antidepressiven Wirksamkeit von Johanniskraut-Extrakten sowie weitere vielversprechende pharmakologische Eigenschaften zugeschrieben^[60]. Da der steigende Bedarf an Johanniskraut und im Speziellen an Hyperforin kaum durch Kultivierung oder eine aufwändige, unwirtschaftliche Vollsynthese gedeckt werden kann, erweckt eine mögliche biotechnologische Produktion großes Interesse. Voraussetzung dafür ist die Entdeckung und Nutzbarmachung von beteiligten Enzymen des weitestgehend auf Vorhersagen beruhenden, pflanzlichen Hyperforin-Biosyntheseweges^[269]. Ziel dieser Arbeit ist es aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen (AS-PTs) aus *H. perforatum*, die Isoprenreste auf Aromaten übertragen und bei der Hyperforin-Synthese *in planta* eine wichtige Rolle spielen, zu identifizieren, heterolog zu exprimieren und funktionell zu charakterisieren.

Durch Literatur- und Sequenzvergleiche konnten zwei konservierte Aspartat-reiche Motive innerhalb der pflanzlichen Enzymfamilie ausgemacht werden, von denen degenerierte Primer abgeleitet wurden. Parallel wurden mit bekannten AS-PT-Sequenzen und Genfragmenten aus unserer Arbeitsgruppe (AG) vier Transkriptom-Datenbanken exzessiv nach möglichen PT-cDNAs durchsucht. Anhand ausgewählter Treffer-Sequenzen wurden ebenfalls Klonierungs-Primer entworfen. Qualitativ hochwertige RNA aus dem polyphenolreichen Pflanzenmaterial von *H. perforatum* konnte nach ausreichender Validierung mit einer LiCl-Fällungsmethode isoliert werden^[240]. Daraus gewonnene cDNA diente in der Homologie-Klonierung als Matrize für Volllänge-Klonierungen und Gen-Vervollständigungen. Mit ausgeweiteten molekularbiologischen Techniken ließen sich letztlich acht putative PT-Gene („HpPT-1–8“) aus *H. perforatum* isolieren und vier weitere PT-cDNAs („HpPT-9“ aus *H. perforatum*; „HcPT“, „HcPT-1“ und „HcPT-2“ aus *H. calycinum*) aus einer Vorgänger-Arbeit^[220] umklonieren. Bioinformatische Berechnungen/Vorhersagen zu Eigenschaften, Struktur, *in vivo*-Verhalten etc. ergaben, dass erwartungsgemäß alle übersetzten Proteinsequenzen (380–411 aa) beide konservierte Motive, mehrere transmembranäre Domänen und vermeintliche Transitpeptide besaßen. Sowohl diese erfüllten Kriterien pflanzlicher AS-PTs als auch die phylogenetisch nahe Verwandtschaft zum AP- und Flavonoid-Stoffwechsel indizierten, dass AS-PTs aus Johanniskraut vorlagen. Nach verschiedenen, erfolglosen Expressionsversuchen in Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden alle zwölf putativen AS-PTs als rekombinante Baculoviren heterolog in Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*, Sf9) überexprimiert. Nach Etablierung und Validierung einer Methode für die Extraktion von Mikrosomen aus Sf9-Zellen^[260] wurden *in vitro*-Aktivitätsuntersuchungen durchgeführt und Bioaktivität für acht rekombinante AS-PTs gefunden. Sechs der aktiven Enzyme akzeptieren nahezu ausschließlich Xanthon-Grundgerüste als Substrate und prenylierten diese einfach und/oder doppelt mit Dimethylallyldiphosphat (DMAPP). Hervorzuheben ist dabei „HcPT“, die durch Kondensation von DMAPP an das C-8-Atom von 1,3,6,7-Tetrahydroxanthon (1,3,6,7-THX) die offenkettige Vorstufe des in *H. calycinum* induzierbaren Phytoalexins Hyperxanthon E katalysierte und funktionell charakterisiert wurde^[214,263]. Das identische Substrat 1,3,6,7-THX konnte außerdem durch „HcPT-2“ gleich doppelt mit DMAPP zum dearomatisierten Patulon, einem weiteren Phytoalexin aus Elicitor-behandelten *H. calycinum*-Zellen, umgesetzt werden (GAID *et al.*, Daten unveröffentlicht). Neben den Xanthon-spezifischen AS-PTs zeigten zwei der Johanniskraut-PTs („HpPT-2“ und „HpPT-6“) enzymatische Aktivität am aromatischen Hyperforin-Grundgerüst, dem AP Phlorisobutyrophenon (PIBP). Bei Einsatz des Prenyldonors DMAPP konnte „HpPT-2“ sowohl ein als auch



zwei Prenyl-Moleküle addieren – bei Verwendung von Geranyldiphosphat (GPP) wurde PIBP einfach enzymatisch geranyliert. „HpPT-6“ konnte in einem nachfolgenden Schritt das monogeranylierte PIBP aufgreifen und mit einem zusätzlichen Dimethylallylrest versehen. Somit konnten letztendlich die ersten beiden Prenylierungsschritte der postulierten Hyperforin-Biosynthese durch rekombinante, membranständige AS-PTs aus *H. perforatum* nachgewiesen werden.

Ausgehend von den erarbeiteten PT-Informationen können nun die weiteren Johanniskraut-AS-PTs nach Beispiel von „HcPT“ biochemisch charakterisiert werden. Dazu zählen auch Lokalisationsstudien in homologen Expressionsorganismen (Tabak) oder *H. perforatum* selbst, um die Fragen nach Metabolon-Beteiligung und definitiven Biosynthese-Orten von (P)PAPs zu beantworten. Auch erste Kristallisationsversuche einer pflanzlichen AS-PT können nach optimierten Reaktionsbedingungen angedacht werden, um mehr über die beteiligten aktiven, katalytischen Enzymdomänen und den Prenylierungsmechanismus von AS-PTs zu erfahren. Mit detaillierterem Wissen können dann gezielt weitere kombinierte Experimente am Johanniskraut geplant werden: Einerseits können enzymatische Produkte einer Johanniskraut-PT anderen AS-PTs als Substrate angeboten werden, um die enzymatische Biosynthese-Kaskade von Hyperforin oder auch anderen prenylierten APs vollständig *in vitro* nachzustellen. Andererseits können mehrere rekombinante AS-PTs zusammen in einer Reaktion vereint (entsprechend „HpPT-2“ und „HpPT-6“) oder sogar co-exprimiert werden, um den Nachweis eines *in vitro*-Metabolons zu beweisen und mehrere Biosynthese-Schritte bzw. die gesamte Bildung auf einmal nachzustellen. Ein Wechsel in ein optimiertes, eukaryotisches Mikroorganismen-Expressionssystem wie Hefe ist in Zukunft außerdem anstrebenswert (u.a. durch Methodenoptimierung, Codon-Optimierung von AS-PT-Genen und deren Genomintegration), um eine ökonomische, effektive biotechnologische Produktionsplattform zu erschaffen. Somit können nicht nur (poly-)prenylierte Naturstoffe aus dem Johanniskraut oder anderen interessanten (Arznei-)Pflanzen im industriellen Maßstab produziert werden, sondern es wären auch durch gezielte Enzym-Kombinationen unterschiedlichster rekombinanter AS-PTs nach Baukastenprinzip stabilere/besser lösliche Derivate bekannter Sekundärstoffe oder sogar ganz neue Substanzen mit eigener Bioaktivität denkbar.

8 VERZEICHNISSE / AUFLISTUNGEN

8.1. Abkürzungen

Abkürzung	Erläuterung	Abkürzung	Erläuterung
[S]	Substratkonzentration	CLSM	konfokale Laserscanning-Mikroskopie (<i>engl.</i> confocal laser-scanning microscopy)
°C	Grad Celsius	CNL	Cinnamat:CoA-Ligase
λ	Wellenlänge	Co.	<i>engl.</i> company
1,3,5,6-THX	1,3,5,6-Tetrahydroxyxanthon	Coomassie	Coomassie-Brillant-Blau G-250
1,3,6,7-TH5PX	1,3,6,7-Tetrahydroxy-5-prenylxanthon	COX-1	Cyclooxygenase-1
1,3,6,7-TH8PX	1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon	CRH	Corticoliberin (<i>engl.</i> corticotropin-releasing hormone)
1,3,6,7-THX	1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon	CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
1,3,7-TH2PX	1,3,7-Trihydroxy-2-prenylxanthon	cTP	Chloroplasten-Transitpeptid
1,3,7-TH6,8DPX	1,3,7-Trihydroxy-6,8-diprenylxanthon	CYP3A4	Cytochrom P ₄₅₀ 3A4
1,3,7-TH8PX	1,3,7-Trihydroxy-8-prenylxanthon	DAD	Diodenarray-Detektor
1,3,7-THX	1,3,7-Trihydroxyxanthon	dATP	Desoxyadenosintriphosphat
2,3',4,6-THB	2,3',4,6-Tetrahydroxybenzophenon	DC	Dünnschichtchromatographie
5-LO	Arachidonat-5-Lipoxygenase	DEAE-Dextran	Diethyl-Aminoethyl-Dextran
aa	Aminosäure(n) (<i>engl.</i> amino acid(s))	dH ₂ O	demineralisiertes Wasser
AcMNPV	<i>Autographa californica multicapsid nucleopolyhedrovirus</i>	DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	DMATS	Dimethylallyltryptophan-Synthase
AG	Arbeitsgruppe	DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid)
AP(s)	Acylphloroglucin(e)	dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
APP	Amyloid-Precursor-Protein	dsDNA	doppelsträngige DNA
APS	Ammoniumperoxodisulfat	DTT	Dithiothreitol
AS-PT	Aromatische Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferase	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ATP	Adenosintriphosphat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>engl.</i> ethylenediaminetetraacetic acid)
bar	SI-Einheit des Drucks	eGFP	verstärkt grün-fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> enhanced green fluorescent protein)
BDNF	Nerven-Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> brain-derived neurotrophic factor)	EMS	verstärkte Massenspektrometrie (<i>engl.</i> enhanced mass spectrometry)
BLAST	<i>engl.</i> basic local alignment search tool	<i>engl.</i>	englisch
bp	Basenpaar	EPI	verstärktes Produkt-Ion (<i>engl.</i> enhanced product ion)
BPS	Benzophenon-Synthase	ER	endoplasmatisches Retikulum
BUS	Isobutyrophenon-Synthase	ESI	Elektrosprayionisation
bzw.	beziehungsweise	exp.	experimentell
c	Konzentration	FLIM	Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (<i>engl.</i> fluorescence lifetime imaging microscopy)
ca.	circa	FPKM	<i>engl.</i> fragments per kilobase of transcript per million mapped reads
CaCl ₂	Calciumchlorid	FPP	Farnesyldiphosphat
cDNA	komplementäre DNA (<i>engl.</i> complementary DNA)	FPPS	Farnesyldiphosphat-Synthase
CDS	kodierende Gensequenz (<i>engl.</i> coding sequence)	g	Gramm
CHI	Chalkon-Isomerase	GABA	γ-Aminobuttersäure
CHS	Chalkon-Synthase	GACP	gute landwirtschaftliche Praxis (<i>engl.</i> good agricultural and collection practice)



ges.	gesättigt	MM	Mastermix
GFP	grün-fluoreszierendes Protein (<i>engl.</i> green fluorescent protein)	M-MuLV	<i>engl.</i> Moloney murine leukemia virus
ggf.	gegebenenfalls	MPAPs	monocyclische polyprenylierte Acylphloroglucine
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat	MPGR	<i>engl.</i> Medicinal Plant Genomics Resource
GPP	Geranyldiphosphat	mRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> messenger RNA)
GSP	genspezifische(r) Primer	MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
h	Stunde(n)	MS	Massenspektrometrie
<i>H. calycinum</i>	<i>Hypericum calycinum</i>	MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
<i>H. perforatum</i>	<i>Hypericum perforatum</i>	n.Chr.	nach Christus
HBV	Hepatitis B-Virus	n.d.	nicht detektierbar
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus	Na ₃ PO ₄	Natriumphosphat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>engl.</i> high performance liquid chromatography)	NCBI	<i>engl.</i> National Center for Biotechnology Information
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (<i>engl.</i> international statistical classification of diseases and related health problems)	NGF	Nerven-Wachstumsfaktor (<i>engl.</i> nerve growth factor)
Inc.	<i>engl.</i> incorporation	NH ₄ ⁺	Ammonium-Ion
IPK	Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung	NH ₄ HCO ₃	Ammoniumhydrogencarbonat
IPP	Isopentenylidiphosphat	NH ₄ OH	Ammoniumhydroxid
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	nm	Nanometer
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat	NMR	Kernspinresonanzspektroskopie
K ₃ PO ₄	Kaliumphosphat	NO	Stickstoffmonoxid
kb	Kilobase	Nr.	Nummer
KCl	Kaliumchlorid	NS	Normalschliff
kDa	Kilo-Dalton	NSMRI	Tricyklika (<i>engl.</i> non selective monoamine reuptake inhibitors)
K _m	Michaeliskonstante	NT(s)	Neurotransmitter
l	Liter	OD ₆₀₀	Optische Dichte bei λ = 600 nm
LB	Kulturmedium (<i>engl.</i> lysogeny broth)	–OP	Phosphatrest
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung	–OPP	Diphosphatrest
LiCl	Lithiumchlorid	ORF	offener Leserahmen (<i>engl.</i> open reading frame)
Lit.	Literatur	ori	Replikationsursprung (<i>engl.</i> origin of replication)
LS	Kulturmedium nach Linsmaier/Skoog	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
m/z	Masse/Ladung	PAL	Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
mA	Milliampere	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
MAO	Monoaminoxidase	PEG	Polyethylenglycol
mAU	Milliabsorptionseinheit (<i>engl.</i> milliabsorbance unit)	Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
MCS	Polylinker (<i>engl.</i> multiple cloning site)	pI	isoelektrischer Punkt
MDR1	<i>engl.</i> multidrug-resistance-protein 1	PIBP	Phlorisobutyrophenon
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure	PIVP	Phlorisovalerophenon
mg	Milligramm	PKS	Polyketid-Synthase
min	Minute(n)	pM	picomolar
ml	Milliliter	PMT	Sekundärelektronenvervielfacher (<i>engl.</i> photomultiplier tube)
mM	millimolar	Pos.	Position



PPAPs	polycyclische polyprenylierte Acylphloroglucine	T _A	Hybridisierungstemperatur (<i>engl.</i> annealing temperature)
PT	Prenyltransferase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
PVP	Polyvinyl(poly)pyrrolidon	T _M	Schmelztemperatur
PXR	Pregnan-X-Rezeptor	TMH	Transmembranäre α -Helix
PZ	Pharmazeutische Zeitung	TP	Transitpeptid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR	TRIS	Trometamol (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)
RACE	<i>engl.</i> rapid amplification of cDNA ends	TRPC	klassischer, nichtselektiver Kationenkanal (TRP-Kanal; <i>engl.</i> canonical transient receptor potential channel)
RE	Restriktionsendonuklease / Restriktionsenzym	TU	Technische Universität
R _f	Retentionsfaktor bzw. Rückhaltefaktor	U	Einheit (<i>engl.</i> unit)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>engl.</i> ribonucleic acid)	UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
RP	Umkehrphase (<i>engl.</i> reversed phase)	ÜN	über Nacht
R _t	Retentionszeit	UTR	untranslatierter Bereich (<i>engl.</i> untranslated region)
RT	Reverse Transkriptase	UV	ultraviolett
s	Sekunde(n)	v	Umsetzungsgeschwindigkeit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	v.a.	vor allem
<i>S. frugiperda</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>	v.Chr.	vor Christus
SAP	<i>engl.</i> shrimp alkaline phosphatase	v _{max}	maximale Umsetzungsgeschwindigkeit
Sf9	Insektenzelllinie aus <i>Spodoptera frugiperda</i> -Ovarien	Vit.	Vitamin
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>engl.</i> sodium dodecyl sulfate)	VPS	Isovalerophenon-Synthase
SMART	<i>engl.</i> switching mechanism at 5' end of RNA transcript	VRV	Vakuumrotationsverdampfer
SOC	Kulturmedium (<i>engl.</i> super optimal broth with catabolite repression)	X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
sog.	sogenannt(e)	XS	Xanthon-Synthase
ssDNA	einzelsträngige DNA	z.B.	zum Beispiel
syn.	synonym	z.T.	zum Teil

Grundbausteine von Protein- und Gensequenzen (Aminosäuren und Nucleobasen)

Proteinogene Aminosäuren		
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin

Nucleobasen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin



Sequenzinformationen zu pflanzlichen Prenyltransferasen (phylogenetische Untersuchungen)

Abkürzung	Sequenzname	Organismus	Registrierungsnummer
ApVTE2-1	homogentisate phytyltransferase	<i>Allium porrum</i>	DQ231057
AtPPT1	<i>para</i> -hydroxy benzoate polyprenyl diphosphate transferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AB052533
AtVTE2-1	homogentisate phytylprenyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AY089963
AtVTE2-2	homogentisate phytyltransferase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	DQ231060
Cl-PT1a	umbelliferone 8-geranyltransferase	<i>Citrus limon</i>	AB813876
CpVTE2-1	homogentisate phytyltransferase	<i>Cuphea pulcherrima</i>	DQ231058
CsPT-1	aromatic prenyltransferase	<i>Cannabis sativa</i>	WO 2011017798 A1
CtIDT	flavonoid prenyltransferase	<i>Maclura tricuspidata</i>	KM262660
GmG4DT	pterocarpin 4-dimethylallyltransferase	<i>Glycine max</i>	AB434690
GmVTE2-1	homogentisate phytyltransferase	<i>Glycine max</i>	DQ231059
GmVTE2-2	homogentisate phytyltransferase	<i>Glycine max</i>	DQ231061
GuA6DT	flavone prenyltransferase	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	KJ123716
HIPT-1	aromatic prenyltransferase	<i>Humulus lupulus</i>	AB543053
HIPT-2	aromatic prenyltransferase	<i>Humulus lupulus</i>	KM222442
HvHGGT	homogentisic acid geranylgeranyl transferase	<i>Hordeum vulgare</i>	AY222860
LaPT1	genistein 3'-dimethylallyltransferase	<i>Lupinus albus</i>	JN228254
LePGT1	geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	AB055078
LePGT2	geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	AB055079
MaIDT	flavonoid prenyltransferase	<i>Morus alba</i>	KM262659
OsHGGT	homogentisic acid geranylgeranyl transferase	<i>Oryza sativa</i>	AY222862
OsPPT1	<i>p</i> -hydroxybenzoate polyprenyltransferase	<i>Oryza sativa</i>	AB263291
OsVTE2-2	homogentisate phytyltransferase	<i>Oryza sativa</i>	gi 50938601
PcPT	umbelliferone 6-dimethylallyltransferase	<i>Petroselinum crispum</i>	AB825956
PsPT1	umbelliferone dimethylallyl transferase	<i>Pastinaca sativa</i>	KM017083
PsPT2	umbelliferone dimethylallyl transferase	<i>Pastinaca sativa</i>	KM017084
SfFPT	flavonoid prenyltransferase	<i>Sophora flavescens</i>	KC513505
SfG6DT	genistein 6-dimethylallyltransferase	<i>Sophora flavescens</i>	AB604224
SfILD	isoliquiritigenin dimethylallyltransferase	<i>Sophora flavescens</i>	AB604223
SfN8DT-1	naringenin 8-dimethylallyltransferase	<i>Sophora flavescens</i>	AB325579
SfN8DT-2	naringenin 8-dimethylallyltransferase	<i>Sophora flavescens</i>	AB370330
SfN8DT-3	8-dimethylallyltransferase	<i>Sophora flavescens</i>	AB604222
TaHGGT	homogentisic acid geranylgeranyl transferase	<i>Triticum aestivum</i>	AY222861
TaVTE2-1	homogentisate phytyltransferase	<i>Triticum aestivum</i>	DQ231056
ZmVTE2-1	homogentisate phytyltransferase	<i>Zea mays</i>	DQ231055



8.2. Abbildungen

Abbildung 1.1 Klassifizierung von natürlich vorkommenden Phloroglucin-Derivaten	1
Abbildung 1.2 Vereinfachtes Biosynthese-Schema von APs und AP-Derivaten	2
Abbildung 1.3 Strukturelle Einteilung von PPAPs	4
Abbildung 1.4 Strukturformeln ausgewählter, bioaktiver pflanzlicher PPAPs	5
Abbildung 1.5 Übersicht nachgewiesener Hyperforin-Bioaktivitäten	8
Abbildung 1.6 Hyperforin und hydrophilere, semisynthetische Hyperforin-Derivate	9
Abbildung 1.7 Biosynthese-Schema der Hopfensäuren als Vorstufen von PPAPs	11
Abbildung 1.8 Angenommene Biosynthesewege der unterschiedlichen Grundgerüst-Typen von PPAPs	12
Abbildung 1.9 Einteilung von Prenyltransferasen	13
Abbildung 1.10 Beispiele pflanzlicher AS-PTs	14
Abbildung 1.11 Unterschiedliche Biosynthesewege von DMAPP	15
Abbildung 1.12 Weltweites Vorkommen der Gattung Hypericum	16
Abbildung 1.13 <i>Hypericum perforatum</i> L., Hypericaceae	17
Abbildung 1.14 Kontrollierter Anbau von <i>H. perforatum</i>	18
Abbildung 1.15 PPAPs und Naphthodianthrone aus <i>H. perforatum</i>	19
Abbildung 1.16 Flavonoide inkl. Biflavone und Xanthone aus <i>H. perforatum</i>	20
Abbildung 1.17 <i>Hypericum calycinum</i> L., Hypericaceae	21
Abbildung 3.1 Vektorkarten verwendeter Klonierungs-/Expressionsplasmide	33
Abbildung 4.1 Zellsuspensionskulturen von <i>H. calycinum</i>	35
Abbildung 4.2 Reaktionsschema der Synthese von Dimethylallyldiphosphat	36
Abbildung 4.3 Reaktionsschema der Synthese von PIBP	37
Abbildung 4.4 Reaktionsschema der Synthese von 1,3,7-Trihydroxyxanthon	38
Abbildung 4.5 Reaktionsschema der enzymatischen C-6-Hydroxylierung von 1,3,7-Trihydroxyxanthon	39
Abbildung 4.6 Übersicht nacheinander geschalteter Schritte zum „Fischen“ von cDNA-Sequenzen in Transkriptom-Analysen	40
Abbildung 4.7 Strukturformeln eingesetzter, getesteter aromatischer Substrate	60
Abbildung 4.8 Reaktionsschema der Prenylierung von 1,3,6,7-THX zum monoprenylierten 1,3,6,7-TH8PX	62
Abbildung 5.1 MS-Analyse des DMAPP-Syntheseproduktes	65
Abbildung 5.2 HPLC-Chromatogramm von synthetisiertem PIBP	66
Abbildung 5.3 MS-Analyse des PIBP-Syntheseproduktes	67
Abbildung 5.4 HPLC-Chromatogramm von synthetisiertem 1,3,7-THX	68
Abbildung 5.5 Massenspektrum des Synthese-Zwischenproduktes 1,3,7-THX	69
Abbildung 5.6 MS-Analyse des 1,3,6,7-THX-Syntheseproduktes	70
Abbildung 5.7 HPLC-Chromatogramm von synthetisiertem 1,3,6,7-THX	71
Abbildung 5.8 Sequenzvergleich klonierter/übernommener PTs aus Johanniskraut mit HIPT-1	74
Abbildung 5.9 Grundlegender Protein-Aufbau der PTs aus Johanniskraut-Arten	75
Abbildung 5.10 Berechnung von TMHs in der Proteinsequenz von HpPT-2	76
Abbildung 5.11 Schematische Struktur und Membranintegration einer AS-PT aus Johanniskraut mit sechs TMHs	78
Abbildung 5.12 Konfokale Laser-Scanning Mikroskop-Aufnahmen von Insektenzellen mit Fluoreszenzgen tragenden Baculoviren	80
Abbildung 5.13 Phylogenetische Einordnung untersuchter Proteinsequenzen putativer Johanniskraut-PTs	81
Abbildung 5.14 Agarose-Gelelektrophorese extrahierter Gesamt-RNA-Proben aus <i>H. perforatum</i>	83
Abbildung 5.15 Agarose-Gel extrahierter Gesamt-RNA aus <i>H. perforatum</i> -Pflanzenmaterial von 2012–2013	83
Abbildung 5.16 Übersicht der Klonierung von HcPT-1	86
Abbildung 5.17 Übersicht der Klonierung von HcPT-2	87
Abbildung 5.18 Übersicht der Aminosäure-Sequenzen aller klonierten HcPT-2-Konstrukte	89
Abbildung 5.19 Alignment zum Aminosäure-Sequenzvergleich von ausgewählten AS-PTs	90
Abbildung 5.20 Übersicht der Verkürzung – Klonierung von HpPT-1_oT	92
Abbildung 5.21 Übersicht der Klonierung von HpPT-2	93
Abbildung 5.22 Übersicht der Transkript-Verlängerung durch RACE-PCR und Klonierung von HpPT-3	94
Abbildung 5.23 Übersicht der Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-4	95
Abbildung 5.24 Übersicht der Volllänge-Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-5	96
Abbildung 5.25 Übersicht der Volllänge-Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-6	97
Abbildung 5.26 Übersicht der Klonierung von HpPT-8	98
Abbildung 5.27 Übersicht der Klonierung von HpPT-9	99
Abbildung 5.28 SDS-PAGE extrahierter Proteine aus Insektenzellen zur Übersicht und Expressionsanalyse von HcPT-2	100



Abbildung 5.29 Fließschema – Aufbau der nachfolgenden enzymatischen Aktivitätsnachweise aktiver PTs	102
Abbildung 5.30 HPLC-Untersuchung von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in K_3PO_4 -Puffer	104
Abbildung 5.31 MS-Analyse des Produktes „P1“ von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in K_3PO_4 -Puffer	105
Abbildung 5.32 Vergleich der ermittelten 1H -NMR-Daten für 1,3,6,7-TH8PX mit Literaturwerten	106
Abbildung 5.33 Einfluss divalenter Kationen auf die Aktivität von HcPT	106
Abbildung 5.34 Bestimmung der relativen Enzymaktivität von HcPT bei variablen Inkubationsbedingungen	107
Abbildung 5.35 Untersuchung der Enzymkinetik von HcPT	108
Abbildung 5.36 HPLC-Untersuchung von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	109
Abbildung 5.37 MS-Analyse des Produktes „P2“ von HcPT mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	110
Abbildung 5.38 Identitätsvergleich der ermittelten 1H -NMR-Daten für Patulon aus <i>H. calycinum</i> -Zellkultur mit Literaturwerten	111
Abbildung 5.39 HPLC-Untersuchung von HcPT mit 1,3,7-THX und DMAPP in K_3PO_4 -Puffer	112
Abbildung 5.40 HPLC-Untersuchung von HcPT mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	113
Abbildung 5.41 HPLC-Untersuchung von HcPT-2 mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	115
Abbildung 5.42 HPLC-Untersuchung von HcPT-2 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	116
Abbildung 5.43 HPLC-Untersuchung von HpPT-2 mit PIBP und DMAPP oder GPP in TRIS-HCl-Puffer	119
Abbildung 5.44 MS-Analyse des Produktes „P2“ von HpPT-2 mit PIBP und GPP in TRIS-HCl-Puffer	121
Abbildung 5.45 HPLC-Untersuchung von HpPT-6 mit bereits von HpPT-2 prenyliertem PIBP und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	123
Abbildung 5.46 HPLC-Untersuchung von HpPT-5 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl-Puffer	124
Abbildung 6.1 Einteilung von Sekundärstoffwechsel-Prenyltransferasen	126
Abbildung 6.2 Illustration hochkonservierter Aspartat-reicher Motive von publizierten pflanzlichen AS-PTs und klonierten Johanniskraut-AS-PTs aus der vorliegenden Arbeit im Aminosäure-Sequenzvergleich	128
Abbildung 6.3 Vergleich Baculovirus-infizierter Sf9-Zellkulturen mit eGFP und HcPT-2	133
Abbildung 6.4 Erster Schritt der Hyperforin-Biosynthese: Bildung des aromatischen Grundgerüsts	135
Abbildung 6.5 Vorschlag eines möglichen Metabolons zur schrittweisen Biosynthese von Hyperforin	137
Abbildung 6.6 Aminosäure-Sequenzvergleich von pilzlicher AnaPT mit pflanzlichen, PIBP-umsetzenden AS-PTs	138
Abbildung 6.7 Alternative zweite Abschnitte der Hyperforin-Biosynthese	140
Abbildung 6.8 Vorschlag des möglichen Biosyntheseweges von Hyperforin	141
Abbildung 6.9 Auswahl nachgewiesener Bioaktivitäten von (prenylierten) pflanzlichen Xanthonen	142
Abbildung 6.10 Dihydropyrano- bzw. 2H-Pyranoxanone aus <i>Hypericum</i> -Arten	143
Abbildung 6.11 Ausgewählte Strukturformeln als Beispiele diprenylierter Xanthone aus <i>Hypericum</i> -Arten	144
Abbildung 6.12 Alignment zum Aminosäure-Sequenzvergleich einer echten pflanzlichen FPP-Synthase und HpPT-1	149

8.3. Formeln

Formel 4.1 Berechnung der Proteinkonzentration	58
Formel 5.1 Sättigungsfunktion eines Enzyms nach der Michaelis-Menten-Beziehung	108



8.4. Tabellen

Tabelle 1.1 Übersicht ausgewählter, bioaktiver pflanzlicher PPAPs	6
Tabelle 4.1 Getestete DC-Fließmittel zur Untersuchung und Identifizierung von PIBP	37
Tabelle 4.2 Standard-Konzentrationen von Nukleinsäuren	43
Tabelle 4.3 Standard-Protokoll zur reversen Transkription	43
Tabelle 4.4 Standard-Protokoll zur reversen Transkription (3'-RACE-/5'-RACE)	44
Tabelle 4.5 Standard-Protokoll für die PCR mit Taq-Polymerase	45
Tabelle 4.6 Standard-Protokoll für die PCR mit Proofread-DNA-Polymerasen	46
Tabelle 4.7 Temperatur-Programm für die Touchdown-PCR	47
Tabelle 4.8 Protokoll zum Erzeugen von A-Überhängen am DNA-3'-Ende zur T/A-Klonierung	48
Tabelle 4.9 Protokolle zum Restriktionsverdau von DNA	49
Tabelle 4.10 Protokoll zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA	49
Tabelle 4.11 Pipettierschema und Protokoll zur DNA-Ligation	50
Tabelle 4.12 Zusammensetzung und Anwendung von LB-Agarplatten zur Anzucht von <i>E. coli</i> -Zellen	52
Tabelle 4.13 Protokoll des Bradford-Tests	58
Tabelle 4.14 Zusammensetzung und Variation des Standard-Enzymaktivitäts-Assays	61
Tabelle 4.15 pH-Wert-abhängige Puffersysteme zur Charakterisierung von HcPT	61
Tabelle 4.16 Unterschiedliche HPLC-Methoden zur Analyse von Einzelstoffen und Stoffgemischen	63
Tabelle 4.17 Einstellungen für die MS-Analytik	64
Tabelle 5.1 Trefferliste der cDNA-Suche in einem vorläufigen <i>H. perforatum</i> -Transkriptom des IPK Gatersleben	72
Tabelle 5.2 Ergebnisliste der PT-Sequenz-Suche vor und nach kombinatorischem Transkriptom-Vergleich	73
Tabelle 5.3 Vorhersagen zu Protein-Eigenschaften und dem Verhalten untersuchter PTs aus Johanniskraut	77
Tabelle 5.4 Nomenklatur (alt und neu) der zwölf untersuchten Prenyltransferasen aus <i>Hypericum</i> -Arten	84
Tabelle 5.5 Übersicht der Klonierung von HcPT zur Expression	85
Tabelle 5.6 Übersicht der Verkürzung – Klonierung von HcPT-2 _{oT}	87
Tabelle 5.7 Übersicht der Klonierung von HcPT-2-GFP / HcPT-2 _{oT} -GFP zur Expression und Lokalisierung	88
Tabelle 5.8 Übersicht der HpPT-1-Suche und Verlängerung durch RACE-Klonierungen	91
Tabelle 5.9 Übersicht der Klonierung von HpPT-1 zur Expression	91
Tabelle 5.10 Übersicht der Sequenzbestätigung und Klonierung von HpPT-7 zur Expression	97
Tabelle 5.11 Aktivitätsübersicht rekombinanter Johanniskraut-PTs aus Hefezellen, getestet mit ausgewählten Prenylakzeptoren	101
Tabelle 5.12 Aktivitätsübersicht rekombinanter Johanniskraut-PTs aus Insektenzellen	102
Tabelle 5.13 Übersicht der von HcPT mit DMAPP umgesetzten Substrate	103
Tabelle 5.14 Übersicht der von HcPT-1 mit DMAPP umgesetzten Substrate	114
Tabelle 5.15 Übersicht der von HcPT-2 mit DMAPP umgesetzten Substrate	114
Tabelle 5.16 Übersicht der von HpPT-1 mit DMAPP umgesetzten Substrate	117
Tabelle 5.17 Übersicht des von HpPT-2 mit DMAPP oder GPP umgesetzten Substrates	118
Tabelle 5.18 Übersicht der von HpPT-6 mit DMAPP umgesetzten Substrate bzw. vermutlichen Produkte von HpPT-2	122
Tabelle 5.19 Übersicht der von HpPT-5 mit DMAPP umgesetzten Substrate	124
Tabelle 5.20 Übersicht der von HpPT-8 mit DMAPP umgesetzten Substrate	125
Tabelle 6.1 Für und Wider einer Beteiligung von MPAP-Strukturen an der Hyperforin-Biosynthese	136
Tabelle 6.2 Übersicht der MPGR-BLAST-Ergebnisse von Xanthon-assoziierten AS-PTs aus <i>H. perforatum</i>	148



9 LITERATUR

- [1] I. P. Singh, S. B. Bharate. Phloroglucinol compounds of natural origin. *Nat. Prod. Rep.* **2006**, *23*, 558.
- [2] T. Hartmann. From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 2831.
- [3] I. P. Singh, J. Sidana, P. Bansal, W. J. Foley. Phloroglucinol compounds of therapeutic interest: global patent and technology status. *Expert Opin. Ther. Pat.* **2009**, *19*, 847.
- [4] P. M. Dewick. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. Wiley, A John Wiley And Sons, Ltd., Publication, Chichester, West Sussex, United Kingdom, **2009**.
- [5] A. J. Birch. Biosynthesis of polyketides and related compounds. *Science* **1967**, *156*, 202.
- [6] A. J. Birch, Biosynthetic relations of some natural phenolic and enolic compounds, in *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, (Ed: L. Zechmeister). Springer Vienna, Vienna, **1957**, pp. 186–216.
- [7] A. J. Birch, F. W. Donovan. Studies in relation to biosynthesis. I. Some possible routes to derivatives of orcinol and phloroglucinol. *Aust. J. Chem.* **1953**, *6*, 360.
- [8] C. Hertweck. Die biosynthetische Grundlage der Polyketid-Vielfalt. *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 4782.
- [9] J. Staunton, K. J. Weissman. Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 380.
- [10] M. B. Austin, J. P. Noel. The chalcone synthase superfamily of type III polyketide synthases. *Nat. Prod. Rep.* **2003**, *20*, 79.
- [11] J. M. Jez, M. E. Bowman, J. P. Noel. Expanding the biosynthetic repertoire of plant type III polyketide synthases by altering starter molecule specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 5319.
- [12] G. Franklin, L. F. R. Conceição, E. Kombrink, A. C. P. Dias. Xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* cells provides antioxidant and antimicrobial protection upon biotic stress. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 60.
- [13] W. Schmidt, L. Beerhues. Alternative pathways of xanthone biosynthesis in cell cultures of *Hypericum androsaemum* L. *FEBS Lett.* **1997**, *420*, 143.
- [14] G. J. Bennett, H.-H. Lee. Xanthenes from Guttiferae. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 967.
- [15] I. Carpenter, H. D. Locksley, F. Scheinmann. Xanthenes in higher plants: biogenetic proposals and a chemotaxonomic survey. *Phytochemistry* **1969**, *8*, 2013.
- [16] B. Winkel-Shirley. Flavonoid biosynthesis. a colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol.* **2001**, *126*, 485.
- [17] R. E. Koes, F. Quattrocchio, J. N. M. Mol. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* **1994**, *16*, 123.
- [18] J. B. Harborne, Ed. . *The Flavonoids: Advances in Research since 1980*. Chapman And Hall, London; New York, **1988**.
- [19] X.-W. Yang, M.-M. Li, X. Liu, D. Ferreira, Y. Ding, J.-J. Zhang, Y. Liao, H.-B. Qin, G. Xu. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol congeners possessing diverse structures from *Hypericum henryi*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 885.
- [20] J.-A. Richard, R. H. Pouwer, D. Y.-K. Chen. Die Chemie der polycyclischen polyprenylierten Acylphloroglucine. *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 4612.
- [21] M. Dakanali, E. A. Theodorakis, Polyprenylated phloroglucinols and xanthenes, in *Biomimetic Organic Synthesis*, (Eds: E. Poupon, B. Nay). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany, **2011**, pp. 433–467.
- [22] R. Ciochina, R. B. Grossman. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3963.
- [23] S. Baggett, P. Protiva, E. P. Mazzola, H. Yang, E. T. Ressler, M. J. Basile, I. B. Weinstein, E. J. Kennelly. Bioactive benzophenones from *Garcinia xanthochymus* fruits. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 354.
- [24] G. Xu, W. L. T. Kan, Y. Zhou, J.-Z. Song, Q.-B. Han, C.-F. Qiao, C.-H. Cho, J. A. Rudd, G. Lin, H.-X. Xu. Cytotoxic acylphloroglucinol derivatives from the twigs of *Garcinia cowa*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 104.

- [25] J. Lokvam, J. F. Braddock, P. B. Reichardt, T. P. Clausen. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry* **2000**, *55*, 29.
- [26] A. L. Piccinelli, O. Cuesta-Rubio, M. B. Chica, N. Mahmood, B. Pagano, M. Pavone, V. Barone, L. Rastrelli. Structural revision of clusianone and 7-*epi*-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 8206.
- [27] N. Tanaka, Y. Takaishi, Y. Shikishima, Y. Nakanishi, K. Bastow, K.-H. Lee, G. Honda, M. Ito, Y. Takeda, O. K. Kodzhimatov, O. Ashurmetov. Prenylated benzophenones and xanthenes from *Hypericum scabrum*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1870.
- [28] I. O. Pereira, M. J. Marques, A. L. R. Pavan, B. S. Codonho, C. L. Barbiéri, L. A. Beijo, A. C. Doriguetto, E. C. D’Martin, M. H. dos Santos. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. *Phytomedicine* **2010**, *17*, 339.
- [29] T. M. de Almeida Alves, R. de Oliveira Alves, A. J. Romanha, C. L. Zani, M. H. dos Santos, T. J. Nagem. Biological activities of 7-*epi*-clusianone. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 369.
- [30] N. S. Simpkins, F. Holtrup, V. Rodeschini, J. D. Taylor, R. Wolf. Comparison of the cytotoxic effects of enantiopure PPAPs, including nemorosone and clusianone. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 6144.
- [31] G. Marti, V. Eparvier, C. Moretti, S. Susplugas, S. Prado, P. Grellier, P. Retailleau, F. Guéritte, M. Litaudon. Antiplasmodial benzophenones from the trunk latex of *Moronobea coccinea* (Clusiaceae). *Phytochemistry* **2009**, *70*, 75.
- [32] L.-J. Zhang, C.-T. Chiou, J.-J. Cheng, H.-C. Huang, L.-M. Y. Kuo, C.-C. Liao, K. F. Bastow, K.-H. Lee, Y.-H. Kuo. Cytotoxic polyisoprenyl benzophenonoids from *Garcinia subelliptica*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 557.
- [33] C.-C. Wu, J.-R. Weng, S.-J. Won, C.-N. Lin. Constituents of the pericarp of *Garcinia subelliptica*. *J. Nat. Prod.* **2005**, *68*, 1125.
- [34] J. S. Costa Júnior, A. A. C. de Almeida, A. de B. F. Ferraz, R. R. Rossatto, T. G. Silva, P. B. N. Silva, G. C. G. Militão, A. M. das G. L. Citó, L. C. L. R. Santana, F. A. de A. Carvalho, R. M. Freitas. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Nat. Prod. Res.* **2013**, *27*, 470.
- [35] C.-N. Lin, J.-P. Wang, J.-R. Weng. Anti-inflammatory and cure for ageing, Alzheimer’s disease on phloroglucinol derivatives. US2006020580A1, **2006**.
- [36] J.-R. Weng, L.-T. Tsao, J.-P. Wang, R.-R. Wu, C.-N. Lin. Anti-inflammatory phloroglucinols and terpenoids from *Garcinia subelliptica*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 1796.
- [37] M. Iinuma, H. Tosa, T. Tanaka, S. Kanamaru, F. Asai, Y. Kobayashi, K. Miyauchi, R. Shimano. Antibacterial activity of some *Garcinia* benzophenone derivatives against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol. Pharm. Bull.* **1996**, *19*, 311.
- [38] H. Tosa, M. Iinuma, T. Tanaka, H. Nozaki, S. Ikeda, K. Tsutsui, K. Tsutusi, M. Yamada, S. Fujimori. Inhibitory activity of xanthone derivatives isolated from some Guttiferaeous plants against DNA Topoisomerases I and II. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1997**, *45*, 418.
- [39] C. Ito, M. Itoigawa, Y. Miyamoto, S. Onoda, K. S. Rao, T. Mukainaka, H. Tokuda, H. Nishino, H. Furukawa. Polyisoprenylated benzophenones from *Garcinia assigu* and their potential cancer chemopreventive activities. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 206.
- [40] F. Yamaguchi, T. Ariga, Y. Yoshimura, H. Nakazawa. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 180.
- [41] F. Yamaguchi, M. Saito, T. Ariga, Y. Yoshimura, H. Nakazawa. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 2320.
- [42] A. Ahmad, S. H. Sarkar, B. Bitar, S. Ali, A. Aboukameel, S. Sethi, Y. Li, B. Bao, D. Kong, S. Banerjee, S. B. Padhye, F. H. Sarkar. Garcinol regulates EMT and WNT signaling pathways *in vitro* and *in vivo*, leading to anticancer activity against breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 2193.
- [43] M. A. Parasramka, S. V. Gupta. Synergistic effect of garcinol and curcumin on antiproliferative and apoptotic activity in pancreatic cancer cells. *J. Oncol.* **2012**, *2012*, 1.
- [44] S. Sang, C.-H. Liao, M.-H. Pan, R. T. Rosen, S.-Y. Lin-Shiau, J.-K. Lin, C.-T. Ho. Chemical studies on antioxidant mechanism of garcinol: analysis of radical reaction products of garcinol with peroxy radicals and their antitumor activities. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 10095.



- [45] J.-R. Weng, C.-N. Lin, L.-T. Tsao, J.-P. Wang. Novel and anti-inflammatory constituents of *Garcinia subelliptica*. *Chem. - Eur. J.* **2003**, *9*, 1958.
- [46] Y. Fukuyama, A. Kuwayama, H. Minami. Garsubellin A, a novel polyprenylated phloroglucin derivative, increasing choline acetyltransferase (ChAT) activity in postnatal rat septal neuron cultures. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1997**, *45*, 947.
- [47] L. Monzote, O. Cuesta-Rubio, A. Matheussen, T. Van Assche, L. Maes, P. Cos. Antimicrobial evaluation of the polyisoprenylated benzophenones nemorosone and guttiferone A: antimicrobial evaluation of polyisoprenylated benzophenones. *Phytother. Res.* **2011**, n/a.
- [48] S. Ngouela, B. N. Lenta, D. T. Nounogue, J. Ngoupayo, F. F. Boyom, E. Tsamo, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. D. Connolly. Anti-plasmodial and antioxidant activities of constituents of the seed shells of *Symphonia globulifera* Linn f. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 302.
- [49] F. Abe, S. Nagafuji, H. Okabe, H. Akahane, E. Estrada-Muñiz, M. Huerta-Reyes, R. Reyes-Chilpa. Trypanocidal constituents in plants 3. Leaves of *Garcinia intermedia* and heartwood of *Calophyllum brasiliense*. *Biol. Pharm. Bull.* **2004**, *27*, 141.
- [50] U. M. Acuña, M. Figueroa, A. Kavalier, N. Jancovski, M. J. Basile, E. J. Kennelly. Benzophenones and biflavonoids from *Rheedia edulis*. *J. Nat. Prod.* **2010**, *73*, 1775.
- [51] R. W. Fuller, J. W. Blunt, J. L. Boswell, J. H. Cardellina, M. R. Boyd. Guttiferone F, the first prenylated benzophenone from *Allanblackia stuhlmannii*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 130.
- [52] K. R. Gustafson, J. W. Blunt, M. H. G. Munro, R. W. Fuller, T. C. McKee, J. H. Cardellina, J. B. McMahon, G. M. Cragg, M. R. Boyd. The guttiferones, HIV-inhibitory benzophenones from *Symphonia globulifera*, *Garcinia livingstonei*, *Garcinia ovalifolia* and *Clusia rosea*. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 10093.
- [53] P. Protiva, M. E. Hopkins, S. Baggett, H. Yang, M. Lipkin, P. R. Holt, E. J. Kennelly, W. I. Bernard. Growth inhibition of colon cancer cells by polyisoprenylated benzophenones is associated with induction of the endoplasmic reticulum response. *Int. J. Cancer* **2008**, *123*, 687.
- [54] R. B. Williams, J. Hoch, T. E. Glass, R. Evans, J. S. Miller, J. H. Wisse, D. G. Kingston. A novel cytotoxic guttiferone analogue from *Garcinia macrophylla* from the Suriname rainforest. *Planta Med.* **2003**, *69*, 864.
- [55] H. Zhu, C. Chen, J. Liu, B. Sun, G. Wei, Y. Li, J. Zhang, G. Yao, Z. Luo, Y. Xue, Y. Zhang. Hyperascyrones A–H, polyprenylated spirocyclic acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum ascyron* Linn. *Phytochemistry* **2015**, *115*, 222.
- [56] K. Šavikin-Fodulović, I. Aljančić, V. Vajs, N. Menković, S. Macura, G. Gojgić, S. Milosavljević. Hyperatomarin, an antibacterial prenylated phloroglucinol from *Hypericum atomarium* ssp. *degenii*. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 1236.
- [57] G. Momekov, D. Ferdinandov, D. Zheleva-Dimitrova, P. Nedialkov, U. Girreser, G. Kitanov. Cytotoxic effects of hyperatomarin, a prenylated phloroglucinol from *Hypericum annulatum* Moris subsp. *annulatum*, in a panel of malignant cell lines. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 1010.
- [58] D. Li, H. Zhu, C. Qi, Y. Xue, G. Yao, Z. Luo, J. Wang, J. Zhang, G. Du, Y. Zhang. Two new adamantyl-like polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum attenuatum* choisy. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 1953.
- [59] X.-W. Yang, J. Yang, Y. Liao, Y. Ye, Y.-P. Li, S.-Y. Yang, F. Xia, G. Xu. Hypercohin K, a polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol with an unusual spiro-fused cyclopropane ring from *Hypericum cohaerens*. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 5537.
- [60] J.-A. Richard. Chemistry and biology of the polycyclic polyprenylated acylphloroglucinol hyperforin: chemistry and biology of hyperforin. *Eur. J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 273.
- [61] J. Heilmann, K. Winkelmann, O. Sticher. Studies on the antioxidative activity of phloroglucinol derivatives isolated from *Hypericum* species. *Planta Med.* **2003**, *69*, 202.
- [62] H. Zhu, C. Chen, Q. Tong, X. Chen, J. Yang, J. Liu, B. Sun, J. Wang, G. Yao, Z. Luo, Y. Xue, Y. Zhang. Hyperisampsins H–M, cytotoxic polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum sampsonii*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 14772.
- [63] W.-J. Xu, M.-D. Zhu, X.-B. Wang, M.-H. Yang, J. Luo, L.-Y. Kong. Hypermongones A–J, rare methylated polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols from the flowers of *Hypericum monogynum*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 1093.

- [64] Y.-L. Lin, Y.-S. Wu. Polyprenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Helv. Chim. Acta* **2003**, *86*, 2156.
- [65] Y. Liao, X. Liu, J. Yang, Y.-Z. Lao, X.-W. Yang, X.-N. Li, J.-J. Zhang, Z. Ding, H.-X. Xu, G. Xu. Hypersubones A and B, new polycyclic acylphloroglucinols with intriguing adamantane type cores from *Hypericum subsessile*. *Org. Lett.* **2015**, *17*, 1172.
- [66] J.-J. Zhang, X.-W. Yang, X. Liu, J.-Z. Ma, Y. Liao, G. Xu. 1,9-*seco*-Bicyclic polyprenylated acylphloroglucinols from *Hypericum uralum*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 3075.
- [67] K. Winkelmann, J. Heilmann, O. Zerbe, T. Rali, O. Sticher. New phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 104.
- [68] H. R. Bokesch, A. Groweiss, T. C. McKee, M. R. Boyd. Laxifloranone, a new phloroglucinol derivative from *Marila laxiflora*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1197.
- [69] D. Díaz-Carballo, S. Gustmann, A. H. Acikelli, W. Bardenheuer, H. Buehler, H. Jastrow, S. Ergun, D. Strumberg. 7-*epi*-nemorosone from *Clusia rosea* induces apoptosis, androgen receptor down-regulation and dysregulation of PSA levels in LNCaP prostate carcinoma cells. *Phytomedicine* **2012**, *19*, 1298.
- [70] D. Díaz-Carballo, K. Überla, V. Kleff, S. Ergun, S. Malak, M. Freistühler, S. Somogyi, C. Kücherer, W. Bardenheuer, D. Strumberg. Antiretroviral activity of two polyisoprenylated acylphloroglucinols, 7-*epi*-nemorosone and plukenetione A, isolated from Caribbean propolis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2010**, *48*, 670.
- [71] A. Popolo, A. L. Piccinelli, S. Morello, R. Sorrentino, C. R. Osmany, L. Rastrelli, P. Aldo. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **2011**, *89*, 50.
- [72] D. Díaz-Carballo, S. Malak, W. Bardenheuer, M. Freistühler, H. P. Reusch. Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. *J. Cell. Mol. Med.* **2008**, *12*, 2598.
- [73] D. Díaz-Carballo, S. Malak, M. Freistühler, A. Elmaagacli, W. Bardenheuer, H. P. Reusch. Nemorosone blocks proliferation and induces apoptosis in leukemia cells. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* **2008**, *46*, 428.
- [74] O. Cuesta-Rubio, B. A. Frontana-Urbe, T. Ramírez-Apan, J. Cárdenas. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis: biological activity of nemorosone. *Z. Für Naturforschung C J. Biosci.* **2002**, *57*, 372.
- [75] N. M. R. Hernandez, O. Cuesta-Rubio, A. Avilés, D. L. S. Avellanede. Actividad antimicrobiana de nemorosona aislada de *Clusia rosea*. *Rev Cuba. Farm* **2001**, *35*, 197.
- [76] K. Winkelmann, J. Heilmann, O. Zerbe, T. Rali, O. Sticher. New prenylated bi- and tricyclic phloroglucinol derivatives from *Hypericum papuanum*. *J. Nat. Prod.* **2001**, *64*, 701.
- [77] O. Cuesta-Rubio, A. Cuellar, N. Rojas, H. V. Castro, L. Rastrelli, R. Aquino. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban propolis. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 1013.
- [78] L.-H. Hu, K.-Y. Sim. Sampsoniones A–M, a unique family of caged polyprenylated benzoylphloroglucinol derivatives from *Hypericum sampsonii*. *Tetrahedron* **2000**, *56*, 1379.
- [79] G. Marti, V. Eparvier, C. Moretti, S. Prado, P. Grellier, N. Hue, O. Thoison, B. Delpech, F. Guéritte, M. Litaudon. Antiplasmodial benzophenone derivatives from the root barks of *Symphonia globulifera* (Clusiaceae). *Phytochemistry* **2010**, *71*, 964.
- [80] R. W. Fuller, C. K. Westergaard, J. W. Collins, J. H. Cardellina, M. R. Boyd. Vismiaphenones D–G, new prenylated benzophenones from *Vismia cayennensis*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 67.
- [81] N. S. Bystrov, B. K. Chernov, V. N. Dobrynin, M. N. Kolosov. The structure of hyperforin. *Tetrahedron Lett.* **1975**, *16*, 2791.
- [82] A. I. Gurevich, V. N. Dobrynin, M. N. Kolosov, S. A. Popravko, I. D. Riabova. Antibiotic hyperforin from *Hypericum perforatum* L. *Antibiotiki* **1971**, *16*, 510.
- [83] D. Hölscher, R. Shroff, K. Knop, M. Gottschaldt, A. Crecelius, B. Schneider, D. G. Heckel, U. S. Schubert, A. Svatoš. Matrix-free UV-laser desorption/ionization (LDI) mass spectrometric imaging at the single-cell level: distribution of secondary metabolites of *Arabidopsis thaliana* and *Hypericum* species. *Plant J.* **2009**, *60*, 907.
- [84] J. Soelberg, L. B. Jørgensen, A. K. Jäger. Hyperforin accumulates in the translucent glands of *Hypericum perforatum*. *Ann. Bot.* **2007**, *99*, 1097.



- [85] P. Avato, A survey on the *Hypericum* genus: secondary metabolites and bioactivity, in *Studies in Natural Products Chemistry*. Elsevier, **2005**, pp. 603–634.
- [86] D. Tekel'ová, M. Repcák, E. Zemková, J. Tóth. Quantitative changes of dianthrone, hyperforin and flavonoids content in the flower ontogenesis of *Hypericum perforatum*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 778.
- [87] E. C. Tatsis, S. Boeren, V. Exarchou, A. N. Troganis, J. Vervoort, I. P. Gerathanassis. Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS. *Phytochemistry* **2007**, *68*, 383.
- [88] H. Koyu, M. Z. Haznedaroglu. Investigation of impact of storage conditions on *Hypericum perforatum* L. dried total extract. *J. Food Drug Anal.* **2015**, *23*, 545.
- [89] C. Y. W. Ang, L. Hu, T. M. Heinze, Y. Cui, J. P. Freeman, K. Kozak, W. Luo, F. F. Liu, A. Mattia, M. DiNovi. Instability of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.) and degradation of hyperforin in aqueous solutions and functional beverage. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6156.
- [90] L. Verotta. Are acylphloroglucinols lead structures for the treatment of degenerative diseases? *Phytochem. Rev.* **2002**, *1*, 389.
- [91] C. Zeng, F. Tian, B. Xiao. TRPC channels: prominent candidates of underlying mechanism in neuropsychiatric diseases. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 631.
- [92] K. Friedland, C. Harteneck, Hyperforin: to be or not to be an activator of TRPC(6), in *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology Vol. 169*, (Eds: B. Nilius, T. Gudermann, R. Jahn, R. Lill, O.H. Petersen, P.P. de Tombe). Springer International Publishing, Cham, **2015**, pp. 1–24.
- [93] M. Zhu, C. Liu, X. Qin, Z. Yang. Hyperforin alleviates mood deficits of adult rats suffered from early separation. *Neurosci. Lett.* **2015**, *608*, 1.
- [94] K. Leuner, W. Li, M. D. Amaral, S. Rudolph, G. Calfa, A. M. Schuwald, C. Harteneck, T. Inoue, L. Pozzo-Miller. Hyperforin modulates dendritic spine morphology in hippocampal pyramidal neurons by activating Ca²⁺-permeable TRPC6 channels. *Hippocampus* **2013**, *23*, 40.
- [95] K. Leuner, V. Kazanski, M. Müller, K. Essin, B. Henke, M. Gollasch, C. Harteneck, W. E. Müller. Hyperforin a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J.* **2007**, *21*, 4101.
- [96] B. I. P. Schiavone, L. Verotta, A. Rosato, M. Marilena, S. Gibbons, E. Bombardelli, C. Franchini, F. Corbo. Anticancer and antibacterial activity of hyperforin and its derivatives. *Anticancer Agents Med. Chem.* **2014**, *14*, 1397.
- [97] B. I. P. Schiavone, A. Rosato, M. Marilena, S. Gibbons, E. Bombardelli, L. Verotta, C. Franchini, F. Corbo. Biological evaluation of hyperforin and its hydrogenated analogue on bacterial growth and biofilm production. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76*, 1819.
- [98] P. Avato, F. Raffo, G. Guglielmi, C. Vitali, A. Rosato. Extracts from St John's wort and their antimicrobial activity. *Phytother. Res.* **2004**, *18*, 230.
- [99] C. M. Schempp, K. Pelz, A. Wittmer, E. Schöpf, J. C. Simon. Antibacterial activity of hyperforin from St. John's wort, against multiresistant *Staphylococcus aureus* and gram-positive bacteria. *Lancet Lond. Engl.* **1999**, *353*, 2129.
- [100] M. Novelli, P. Befly, M. Menegazzi, V. De Tata, L. Martino, A. Sgarbossa, S. Porozov, A. Pippa, M. Masini, P. Marchetti, P. Masiello. St. John's wort extract and hyperforin protect rat and human pancreatic islets against cytokine toxicity. *Acta Diabetol.* **2014**, *51*, 113.
- [101] A. Cabrelle, I. Dell'Aica, L. Melchiori, S. Carraro, E. Brunetta, R. Niero, E. Scquizzato, G. D'Intino, L. Calza, S. Garbisa, C. Agostini. Hyperforin down-regulates effector function of activated T lymphocytes and shows efficacy against Th1-triggered CNS inflammatory-demyelinating disease. *J. Leukoc. Biol.* **2007**, *83*, 212.
- [102] C. Feißt, O. Werz. Suppression of receptor-mediated Ca²⁺ mobilization and functional leukocyte responses by hyperforin. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *67*, 1531.
- [103] D. Albert, I. Zündorf, T. Dingermann, W. E. Müller, D. Steinhilber, O. Werz. Hyperforin is a dual inhibitor of cyclooxygenase-1 and 5-lipoxygenase. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, *64*, 1767.
- [104] Y. Lin, J.-C. Zhang, J. Fu, F. Chen, J. Wang, Z.-L. Wu, S.-Y. Yuan. Hyperforin attenuates brain damage induced by transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats via inhibition of TRPC6 channels degradation. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **2013**, *33*, 253.

- [105] T. Griffith, L. Varela-Nallar, M. Dinamarca, N. Inestrosa. Neurobiological effects of hyperforin and its potential in Alzheimer's disease therapy. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 391.
- [106] M. C. Dinamarca, W. Cerpa, J. Garrido, J. L. Hancke, N. C. Inestrosa. Hyperforin prevents β -amyloid neurotoxicity and spatial memory impairments by disaggregation of Alzheimer's amyloid- β -deposits. *Mol. Psychiatry* **2006**, *11*, 1032.
- [107] F. Merhi, R. Tang, M. Piedfer, J. Mathieu, I. Bombarda, M. Zaher, J.-P. Kolb, C. Billard, B. Bauvois. Hyperforin inhibits Akt1 kinase activity and promotes caspase-mediated apoptosis involving bad and noxa activation in human myeloid tumor cells. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e25963.
- [108] M. Müller, K. Essin, K. Hill, H. Beschmann, S. Rubant, C. M. Schempp, M. Gollasch, W. H. Boehncke, C. Harteneck, W. E. Müller, K. Leuner. Specific TRPC6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33942.
- [109] M. A. Medina, B. Martínez-Poveda, M. I. Amores-Sánchez, A. R. Quesada. Hyperforin: more than an antidepressant bioactive compound? *Life Sci.* **2006**, *79*, 105.
- [110] K. Wiechmann, H. Müller, D. Fischer, J. Jauch, O. Werz. The acylphloroglucinols hyperforin and myrtucommulone A cause mitochondrial dysfunctions in leukemic cells by direct interference with mitochondria. *Apoptosis* **2015**, *20*, 1508.
- [111] C. Billard, F. Merhi, B. Bauvois. Mechanistic insights into the antileukemic activity of hyperforin. *Curr. Cancer Drug Targets* **2013**, *13*, 1.
- [112] C. Quiney, C. Billard, A.-M. Faussat, C. Salanoubat, J.-P. Kolb. Hyperforin inhibits P-gp and BCRP activities in chronic lymphocytic leukaemia cells and myeloid cells. *Leuk. Lymphoma* **2007**, *48*, 1587.
- [113] C. Quiney, C. Billard, A. M. Faussat, C. Salanoubat, A. Ensaf, Y. Naït-Si, J. D. Fourneron, J.-P. Kolb. Pro-apoptotic properties of hyperforin in leukemic cells from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* **2006**, *20*, 491.
- [114] M. Dona. Hyperforin inhibits cancer invasion and metastasis. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 6225.
- [115] J.-Y. Liu, Z. Liu, D.-M. Wang, M.-M. Li, S.-X. Wang, R. Wang, J.-P. Chen, Y.-F. Wang, D.-P. Yang. Induction of apoptosis in K562 cells by dicyclohexylammonium salt of hyperforin through a mitochondrial-related pathway. *Chem. Biol. Interact.* **2011**, *190*, 91.
- [116] C. Gey, S. Kyrlyenko, L. Hennig, L.-H. D. Nguyen, A. Büttner, H. D. Pham, A. Giannis. Phloroglucinol-derivate Guttiferon G, Aristoforin und Hyperforin: Inhibitoren der menschlichen Sirtuine SIRT1 und SIRT2. *Angew. Chem.* **2007**, *119*, 5311.
- [117] C. M. Schempp, V. Kirkin, B. Simon-Haarhaus, A. Kersten, J. Kiss, C. C. Termeer, B. Gilb, T. Kaufmann, C. Borner, J. P. Sleeman, J. C. Simon. Inhibition of tumour cell growth by hyperforin, a novel anticancer drug from St. John's wort that acts by induction of apoptosis. *Oncogene* **2002**, *21*, 1242.
- [118] I. Dell'Aica, R. Niero, F. Piazza, A. Cabrelle, L. Sartor, C. Colalto, E. Brunetta, G. Lorusso, R. Benelli, A. Albini, F. Calabrese, C. Agostini, S. Garbisa. Hyperforin blocks neutrophil activation of matrix metalloproteinase-9, motility and recruitment, and restrains inflammation-triggered angiogenesis and lung fibrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *321*, 492.
- [119] B. Martínez-Poveda, A. R. Quesada, M. Á. Medina. Hyperforin, a bio-active compound of St. John's wort, is a new inhibitor of angiogenesis targeting several key steps of the process. *Int. J. Cancer* **2005**, *117*, 775.
- [120] C. M. Schempp, J. Kiss, V. Kirkin, M. Averbeck, B. Simon-Haarhaus, B. Kremer, C. C. Termeer, J. Sleeman, J. C. Simon. Hyperforin acts as an angiogenesis inhibitor. *Planta Med.* **2005**, *71*, 999.
- [121] K. P. Mitsopoulou, V. P. Vidali, G. Koliopoulos, E. A. Couladouros, A. Michaelakis. Hyperforin and deoxycohumulone as a larvicidal agent against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Chemosphere* **2014**, *100*, 124.
- [122] L. Verotta, G. Appendino, E. Bombardelli, R. Brun. *In vitro* antimalarial activity of hyperforin, a prenylated acylphloroglucinol. A structure-activity study. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 1544.
- [123] R. Nosratabadi, M. Rastin, M. Sankian, D. Haghmorad, N. Tabasi, S. Zamani, A. Aghaee, Z. Salehipour, M. Mahmoudi. St. John's wort and its component hyperforin alleviate experimental autoimmune encephalomyelitis through expansion of regulatory T-cells. *J. Immunotoxicol.* **2015**, *1*.
- [124] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, Eds. . *Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, **2008**.



- [125] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, S. Bladt, H. Wagner. Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med.* **1984**, *50*, 272.
- [126] S. S. Chatterjee, M. Nöldner, E. Koch, C. Erdelmeier. Antidepressant activity of *Hypericum perforatum* and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* **1998**, *31 Suppl 1*, 7.
- [127] K. Treiber, A. Singer, B. Henke, W. E. Müller. Hyperforin activates nonselective cation channels (NSCCs). *Br. J. Pharmacol.* **2005**, *145*, 75.
- [128] A. Singer, M. Wonnemann, W. E. Müller. Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na⁺. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1999**, *290*, 1363.
- [129] W. Müller. Current St. John's wort research from mode of action to clinical efficacy. *Pharmacol. Res.* **2003**, *47*, 101.
- [130] E. Russo, F. Scicchitano, B. J. Whalley, C. Mazzitello, M. Ciriaco, S. Esposito, M. Patanè, R. Upton, M. Pugliese, S. Chimirri, M. Mammì, C. Palleria, G. De Sarro. *Hypericum perforatum*: pharmacokinetic, mechanism of action, tolerability and clinical drug-drug interactions. *Phytother. Res.* **2014**, *28*, 643.
- [131] S. C. Müller, J. Majcher-Peszynska, R. G. Mundkowski, B. Uehleke, S. Klammt, H. Sievers, R. Lehnfeld, B. Frank, K. Thurow, G. Kundt, B. Drewelow. No clinically relevant CYP3A induction after St. John's wort with low hyperforin content in healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **2009**, *65*, 81.
- [132] V. Butterweck. Mechanism of action of St. John's wort in depression: what is known? *CNS Drugs* **2003**, *17*, 539.
- [133] E. Schrader. Equivalence of St. John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression. *Int. Clin. Psychopharmacol.* **2000**, *15*, 61.
- [134] C. Fracasso, R. Bagnati, A. Passoni, G. Guiso, L. Cantoni, A. Riva, P. Morazzoni, M. Gobbi. Brain uptake of tetrahydrohyperforin and potential metabolites after repeated dosing in mice. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 2029.
- [135] B. Martínez-Poveda, L. Verotta, E. Bombardelli, A. R. Quesada, M. Á. Medina. Tetrahydrohyperforin and octahydrohyperforin are two new potent inhibitors of angiogenesis. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e9558.
- [136] B. Bauer, X. Yang, A. M. S. Hartz, E. R. Olson, R. Zhao, J. C. Kalvass, G. M. Pollack, D. S. Miller. *In vivo* activation of human pregnane X receptor tightens the blood-brain barrier to methadone through P-glycoprotein up-regulation. *Mol. Pharmacol.* **2006**, *70*, 1212.
- [137] Y. Chen, S. S. Ferguson, M. Negishi, J. Goldstein. Induction of human CYP2C9 by rifampicin, hyperforin, and phenobarbital is mediated by the pregnane X receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *308*, 495.
- [138] L. B. Moore, B. Goodwin, S. A. Jones, G. B. Wisely, C. J. Serabjit-Singh, T. M. Willson, J. L. Collins, S. A. Kliewer. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 7500.
- [139] H. Gutmann, B. Poller, K. Büter, A. Pfrunder, W. Schaffner, J. Drewe. *Hypericum perforatum*: which constituents may induce intestinal MDR1 and CYP3A4 mRNA expression? *Planta Med.* **2006**, *72*, 685.
- [140] R. E. Watkins, J. M. Maglich, L. B. Moore, G. B. Wisely, S. M. Noble, P. R. Davis-Searles, M. H. Lambert, S. A. Kliewer, M. R. Redinbo. 2.1 Å Crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry (Mosc.)* **2003**, *42*, 1430.
- [141] P. Zanolì, M. Zavatti. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *116*, 383.
- [142] M. Dresel, A. Dunkel, T. Hofmann. Sensomics analysis of key bitter compounds in the hard resin of hops (*Humulus lupulus* L.) and their contribution to the bitter profile of pilsner-type beer. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63*, 3402.
- [143] S. Mizobuchi, Y. Sato. Antifungal activities of hop bitter resins and related compounds. *Agric. Biol. Chem.* **1985**, *49*, 399.
- [144] S. R. Palamand, J. M. Aldenhoff. Bitter tasting compounds of beer. Chemistry and taste properties of some hop resin compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1973**, *21*, 535.
- [145] P. Adam, D. Arigoni, A. Bacher, W. Eisenreich. Biosynthesis of hyperforin in *Hypericum perforatum*. *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 4786.
- [146] F. Drawert, J. Beier. Monoprenylierte Acylphloroglucine. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1695.

- [147] F. Drawert, J. Beier. Aminosäuren als Vorstufe der Acylseitenkette der Hopfenbitterstoffe. *Phytochemistry* **1976**, *15*, 1693.
- [148] F. Drawert, J. Beier. Bildung und Weiterreaktion von Acylvorstufen der Hopfenbitterstoffe. *Phytochemistry* **1974**, *13*, 2149.
- [149] P. Klingauf, T. Beuerle, A. Mellenthin, S. A. M. El-Moghazy, Z. Boubakir, L. Beerhues. Biosynthesis of the hyperforin skeleton in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 139.
- [150] Y. Okada, K. Ito. Cloning and analysis of valerophenone synthase gene expressed specifically in lupulin gland of hop (*Humulus lupulus* L.). *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2001**, *65*, 150.
- [151] H. Li, Z. Ban, H. Qin, L. Ma, A. J. King, G. Wang. A heteromeric membrane-bound prenyltransferase complex from hop catalyzes three sequential aromatic prenylations in the bitter acid pathway. *Plant Physiol.* **2015**, *167*, 650.
- [152] Y. Tsurumaru, K. Sasaki, T. Miyawaki, Y. Uto, T. Momma, N. Umemoto, M. Momose, K. Yazaki. HIPT-1, a membrane-bound prenyltransferase responsible for the biosynthesis of bitter acids in hops. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *417*, 393.
- [153] K. W. M. Zuurbier, S.-Y. Fung, J. J. C. Scheffer, R. Verpoorte. *In-vitro* prenylation of aromatic intermediates in the biosynthesis of bitter acids in *Humulus lupulus*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 2315.
- [154] S.-Y. Fung, K. W. M. Zuurbier, N. B. Paniego, J. J. C. Scheffer, R. Verpoorte. Conversion of deoxyhumulone into the hop α -acid humulone. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1047.
- [155] O. Cuesta-Rubio, H. Velez-Castro, B. A. Frontana-Urbe, J. Cárdenas. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry* **2001**, *57*, 279.
- [156] C. Hashida, N. Tanaka, Y. Kashiwada, M. Ogawa, Y. Takaishi. Prenylated phloroglucinol derivatives from *Hypericum perforatum* var. *angustifolium*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2008**, *56*, 1164.
- [157] R. B. Grossman, H. Jacobs. On the structures of plukenetiones B, D, and E and their relationships to other polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 5165.
- [158] J. Winkelblech, A. Fan, S.-M. Li. Prenyltransferases as key enzymes in primary and secondary metabolism. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 7379.
- [159] P.-H. Liang, T.-P. Ko, A. H.-J. Wang. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 3339.
- [160] C. C. Palsuledesai, M. D. Distefano. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. *ACS Chem. Biol.* **2015**, *10*, 51.
- [161] U. T. T. Nguyen, R. S. Goody, K. Alexandrov. Understanding and exploiting protein prenyltransferases. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 1194.
- [162] L. Heide. Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 171.
- [163] K. Yazaki, K. Sasaki, Y. Tsurumaru. Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1739.
- [164] H. Schmid. Biochemische Untersuchungen an der Chlorophyll-Synthase aus *Avena sativa*. Ludwig-Maximilians-Universität, München, **2003**.
- [165] T. Kakimoto. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate:ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant Cell Physiol.* **2001**, *42*, 677.
- [166] U. Metzger, C. Schall, G. Zocher, I. Unsöld, E. Stec, S.-M. Li, L. Heide, T. Stehle. The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 14309.
- [167] O. Saleh, Y. Haagen, K. Seeger, L. Heide. Prenyl transfer to aromatic substrates in the biosynthesis of aminocoumarins, meroterpenoids and phenazines: the ABBA prenyltransferase family. *Phytochemistry* **2009**, *70*, 1728.
- [168] K. Yazaki, M. Kunihiya, T. Fujisaki, F. Sato. Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6240.
- [169] R. Munakata, A. Olry, F. Karamat, V. Courdavault, A. Sugiyama, Y. Date, C. Krieger, P. Silie, E. Foureaux, N. Papon, J. Grosjean, K. Yazaki, F. Bourgaud, A. Hehn. Molecular evolution of parsnip (*Pastinaca sativa*) membrane-bound prenyltransferases for linear and/or angular furanocoumarin biosynthesis. *New Phytol.* **2016**, n/a.



- [170] F. Karamat, A. Olry, R. Munakata, T. Koeduka, A. Sugiyama, C. Paris, A. Hehn, F. Bourgaud, K. Yazaki. A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *Plant J.* **2014**, *77*, 627.
- [171] R. Munakata, T. Inoue, T. Koeduka, F. Karamat, A. Olry, A. Sugiyama, K. Takanashi, A. Dugrand, Y. Froelicher, R. Tanaka, Y. Uto, H. Hori, J.-I. Azuma, A. Hehn, et al. Molecular cloning and characterization of a geranyl diphosphate-specific aromatic prenyltransferase from lemon. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 80.
- [172] J. E. Page, Z. Boubakir. Aromatic prenyltransferase from cannabis. US8884100 B2, **2014**.
- [173] R. Wang, R. Chen, J. Li, X. Liu, K. Xie, D. Chen, Y. Yin, X. Tao, D. Xie, J. Zou, L. Yang, J. Dai. Molecular characterization and phylogenetic analysis of two novel regio-specific flavonoid prenyltransferases from *Morus alba* and *Cudrania tricuspidata*. *J. Biol. Chem.* **2014**, *289*, 35815.
- [174] G. Shen, D. Huhman, Z. Lei, J. Snyder, L. W. Sumner, R. A. Dixon. Characterization of an isoflavonoid-specific prenyltransferase from *Lupinus albus*. *Plant Physiol.* **2012**, *159*, 70.
- [175] K. Sasaki, Y. Tsurumaru, H. Yamamoto, K. Yazaki. Molecular characterization of a membrane-bound prenyltransferase specific for isoflavone from *Sophora flavescens*. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 24125.
- [176] T. Akashi, K. Sasaki, T. Aoki, S. -i. Ayabe, K. Yazaki. Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. *PLANT Physiol.* **2009**, *149*, 683.
- [177] K. Sasaki, K. Mito, K. Ohara, H. Yamamoto, K. Yazaki. Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *PLANT Physiol.* **2008**, *146*, 1075.
- [178] W. Eisenreich, A. Bacher, D. Arigoni, F. Rohdich. Biosynthesis of isoprenoids via the non-mevalonate pathway. *Cell. Mol. Life Sci.* **2004**, *61*, DOI 10.1007/s00018-004-3381-z.
- [179] M. Rohmer. The discovery of a mevalonate-independent pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria, algae and higher plants. *Nat. Prod. Rep.* **1999**, *16*, 565.
- [180] J. W. Porter, S. L. Spurgeon, Eds. . *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*. Wiley, New York, **1981**.
- [181] L. D. Wright. Biosynthesis of isoprenoid compounds. *Annu. Rev. Biochem.* **1961**, *30*, 525.
- [182] N. Nürk, F. R. Blattner. Cladistic analysis of morphological characters in *Hypericum* (Hypericaceae). *Taxon* **2010**, *59*, 1495.
- [183] N. Nürk. Phylogenetic analyses in St. John's wort (*Hypericum*) – inferring character evolution and historical biogeography. Freie Universität Berlin, Berlin, **2011**.
- [184] N. K. B. Robson, *Hypericum* botany, in *Hypericum: The Genus Hypericum*, (Ed: E. Ernst). Taylor and Francis, London, New York, **2003**, pp. 1–22.
- [185] C. Jurk. Der niedergeschlagene Mensch. Depression. Eine sozialwissenschaftliche Studie zu Geschichte und gesellschaftlicher Bedeutung einer Diagnose. Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen, **2005**.
- [186] J. G. Mayer. Johanniskraut ist Arzneipflanze des Jahres 2015. can be found under <http://www.presse.uni-wuerzburg.de/einblick/single/artikel/johanniskr/>, **2014**.
- [187] G. Moser. Johanniskraut ist Arzneipflanze des Jahres 2015. *Pharm. Ztg.* **2014**, *159*.
- [188] F.-C. Czygan. Kulturgeschichte und Mystik des Johanniskrauts: Vom 2500 Jahre alten Apotropaikum zum aktuellen Antidepressivum. *Pharm. Unserer Zeit* **2003**, *32*, 184.
- [189] M.-L. Buchholzer. Zentrale cholinerge Wirkungen von Hyperforin, einem Inhaltsstoff des Johanniskrauts. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, **2002**.
- [190] R. Hänsel, O. Sticher, E. Steinegger, Eds. . *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Springer Medizin, Heidelberg, **2010**.
- [191] M. Wichtl, R. Bauer, U. Barthlen, Eds. . *Teedrogen und Phytopharmaka: ein Handbuch für die Praxis auf wissenschaftlicher Grundlage*. Wiss. Verl.-Ges, Stuttgart, **2009**.
- [192] C. A. Erdelmeier. Hyperforin, possibly the major non-nitrogenous secondary metabolite of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* **1998**, *31 Suppl 1*, 2.
- [193] A. Nahrstedt, V. Butterweck. Biologically active and other chemical constituents of the herb of *Hypericum perforatum* L. *Pharmacopsychiatry* **1997**, *30 Suppl 2*, 129.

- [194] A. Umek, S. Kreft, T. Kartnig, B. Heydel. Quantitative phytochemical analyses of six *Hypericum* species growing in Slovenia. *Planta Med.* **1999**, *65*, 388.
- [195] M. Gronquist, A. Bezzerides, A. Attygalle, J. Meinwald, M. Eisner, T. Eisner. Attractive and defensive functions of the ultraviolet pigments of a flower (*Hypericum calycinum*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98*, 13745.
- [196] A. Paulke, M. Schubert-Zsilavec, M. Wurglics. Determination of hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* in rat brain after oral administration. *Monatshefte Für Chem. – Chem. Mon.* **2008**, *139*, 489.
- [197] V. Butterweck, F. Petereit, H. Winterhoff, A. Nahrstedt. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med.* **1998**, *64*, 291.
- [198] M. Straub, D. Russ, T. Horn, J. E. Gschwend, C. Abrahamsberg. A phase IIA dose-finding study of PVP-hypericin fluorescence cystoscopy for detection of nonmuscle-invasive bladder cancer. *J. Endourol.* **2015**, *29*, 216.
- [199] M. Olivo, C. Y. Fu, V. Raghavan, W. K. O. Lau. New frontier in hypericin-mediated diagnosis of cancer with current optical technologies. *Ann. Biomed. Eng.* **2012**, *40*, 460.
- [200] U. Simmen, I. Bobirnac, C. Ullmer, H. Lübbert, K. Berger Büter, W. Schaffner, P. Schoeffter. Antagonist effect of pseudohypericin at CRF1 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *458*, 251.
- [201] Y. Zou, Y. Lu, D. Wei. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. *in Vitro. J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5032.
- [202] V. Butterweck, A. Nahrstedt. Phytochemie und Pharmakologie: Was ist bekannt über Johanniskraut? *Pharm. Unserer Zeit* **2003**, *32*, 212.
- [203] M. Nöldner, K. Schötz. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med.* **2002**, *68*, 577.
- [204] N. Tocci. *Hypericum perforatum* subsp. *angustifolium*: study of xanthone biosynthesis *in planta* and *in vitro* systems. Faculty of Mathematics, Physics and Natural Sciences – University of Rome, Rom, **2013**.
- [205] B. Sparenberg, L. Demisch, J. Hoelzl. Untersuchungen über antidepressive Wirkstoffe von Johanniskraut. *Pharm. Ztg.* **1993**, *138*, 50.
- [206] O. Suzuki, Y. Katsumata, M. Oya, V. M. Chari, B. Vermes, H. Wagner, K. Hostettmann. Inhibition of type A and type B monoamine oxidases by naturally occurring xanthenes. *Planta Med.* **1981**, *42*, 17.
- [207] K. Linde, M. M. Berner, L. Kriston. St. John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2008**, CD000448.
- [208] V. Schulz, R. Hänsel. *Rationale Phytotherapie: Ratgeber für die ärztliche Praxis*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, **2013**.
- [209] U. Wölfle, G. Seelinger, C. Schempp. Topical application of St. John's wort (*Hypericum perforatum*). *Planta Med.* **2013**, *80*, 109.
- [210] U. Heinrich, H. Tronnier. Johanniskraut bessert Problemhaut. *Pharm. Ztg.* **2004**.
- [211] S. L. Crockett, N. K. B. Robson. Taxonomy and chemotaxonomy of the genus *Hypericum*. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* **2011**, *5*, 1.
- [212] F. Maggi, C. Cecchini, A. Cresci, M. M. Coman, B. Tirillini, G. Sagratini, F. Papa, S. Vittori. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from several *Hypericum* taxa (Guttiferae) growing in central Italy (Appennino Umbro-Marchigiano). *Chem. Biodivers.* **2010**, *7*, 447.
- [213] H. Kirmizibekmez, C. Bassarello, S. Piacente, E. Celep, I. Atay, G. Mercanoğlu, E. Yeşilada. Phenolic compounds from *Hypericum calycinum* and their antioxidant activity. *Nat. Prod. Commun.* **2009**, *4*, 531.
- [214] M. Gaid, D. Sircar, A. Müller, T. Beuerle, B. Liu, L. Ernst, R. Hänsch, L. Beerhues. Cinnamate:CoA ligase initiates the biosynthesis of a benzoate-derived xanthone phytoalexin in *Hypericum calycinum* cell cultures. *Plant Physiol.* **2012**, *160*, 1267.
- [215] C. P. Ting, T. J. Maimone. Total synthesis of hyperforin. *J. Am. Chem. Soc.* **2015**, 150813145147009.
- [216] B. A. Sparling, D. C. Moebius, M. D. Shair. Enantioselective total synthesis of hyperforin. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 644.



- [217] M. Uwamori, M. Nakada. Stereoselective total synthesis of (\pm)-hyperforin via intramolecular cyclopropanation. *Tetrahedron Lett.* **2013**, *54*, 2022.
- [218] Z. Boubakir, T. Beuerle, B. Liu, L. Beerhues. The first prenylation step in hyperforin biosynthesis. *Phytochemistry* **2005**, *66*, 51.
- [219] S. Kühle. cDNA-Klonierung einer Prenyltransferase aus der Arzneipflanze *Hypericum perforatum*. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, **2009**.
- [220] A. Müller. *Molekulare Analyse von Prenyltransferasen aus Hypericum-Arten*. Cuvillier, Göttingen, **2013**.
- [221] R. Bruni, G. Sacchetti. Factors affecting polyphenol biosynthesis in wild and field grown St. John's wort (*Hypericum perforatum* L. Hypericaceae/Guttiferae). *Molecules* **2009**, *14*, 682.
- [222] T. Dingermann, I. Zündorf. Probleme bei Naturheilmitteln. *Pharm. Ztg.* **2016**, *161*, 12.
- [223] G. Di Carlo, F. Borrelli, E. Ernst, A. A. Izzo. St. John's wort: Prozac from the plant kingdom. *Trends Pharmacol. Sci.* **2001**, *22*, 292.
- [224] K. A. Abd-Elsalam. Bioinformatic tools and guideline for PCR primer design. *Afr. J. Biotechnol.* **2003**, *2*, 91.
- [225] E. M. Linsmaier, F. Skoog. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **1965**, *18*, 100.
- [226] A. B. Woodside, Z. Huang, C. D. Poulter. Trisammonium geranyl diphosphate. *Org. Synth.* **1988**, *66*, 211.
- [227] J. W. van Klink, J. J. Brophy, N. B. Perry, R. T. Weavers. β -Triketones from Myrtaceae: isoleptosperme from *Leptospermum scoparium* and papuanone from *Corymbia dallachiana*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 487.
- [228] E. Genoux-Bastide, D. Lorendeau, E. Nicolle, S. Yahiaoui, S. Magnard, A. Di Pietro, H. Baubichon-Cortay, A. Boumendjel. Identification of xanthonones as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1. *ChemMedChem* **2011**, *6*, 1478.
- [229] I. El-Awaad, M. Bocola, T. Beuerle, B. Liu, L. Beerhues. Bifunctional CYP81AA proteins catalyse identical hydroxylations but alternative regioselective phenol couplings in plant xanthone biosynthesis. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11472.
- [230] C. Trapnell, B. A. Williams, G. Pertea, A. Mortazavi, G. Kwan, M. J. van Baren, S. L. Salzberg, B. J. Wold, L. Pachter. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat. Biotechnol.* **2010**, *28*, 511.
- [231] E. Góngora-Castillo, C. R. Buell. Bioinformatics challenges in *de novo* transcriptome assembly using short read sequences in the absence of a reference genome sequence. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 490.
- [232] E. Góngora-Castillo, G. Fedewa, Y. Yeo, J. Chappell, D. DellaPenna, C. R. Buell, Genomic approaches for interrogating the biochemistry of medicinal plant species, in *Methods in Enzymology*. Elsevier, **2012**, pp. 139–159.
- [233] M. Xiao, Y. Zhang, X. Chen, E.-J. Lee, C. J. S. Barber, R. Chakrabarty, I. Desgagné-Penix, T. M. Haslam, Y.-B. Kim, E. Liu, G. MacNevin, S. Masada-Atsumi, D. W. Reed, J. M. Stout, et al. Transcriptome analysis based on next-generation sequencing of non-model plants producing specialized metabolites of biotechnological interest. *J. Biotechnol.* **2013**, *166*, 122.
- [234] P. J. Facchini, J. Bohlmann, P. S. Covello, V. De Luca, R. Mahadevan, J. E. Page, D.-K. Ro, C. W. Sensen, R. Storms, V. J. J. Martin. Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites. *Trends Biotechnol.* **2012**, *30*, 127.
- [235] N. Matasci, L.-H. Hung, Z. Yan, E. J. Carpenter, N. J. Wickett, S. Mirarab, N. Nguyen, T. Warnow, S. Ayyampalayam, M. Barker, J. Burleigh, M. A. Gitzendanner, E. Wafula, J. P. Der, et al. Data access for the 1,000 plants (1KP) project. *GigaScience* **2014**, *3*, 17.
- [236] M. T. J. Johnson, E. J. Carpenter, Z. Tian, R. Bruskiwich, J. N. Burris, C. T. Carrigan, M. W. Chase, N. D. Clarke, S. Covshoff, C. W. dePamphilis, P. P. Edger, F. Goh, S. Graham, S. Greiner, et al. Evaluating methods for isolating total RNA and predicting the success of sequencing phylogenetically diverse plant transcriptomes. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e50226.

- [237] S. Altschul, T. L. Madden, A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, D. Lipman. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 3389.
- [238] Y. Tsurumaru, K. Sasaki, T. Miyawaki, T. Momma, N. Umemoto, K. Yazaki. An aromatic prenyltransferase-like gene HIPT-1 preferentially expressed in lupulin glands of hop. *Plant Biotechnol.* **2010**, *27*, 199.
- [239] P. Chomczynski, N. Sacchi. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **1987**, *162*, 156.
- [240] L. Jaakola, A. M. Pirttilä, M. Halonen, A. Hohtola. Isolation of high quality RNA from bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) fruit. *Mol. Biotechnol.* **2001**, *19*, 201.
- [241] C. F. Barbas, D. R. Burton, J. K. Scott, G. J. Silverman. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2007**, *2007*, pdb. ip47.
- [242] D. Baltimore. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **1970**, *226*, 1209.
- [243] A. Chenchik, Y. Zhu, L. Diatchenko, R. Li, J. Hill, P. Siebert, Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR, in *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR*. **1998**, pp. 305–319.
- [244] K. B. Mullis, F. Ferré, R. Gibbs, Eds. . *The Polymerase Chain Reaction*. Birkhäuser, Boston, **1994**.
- [245] M. A. Frohman, M. K. Dush, G. R. Martin. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1988**, *85*, 8998.
- [246] K. Knoche, D. Kephardt. Cloning blunt-end *Pfu* DNA polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T vector systems. *Promega Notes* **1999**, *71*, 10.
- [247] J. Vieira, J. Messing. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **1982**, *19*, 259.
- [248] R. W. West, S. M. Chen, H. Putz, G. Butler, M. Banerjee. GAL1-GAL10 divergent promoter region of *Saccharomyces cerevisiae* contains negative control elements in addition to functionally separate and possibly overlapping upstream activating sequences. *Genes Dev.* **1987**, *1*, 1118.
- [249] S. N. Cohen, A. C. Chang, L. Hsu. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1972**, *69*, 2110.
- [250] D. Hanahan. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **1983**, *166*, 557.
- [251] R. J. Dohmen, A. W. M. Strasser, C. B. Höner, C. P. Hollenberg. An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast* **1991**, *7*, 691.
- [252] H. C. Bimboim, J. Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **1979**, *7*, 1513.
- [253] C. S. Hoffman, F. Winston. A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **1987**, *57*, 267.
- [254] M. N. Ashby, P. A. Edwards. Identification and regulation of a rat liver cDNA encoding farnesyl pyrophosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 635.
- [255] T. A. Hall. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **1999**, *No. 41*, 95.
- [256] J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **1994**, *22*, 4673.
- [257] K. Tamura, G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, S. Kumar. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 2725.
- [258] D. Pompon, B. Louerat, A. Bronine, P. Urban. Yeast expression of animal and plant P450s in optimized redox environments. *Methods Enzymol.* **1996**, *272*, 51.
- [259] V. A. Luckow, S. C. Lee, G. F. Barry, P. O. Olins. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *J. Virol.* **1993**, *67*, 4566.



- [260] K. Ohara, K. Mito, K. Yazaki. Homogeneous purification and characterization of LePGT1 – a membrane-bound aromatic substrate prenyltransferase involved in secondary metabolism of *Lithospermum erythrorhizon*. *FEBS J.* **2013**, *280*, 2572.
- [261] M. M. Bradford. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248.
- [262] Z. Boubakir. Hyperforin biosynthesis – characterization and purification of a prenyltransferase from *Hypericum calycinum* cell cultures. Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, Braunschweig, **2006**.
- [263] T. Fiesel, M. Gaid, A. Müller, J. Bartels, I. El-Awaad, T. Beuerle, L. Ernst, S. Behrends, L. Beerhues. Molecular cloning and characterization of a xanthone prenyltransferase from *Hypericum calycinum* cell cultures. *Molecules* **2015**, *20*, 15616.
- [264] L. Michaelis, M. M. L. Menten. The kinetics of invertin action. *FEBS Lett.* **2013**, *587*, 2712.
- [265] L. Michaelis, M. M. L. Menten. Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* **1913**, *49*, 333.
- [266] S. Wilhelm, B. Gröbler, M. Gluch, H. Heinz. Die konfokale Laser Scanning Mikroskopie – Grundlagen. **2003**.
- [267] M. Jauhiainen, H. Mönkkönen, J. Rääkkönen, J. Mönkkönen, S. Auriola. Analysis of endogenous ATP analogs and mevalonate pathway metabolites in cancer cell cultures using liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2009**, *877*, 2967.
- [268] M. C. Crispin, M. Hur, T. Park, Y. H. Kim, E. S. Wurtele. Identification and biosynthesis of acylphloroglucinols in *Hypericum gentianoides*. *Physiol. Plant.* **2013**, *148*, 354.
- [269] L. Beerhues. Hyperforin. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 2201.
- [270] S. Möller, M. D. Croning, R. Apweiler. Evaluation of methods for the prediction of membrane spanning regions. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2001**, *17*, 646.
- [271] A. Krogh, B. Larsson, G. von Heijne, E. L. L. Sonnhammer. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* **2001**, *305*, 567.
- [272] E. L. Sonnhammer, G. von Heijne, A. Krogh. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol. ISMB Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **1998**, *6*, 175.
- [273] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng, S. Mitaku. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **1998**, *14*, 378.
- [274] S. Mitaku, T. Hirokawa, T. Tsuji. Amphiphilicity index of polar amino acids as an aid in the characterization of amino acid preference at membrane-water interfaces. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **2002**, *18*, 608.
- [275] S. Mitaku, T. Hirokawa. Physicochemical factors for discriminating between soluble and membrane proteins: hydrophobicity of helical segments and protein length. *Protein Eng.* **1999**, *12*, 953.
- [276] R.-T. Guo, T.-P. Ko, A. P.-C. Chen, C.-J. Kuo, A. H.-J. Wang, P.-H. Liang. Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 20762.
- [277] L. C. Tarshis, M. Yan, C. D. Poulter, J. C. Sacchettini. Crystal structure of recombinant farnesyl diphosphate synthase at 2.6 Å resolution. *Biochemistry (Mosc.)* **1994**, *33*, 10871.
- [278] M. Ferro, D. Salvi, H. Riviere-Rolland, T. Vermat, D. Seigneurin-Berny, D. Grunwald, J. Garin, J. Joyard, N. Rolland. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, *99*, 11487.
- [279] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, G. von Heijne. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **2000**, *300*, 1005.
- [280] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, G. von Heijne. Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.* **1997**, *10*, 1.
- [281] O. Emanuelsson, H. Nielsen, G. von Heijne. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **1999**, *8*, 978.
- [282] H. Bannai, Y. Tamada, O. Maruyama, K. Nakai, S. Miyano. Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **2002**, *18*, 298.
- [283] O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223.

- [284] A. Rath, M. Glibowicka, V. G. Nadeau, G. Chen, C. M. Deber. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106*, 1760.
- [285] H. Nielsen, P. Arends. Xanthone constituents of *Hypericum androsaemum*. *J. Nat. Prod.* **1979**, *42*, 301.
- [286] W. Mahabusarakam, S. Rattanaburi, S. Phongpaichit, A. Kanjana-Opas. Antibacterial and cytotoxic xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Phytochem. Lett.* **2008**, *1*, 211.
- [287] A. Klempien, Y. Kaminaga, A. Qualley, D. A. Nagegowda, J. R. Widhalm, I. Orlova, A. K. Shasany, G. Taguchi, C. M. Kish, B. R. Cooper, J. C. D'Auria, D. Rhodes, E. Pichersky, N. Dudareva. Contribution of CoA ligases to benzenoid biosynthesis in petunia flowers. *Plant Cell* **2012**, *24*, 2015.
- [288] D. A. Vessey, M. Kelley. Characterization of the monovalent and divalent cation requirements for the xenobiotic carboxylic acid: CoA ligases of bovine liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1382*, 243.
- [289] K. Ishiguro, N. Nagareya, A. Suitani, H. Fukumoto. A prenylated xanthone from cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 1065.
- [290] H. Zhang, D.-D. Zhang, Y.-Z. Lao, W.-W. Fu, S. Liang, Q.-H. Yuan, L. Yang, H.-X. Xu. Cytotoxic and anti-inflammatory prenylated benzoylphloroglucinols and xanthenes from the twigs of *Garcinia esculenta*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77*, 1700.
- [291] L. J. Harrison, L.-S. Leong, G.-L. Sia, K.-Y. Sim, H. T.-W. Tan. Xanthenes from *Garcinia forbesii*. *Phytochemistry* **1993**, *33*, 727.
- [292] S. Laphookhieo, J. K. Syers, R. Kiattansakul, K. Chantrapromma. Cytotoxic and antimalarial prenylated xanthenes from *Cratoxylum cochinchinense*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2006**, *54*, 745.
- [293] K. Zhou, L. Ludwig, S.-M. Li. Friedel–Crafts alkylation of acylphloroglucinols catalyzed by a fungal indole prenyltransferase. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 929.
- [294] S. L. Crockett, E.-M. Wenzig, O. Kunert, R. Bauer. Anti-inflammatory phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium*. *Phytochem. Lett.* **2008**, *1*, 37.
- [295] K. Athanasas, P. Magiatis, N. Fokialakis, A.-L. Skaltsounis, H. Pratsinis, D. Kletsas. Hyperjovinols A and B: two new phloroglucinol derivatives from *Hypericum jovis* with antioxidant activity in cell cultures. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 973.
- [296] D. Gamiotea-Turro, O. Cuesta-Rubio, S. Prieto-González, F. De Simone, S. Passi, L. Rastrelli. Antioxidative constituents from the leaves of *Hypericum styphelioides*. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 869.
- [297] J. M. Schuller, G. Zocher, M. Liebhold, X. Xie, M. Stahl, S.-M. Li, T. Stehle. Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity. *J. Mol. Biol.* **2012**, *422*, 87.
- [298] A. Fan, J. Winkelblech, S.-M. Li. Impacts and perspectives of prenyltransferases of the DMATS superfamily for use in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2015**, *99*, 7399.
- [299] T. Kumano, S. B. Richard, J. P. Noel, M. Nishiyama, T. Kuzuyama. Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8117.
- [300] E. Haug-Schifferdecker, D. Arican, R. Bruckner, L. Heide. A new group of aromatic prenyltransferases in fungi, catalyzing a 2,7-dihydroxynaphthalene 3-dimethylallyl-transferase reaction. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 16487.
- [301] K. Ohara, A. Muroya, N. Fukushima, K. Yazaki. Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of *p*-hydroxybenzoic acid. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 231.
- [302] M. Tello, T. Kuzuyama, L. Heide, J. P. Noel, S. B. Richard. The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, *65*, 1459.
- [303] T. Bonitz, V. Alva, O. Saleh, A. N. Lupas, L. Heide. Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e27336.
- [304] X. Yu, X. Xie, S.-M. Li. Substrate promiscuity of secondary metabolite enzymes: prenylation of hydroxynaphthalenes by fungal indole prenyltransferases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 737.
- [305] H. F. Tsai, H. Wang, J. C. Gebler, C. D. Poulter, C. L. Schardl. The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *216*, 119.



- [306] J. C. Gebler, C. D. Poulter. Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch. Biochem. Biophys.* **1992**, 296, 308.
- [307] K. Ohara. Functional characterization of OsPPT1, which encodes *p*-hydroxybenzoate polyprenyltransferase involved in ubiquinone biosynthesis in *Oryza sativa*. *Plant Cell Physiol.* **2006**, 47, 581.
- [308] U. Metzger, S. Keller, C. E. M. Stevenson, L. Heide, D. M. Lawson. Structure and Mechanism of the Magnesium-Independent Aromatic Prenyltransferase CloQ from the Clorobiocin Biosynthetic Pathway. *J. Mol. Biol.* **2010**, 404, 611.
- [309] X. Yu, S.-M. Li. Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Methods Enzymol.* **2012**, 516, 259.
- [310] S. Schlegel, J. Löfblom, C. Lee, A. Hjelm, M. Klepsch, M. Strous, D. Drew, D. J. Slotboom, J.-W. de Gier. Optimizing membrane protein overexpression in the *Escherichia coli* strain Lemo21(DE3). *J. Mol. Biol.* **2012**, 423, 648.
- [311] S. Wagner, M. M. Klepsch, S. Schlegel, A. Appel, R. Draheim, M. Tarry, M. Hogbom, K. J. van Wijk, D. J. Slotboom, J. O. Persson, J.-W. de Gier. Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, 105, 14371.
- [312] L. Beerhues, Biosynthesis of the active *Hypericum perforatum* constituents, in *Hypericum. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, (Eds: M.S. Odabas, C. Çirak). **2011**, pp. 70–77.
- [313] K. Karppinen, J. Hokkanen, A. Tolonen, S. Mattila, A. Hohtola. Biosynthesis of hyperforin and adhyperforin from amino acid precursors in shoot cultures of *Hypericum perforatum*. *Phytochemistry* **2007**, 68, 1038.
- [314] M. Gaid, P. Haas, T. Beuerle, S. Scholl, L. Beerhues. Hyperforin production in *Hypericum perforatum* root cultures. *J. Biotechnol.* **2016**, 222, 47.
- [315] A. Charchoglyan, A. Abrahamyan, I. Fujii, Z. Boubakir, T. A. M. Gulder, T. M. Kutchan, H. Vardapetyan, G. Bringmann, Y. Ebizuka, L. Beerhues. Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures. *Phytochemistry* **2007**, 68, 2670.
- [316] E. A. Rayl, B. A. Moroson, G. P. Beardsley. The human purH gene product, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase. Cloning, sequencing, expression, purification, kinetic analysis, and domain mapping. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 2225.
- [317] D. W. Hum, A. W. Bell, R. Rozen, R. E. MacKenzie. Primary structure of a human trifunctional enzyme. Isolation of a cDNA encoding methylenetetrahydrofolate dehydrogenase-methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase-formyltetrahydrofolate synthetase. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263, 15946.
- [318] C. R. Vickery, J. J. La Clair, M. D. Burkart, J. P. Noel. Harvesting the biosynthetic machineries that cultivate a variety of indispensable plant natural products. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, 31, 66.
- [319] K. Jørgensen, A. V. Rasmussen, M. Morant, A. H. Nielsen, N. Bjarnholt, M. Zagrobelny, S. Bak, B. L. Møller. Metabolon formation and metabolic channeling in the biosynthesis of plant natural products. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2005**, 8, 280.
- [320] T. Sirvent, S. B. Krasnoff, D. M. Gibson. Induction of hypericins and hyperforins in *Hypericum perforatum* in response to damage by herbivores. *J. Chem. Ecol.* **2003**, 29, 2667.
- [321] T. Sirvent, D. Gibson. Induction of hypericins and hyperforin in *Hypericum perforatum* L. in response to biotic and chemical elicitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **2002**, 60, 311.
- [322] M. Fellermeier, M. H. Zenk. Prenylation of olivetolate by a hemp transferase yields cannabigerolic acid, the precursor of tetrahydrocannabinol. *FEBS Lett.* **1998**, 427, 283.
- [323] G. V. Ccana-Ccapatinta, G. L. von Poser. Acylphloroglucinol derivatives from *Hypericum laricifolium* Juss. *Phytochem. Lett.* **2015**, 12, 63.
- [324] S. A. T. Fobofou, K. Franke, G. Sanna, A. Porzel, E. Bullita, P. La Colla, L. A. Wessjohann. Isolation and anticancer, anthelmintic, and antiviral (HIV) activity of acylphloroglucinols, and regioselective synthesis of empetrifranzinans from *Hypericum roeperianum*. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, 23, 6327.
- [325] S. A. Sarkisian, M. J. Janssen, H. Matta, G. E. Henry, K. L. LaPlante, D. C. Rowley. Inhibition of bacterial growth and biofilm production by constituents from *Hypericum* spp. *Phytother. Res.* **2012**, 26, 1012.
- [326] S. Schmidt, G. Jürgenliemk, H. Skaltsa, J. Heilmann. Phloroglucinol derivatives from *Hypericum empetrifolium* with antiproliferative activity on endothelial cells. *Phytochemistry* **2012**, 77, 218.

- [327] G. E. Henry, M. S. Campbell, A. A. Zelinsky, Y. Liu, C. S. Bowen-Forbes, L. Li, M. G. Nair, D. C. Rowley, N. P. Seeram. Bioactive acylphloroglucinols from *Hypericum densiflorum*. *Phytother. Res.* **2009**, *23*, 1759.
- [328] A. Valletta, G. De Angelis, C. Badiali, E. Brasili, A. Miccheli, M. E. Di Cocco, G. Pasqua. Acetic acid acts as an elicitor exerting a chitosan-like effect on xanthone biosynthesis in *Hypericum perforatum* L. root cultures. *Plant Cell Rep.* **2016**, *35*, 1009.
- [329] S. L. Crockett, B. Poller, N. Tabanca, E.-M. Pferschy-Wenzig, O. Kunert, D. E. Wedge, F. Bucar. Bioactive xanthones from the roots of *Hypericum perforatum* (common St. John's wort). *J. Sci. Food Agric.* **2011**, *91*, 428.
- [330] N. T. Diderot, N. Silvere, T. Etienne, Xanthones as therapeutic agents: chemistry and pharmacology, in *Advances in Phytomedicine*, (Eds: M.T.H. Khan, A. Ather). Elsevier, **2006**, pp. 273–298.
- [331] H. El-Seedi, M. El-Barbary, D. El-Ghorab, L. Bohlin, A.-K. Borg-Karlson, U. Goransson, R. Verpoorte. Recent insights into the biosynthesis and biological activities of natural xanthones. *Curr. Med. Chem.* **2010**, *17*, 854.
- [332] J. Fotie, D. Bohle. Pharmacological and biological activities of xanthones. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2006**, *5*, 15.
- [333] M. Pinto, M. Sousa, M. Nascimento. Xanthone derivatives: new insights in biological activities. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2517.
- [334] D. Zubrická, A. Mišianiková, J. Henzelyová, A. Valletta, G. De Angelis, F. D. D'Auria, G. Simonetti, G. Pasqua, E. Čellárová. Xanthones from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. *Plant Cell Rep.* **2015**, *34*, 1953.
- [335] N. Boonnak, C. Karalai, S. Chantrapromma, C. Ponglimanont, H.-K. Fun, A. Kanjana-Opas, S. Laphookhieo. Bioactive prenylated xanthones and anthraquinones from *Cratoxylum formosum* ssp. *pruniflorum*. *Tetrahedron* **2006**, *62*, 8850.
- [336] K. Y. Khaw, S. B. Choi, S. C. Tan, H. A. Wahab, K. L. Chan, V. Murugaiyah. Prenylated xanthones from mangosteen as promising cholinesterase inhibitors and their molecular docking studies. *Phyto-medicine* **2014**, *21*, 1303.
- [337] N. K. Sethiya, S. H. Mishra. Investigation of mangiferin, as a promising natural polyphenol xanthone on multiple targets of Alzheimer's disease. *J. Biol. Act. Prod. Nat.* **2014**, *4*, 111.
- [338] Y. Wang, Z. Xia, J.-R. Xu, Y.-X. Wang, L.-N. Hou, Y. Qiu, H.-Z. Chen. α -Mangostin, a polyphenolic xanthone derivative from mangosteen, attenuates β -amyloid oligomers-induced neurotoxicity by inhibiting amyloid aggregation. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 871.
- [339] M. T. H. Khan, I. Orhan, F. S. Şenol, M. Kartal, B. Şener, M. Dvorská, K. Šmejkal, T. Šlapetová. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *181*, 383.
- [340] A. Urbain, A. Marston, E. F. Queiroz, K. Ndjoko, K. Hostettmann. Xanthones from *Gentiana campestris* as new acetylcholinesterase inhibitors. *Planta Med.* **2004**, *70*, 1011.
- [341] H. W. Ryu, J. K. Cho, M. J. Curtis-Long, H. J. Yuk, Y. S. Kim, S. Jung, Y. S. Kim, B. W. Lee, K. H. Park. α -Glucosidase inhibition and antihyperglycemic activity of prenylated xanthones from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 2148.
- [342] T. Miura, H. Ichiki, I. Hashimoto, N. Iwamoto, M. Kato, M. Kubo, E. Ishihara, Y. Komatsu, M. Okada, T. Ishida, K. Tanigawa. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* **2001**, *8*, 85.
- [343] P. Basnet, S. Kadota, M. Shimizu, Y. Takata, M. Kobayashi, T. Namba. Bellidifolin stimulates glucose uptake in rat 1 fibroblasts and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. *Planta Med.* **1995**, *61*, 402.
- [344] P. Basnet, S. Kadota, M. Shimizu, T. Namba. Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*. *Planta Med.* **1994**, *60*, 507.
- [345] B. K. Sahoo, A. H. Zaidi, P. Gupta, R. B. Mokhamatam, N. Raviprakash, S. K. Mahali, S. K. Manna. A natural xanthone increases catalase activity but decreases NF-kappa B and lipid peroxidation in U-937 and HepG2 cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *764*, 520.
- [346] A. Kokotkiewicz, M. Luczkiewicz, J. Pawlowska, P. Luczkiewicz, P. Sowinski, J. Witkowski, E. Bryl, A. Bucinski. Isolation of xanthone and benzophenone derivatives from *Cyclopia genistoides* (L.) Vent.



- (honeybush) and their pro-apoptotic activity on synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Fitoterapia* **2013**, *90*, 199.
- [347] T. Yamakuni, K. Aoki, K. Nakatani, N. Kondo, H. Oku, K. Ishiguro, Y. Ohizumi. Garcinone B reduces prostaglandin E2 release and NF- κ B-mediated transcription in C6 rat glioma cells. *Neurosci. Lett.* **2006**, *394*, 206.
- [348] H. Minami, M. Kinoshita, Y. Fukuyama, M. Kodama, T. Yoshizawa, M. Sugiura, K. Nakagawa, H. Tago. Antioxidant xanthenes from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 501.
- [349] A. de Oliveira Caleare, D. Lazarin-Bidóia, D. A. G. Cortez, T. Ueda-Nakamura, B. P. Dias Filho, S. de Oliveira Silva, C. V. Nakamura. Trypanocidal activity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone isolated from *Kielmeyera coriacea*. *Parasitol. Int.* **2013**, *62*, 405.
- [350] Y. Upegui, S. M. Robledo, J. F. Gil Romero, W. Quiñones, R. Archbold, F. Torres, G. Escobar, B. Nariño, F. Echeverri. *In vivo* antimalarial activity of α -mangostin and the new xanthone δ -mangostin. *Phytother. Res.* **2015**, *29*, 1195.
- [351] A. G. B. Azebaze, M. Meyer, A. Valentin, E. L. Nguemfo, Z. T. Fomum, A. E. Nkengfack. Prenylated xanthone derivatives with antiplasmodial activity from *Allanblackia monticola* STANER L.C. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **2006**, *54*, 111.
- [352] W. Mahabusarakam, K. Kuaha, P. Wilairat, W. Taylor. Prenylated xanthenes as potential antiplasmodial substances. *Planta Med.* **2006**, *72*, 912.
- [353] T. Noro, A. Ueno, M. Mizutani, T. Hashimoto, T. Miyase, M. Kuroyanagi, S. Fukushima. Inhibitors of xanthine oxidase from *Athyrium mesosorum*. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **1984**, *32*, 4455.
- [354] T. Shan, Q. Ma, K. Guo, J. Liu, W. Li, F. Wang, E. Wu. Xanthenes from mangosteen extracts as natural chemopreventive agents: potential anticancer drugs. *Curr. Mol. Med.* **2011**, *11*, 666.
- [355] A. C. P. Dias, R. M. Seabra, P. B. Andrade, F. Ferreres, M. F. Ferreira. Xanthone production in calli and suspended cells of *Hypericum perforatum*. *J. Plant Physiol.* **2001**, *158*, 821.
- [356] N. Mulinacci, C. Giaccherini, A. R. Santamaria, R. Caniato, F. Ferrari, A. Valletta, F. F. Vincieri, G. Pasqua. Anthocyanins and xanthenes in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh. *Plant Physiol. Biochem.* **2008**, *46*, 414.
- [357] O. Tusevski, J. P. Stanoeva, E. Markoska, N. Brndevska, M. Stefova, S. Gadzovska Simic. Callus cultures of *Hypericum perforatum* L.: a novel and efficient source for xanthone production. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **2016**, *125*, 309.
- [358] A. C. . Dias, R. . Seabra, P. . Andrade, F. Ferreres, M. Fernandes-Ferreira. Xanthone biosynthesis and accumulation in calli and suspended cells of *Hypericum androsaemum*. *Plant Sci.* **2000**, *150*, 93.
- [359] A. M. A. Abd El-Mawla. Xanthenes from cell cultures of *Hypericum gnidioides* seem. *Bull. Pharm. Sci. Assiut Univ.* **2005**, 105.
- [360] Q.-L. Wu, S.-P. Wang, L.-J. Du, J.-S. Yang, P.-G. Xiao. Xanthenes from *Hypericum japonicum* and *H. henryi*. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 1395.
- [361] K. Ishiguro, M. Nakajima, H. Fukumoto, K. Isoi. Co-occurrence of prenylated xanthenes and their cyclization products in cell suspension cultures of *Hypericum patulum*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 867.
- [362] A. K. Sen, K. K. Sarkar, P. C. Mazumder, N. Banerji, R. Uusvuori, T. A. Hase. The structures of garcinones A, B and C: three new xanthenes from *Garcinia mangostana*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 1747.
- [363] K.-S. Masters, S. Bräse. Xanthenes from fungi, lichens and bacteria: the natural products and their synthesis. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 3717.
- [364] G. Rath, O. Potterat, S. Mavi, K. Hostettmann. Xanthenes from *Hypericum roeperanum*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 513.
- [365] S. A. T. Fobofou, C. R. Harmon, A. H. N. Lonfouo, K. Franke, S. M. Wright, L. A. Wessjohann. Prenylated phenyl polyketides and acylphloroglucinols from *Hypericum peplidifolium*. *Phytochemistry* **2016**, *124*, 108.
- [366] L. F. R. Conceição, F. Ferreres, R. M. Tavares, A. C. P. Dias. Induction of phenolic compounds in *Hypericum perforatum* L. cells by *Colletotrichum gloeosporioides* elicitation. *Phytochemistry* **2006**, *67*, 149.



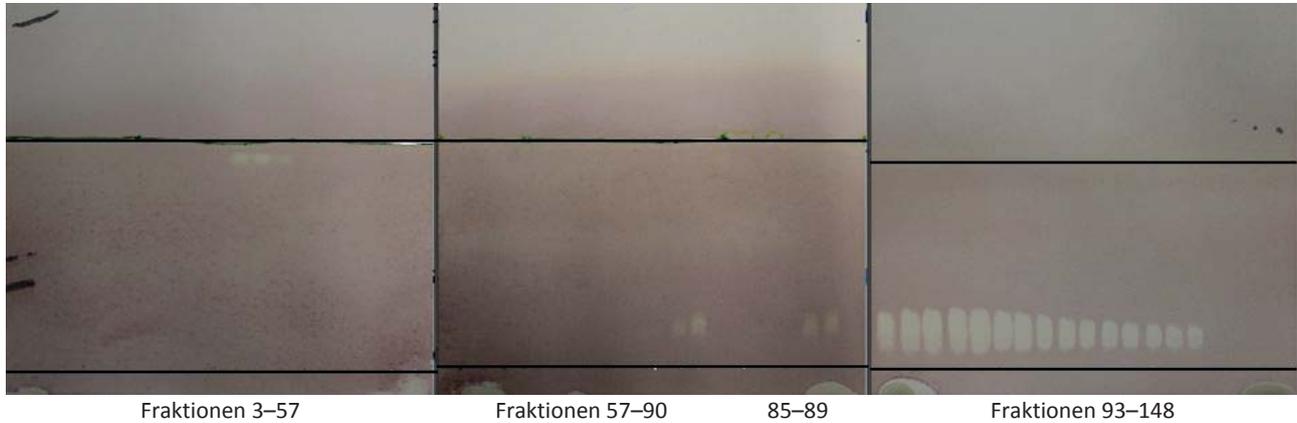
- [367] G. Pasqua, P. Avato, B. Monacelli, A. R. Santamaria, M. P. Argentieri. Metabolites in cell suspension cultures, calli, and *in vitro* regenerated organs of *Hypericum perforatum* cv. Topas. *Plant Sci.* **2003**, *165*, 977.



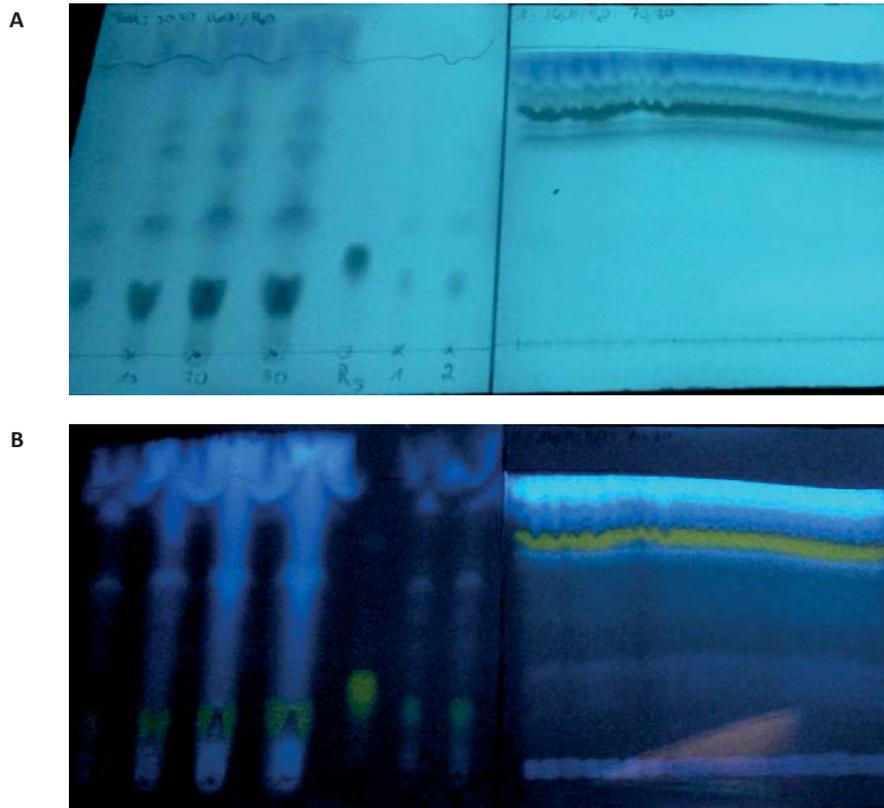
10 ANHANG

10.1. DC-Dokumentation

10.1.1. Cellulose-DC-Fertigplatten der Synthese von DMAPP (zu 4.2.1, 5.1.1)



10.1.2. Kieselgel-DC-Fertigplatten der Aufreinigung von 1,3,6,7-THX (zu 4.2.3, 5.1.3)



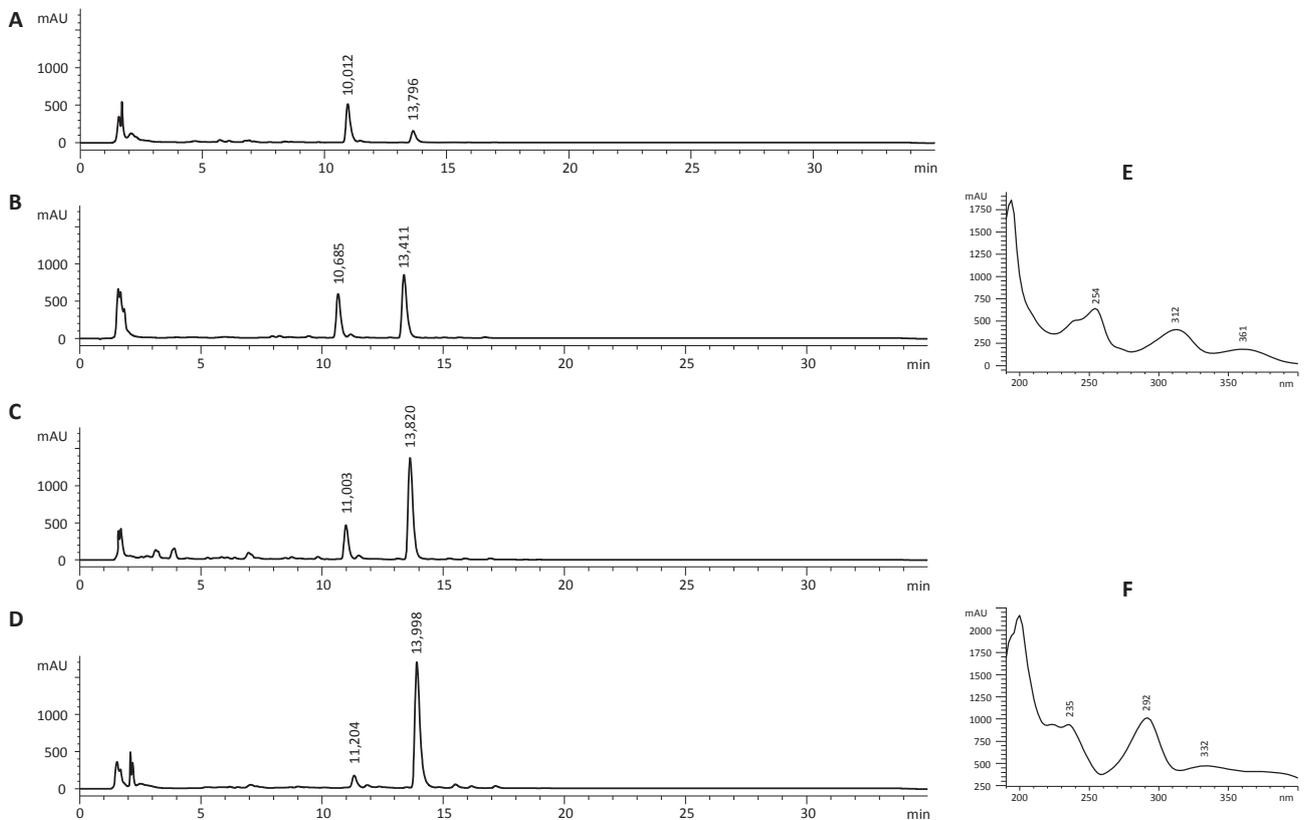
Links: Übersichts-DC zur Evaluierung von Auftragsmengen und mobiler Phase; rechts: Aufreinigungs-DC mit bandenförmigem Auftrag und finaler mobiler Phase (R_f 1,3,6,7-THX = 0,77). **A:** DC-Detektion bei $\lambda = 254$ nm. **B:** DC-Detektion bei $\lambda = 365$ nm

10.2. Prenyltransferase-Sequenzen

Alle Nukleotid- und Aminosäure-Sequenzen der zwölf klonierten AS-PTs, die im Insektenzell-Baculovirus-System exprimiert und als rekombinante Proteine untersucht wurden, wurden aus der genehmigten Druckversion der vorliegenden Arbeit entfernt. Sie werden nach Publikation in der wissenschaftlichen Fachpresse verfügbar sein.

10.4. Zusätzliche Analytik-Daten

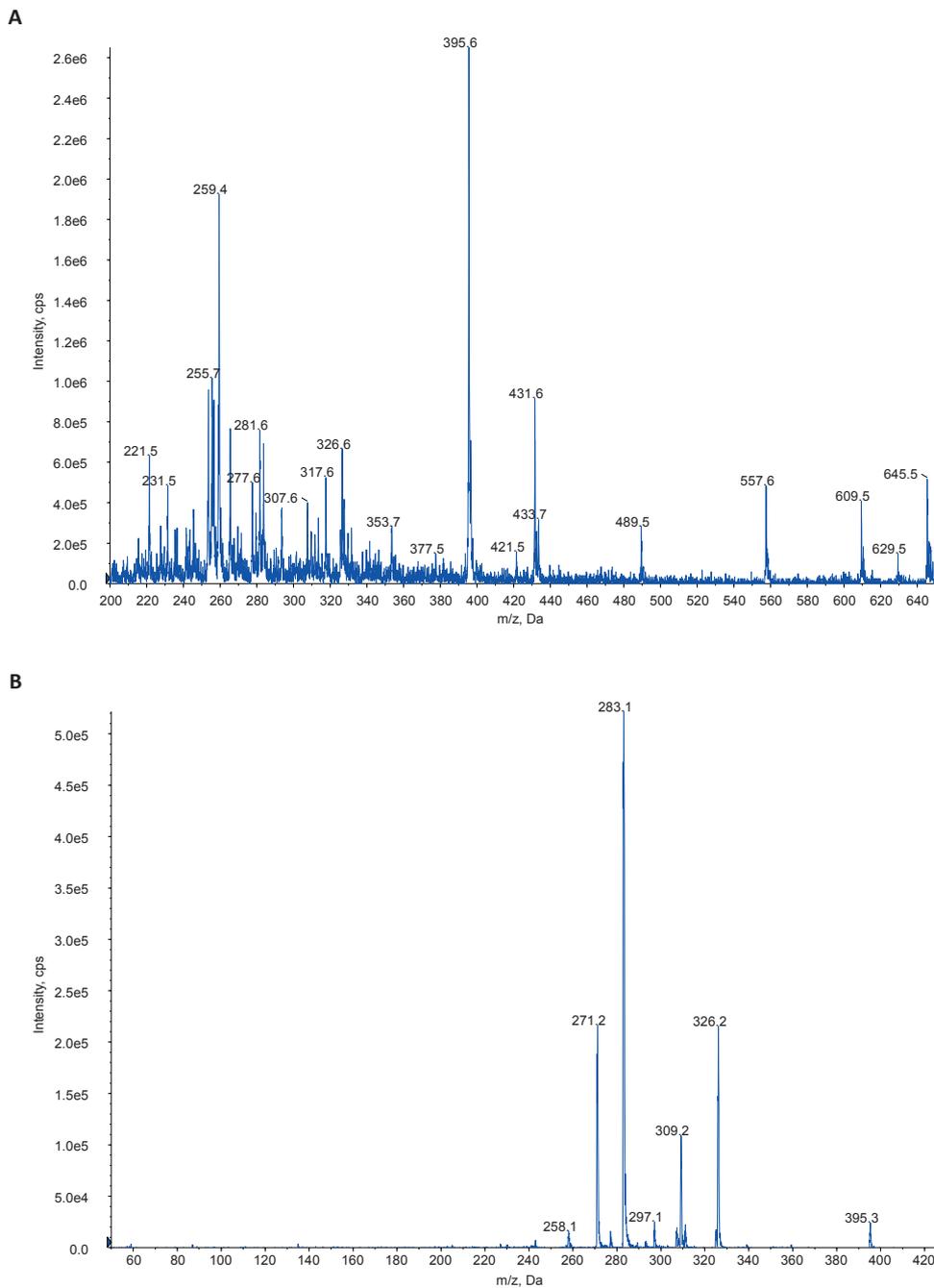
10.4.1. HPLC-Untersuchung des Sekundärstoffprofils von Elicitor-behandelten *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen (zu 5.6.3.3 und 6.3.2)



HPLC-Untersuchung von Ethylacetat-Extrakten aus der Zellsuspensionskultur von *H. calycinum*, mit Hefeextrakt elicitiert und zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet; HPLC-Methode 3, Detektion: $\lambda = 292$ nm. **A–D**: HPLC-Chromatogramme 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach Elicitor-Zugabe (von oben nach unten). Hyperxanthon E bei $R_t = 10$ –11 min, Patulon bei $R_t \approx 13,8$ min. **E**: UV-Spektrum von Hyperxanthon E. **F**: UV-Spektrum von Patulon

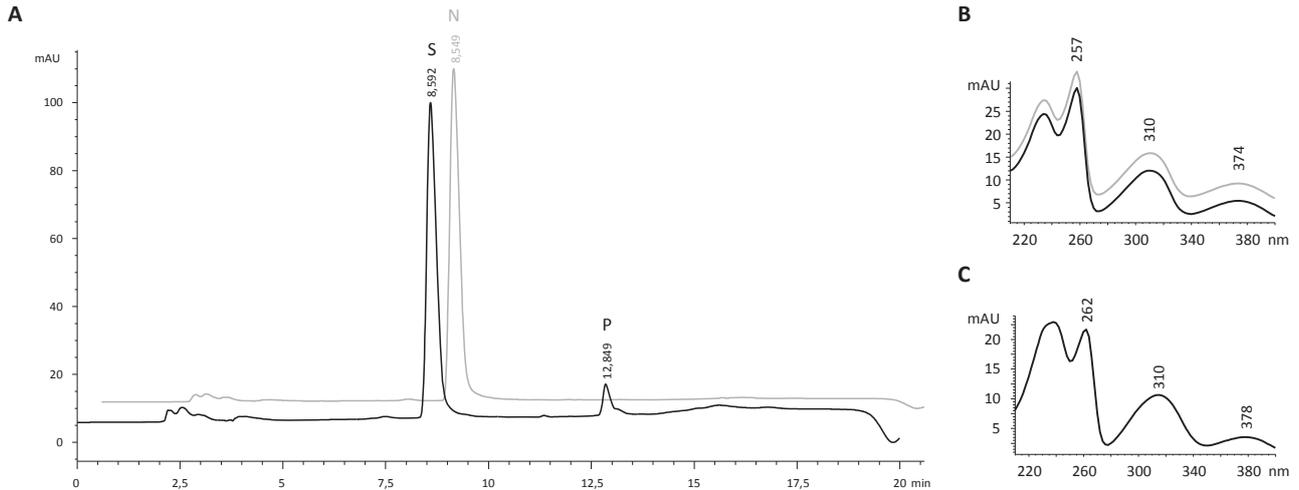


10.4.2. MS-Untersuchung der Referenzsubstanz Patulon aus Elicitor-behandelten *H. calycinum*-Zellsuspensionskulturen (zu 5.6.3.3 und 6.3.2)



MS-Untersuchung eines Ethylacetat-Extraktes aus der Zellsuspensionskultur von *H. calycinum*, 48 h nach Elicitierung mit Hefeextrakt. **A:** Massenspektrum (EMS ESI neg) des Zellkultur-Gesamtextraktes mit dem Molekül-Ion von Patulon bei $m/z = 395$. **B:** MS/MS-Spektrum (EPI neg) der Fragmentierung des MS-Signals von Patulon bei $m/z = 395$

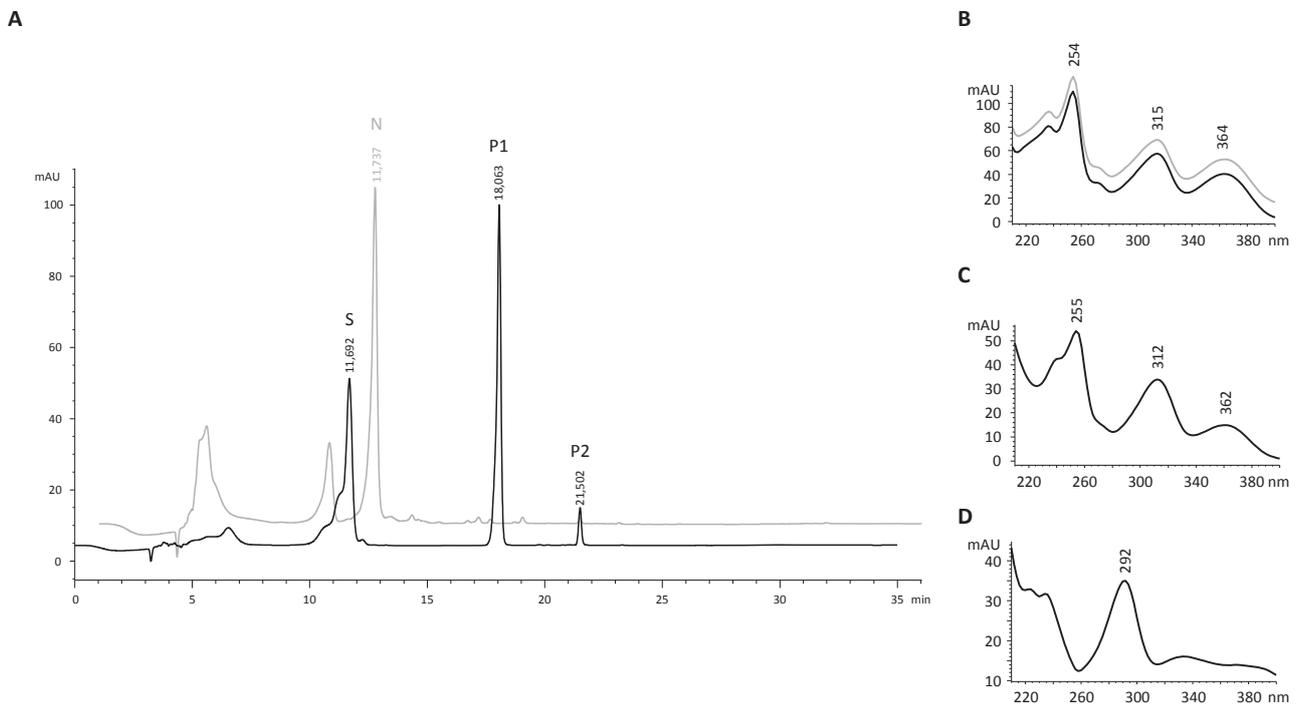
10.4.3. HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HcPT-1 (zu 5.6.4)



HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HcPT-1 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; S: Substrat. **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum des Produktes

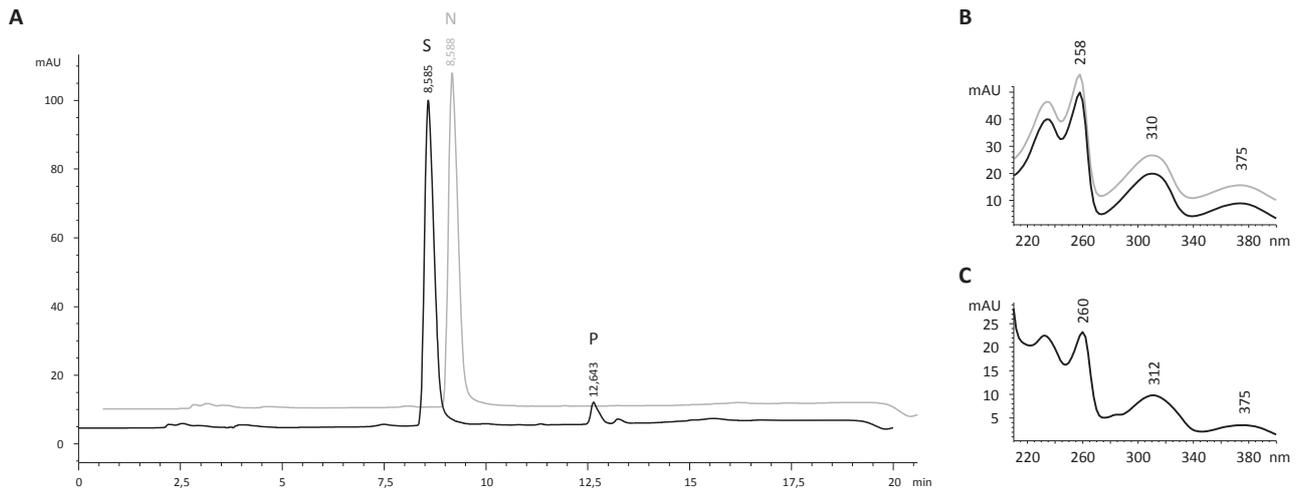
10.4.4. HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-1 (zu 5.6.6)

10.4.4.1. Umsetzung von 1,3,6,7-THX



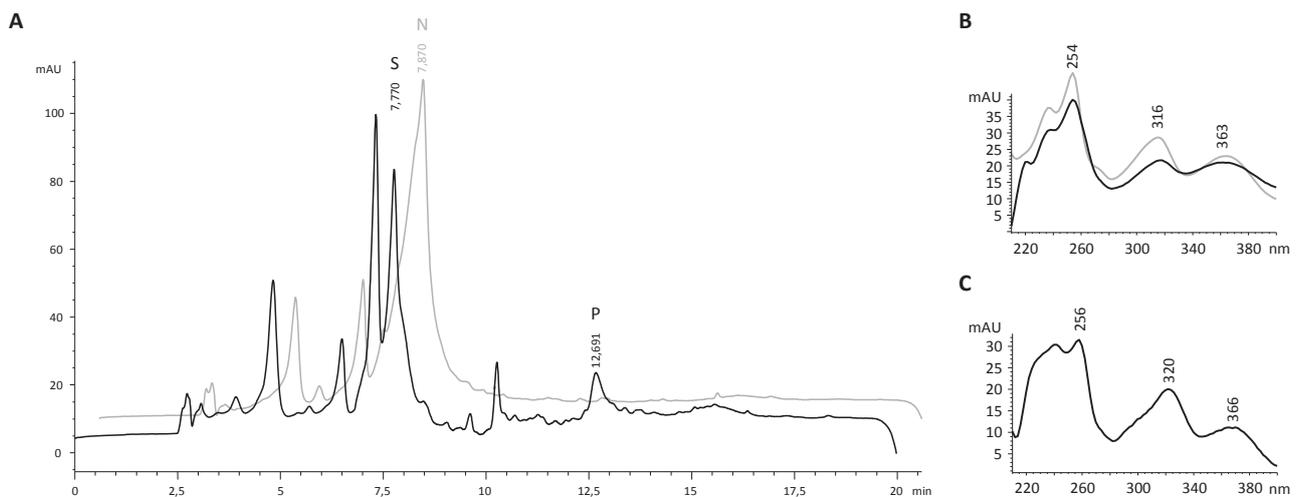
HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-1 mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 2, Detektion: $\lambda = 292$ nm. N: Negativkontrolle; P1: Produkt 1 (1,3,6,7-TH8PX); P2: Produkt 2 (Patulon); S: Substrat. **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum von „P1“. **D:** UV-Spektrum von „P2“

10.4.4.2. Umsetzung von 1,3,7-THX



HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-1 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl. **A**: HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; S: Substrat. **B**: UV-Spektren von „S/N“. **C**: UV-Spektrum des Produktes

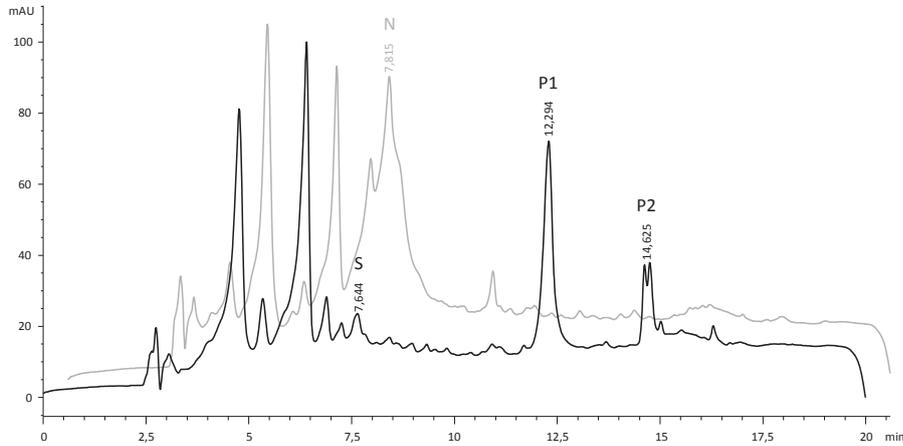
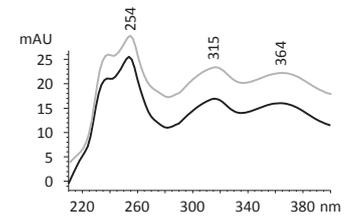
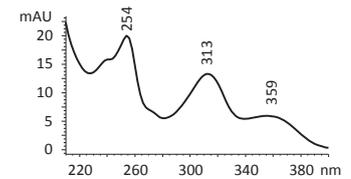
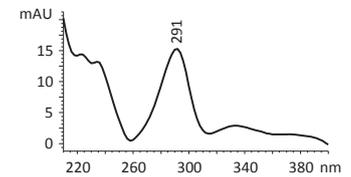
10.4.5. HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-5 (zu 5.6.8)



HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-5 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl. **A**: HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; S: Substrat. **B**: UV-Spektren von „S/N“. **C**: UV-Spektrum des Produktes

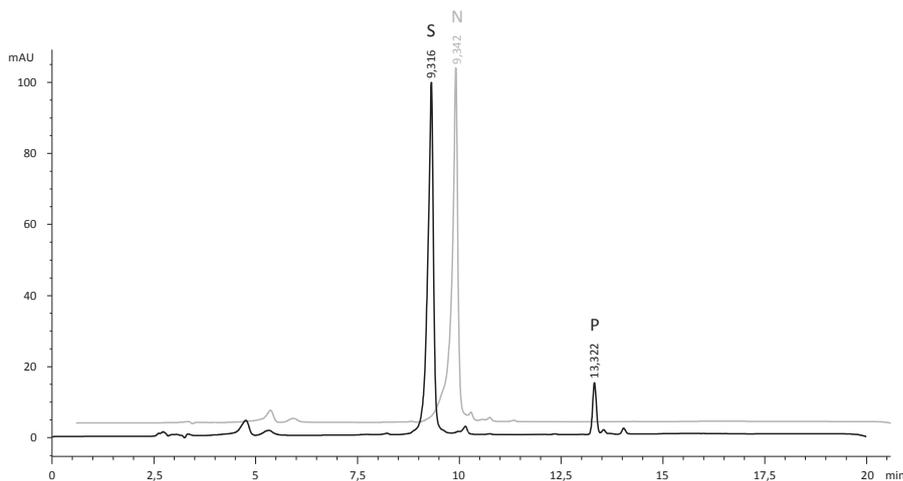
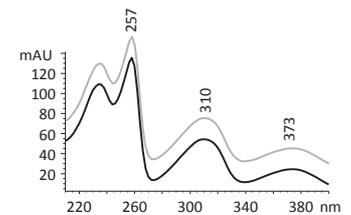
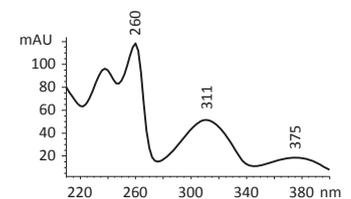
10.4.6. HPLC-Untersuchung der Enzymaktivität von HpPT-8 (zu 5.6.9)

10.4.6.1. Umsetzung von 1,3,6,7-THX

A

B

C

D


HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-8 mit 1,3,6,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; S: Substrat. **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum von „P1“. **D:** UV-Spektrum von „P2“

10.4.6.2. Umsetzung von 1,3,7-THX

A

B

C


HPLC-Untersuchung einer Standard-Inkubation von HpPT-8 mit 1,3,7-THX und DMAPP in TRIS-HCl. **A:** HPLC-Chromatogramm, HPLC-Methode 1, Detektion: $\lambda = 254$ nm. N: Negativkontrolle; P: monoprenyliertes Produkt; S: Substrat. **B:** UV-Spektren von „S/N“. **C:** UV-Spektrum des Produktes



