



Christian Bunzel (Autor)

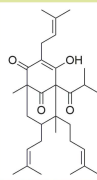
# Untersuchung von Polyketidsynthesen aus *Hypericum*-Arten, insbesondere Charakterisierung und Mutagenese einer neuartigen bifunktionellen Polyketidsynthase aus *Hypericum* *polyphyllum*



Technische  
Universität  
Braunschweig



Institut für Pharmazeutische Biologie  
pharmazie in braunschweig




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

Christian Bunzel



Cuvillier Verlag Göttingen  
Internationaler wissenschaftlicher Fachverlag

<https://cuvillier.de/de/shop/publications/8399>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany  
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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

---

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