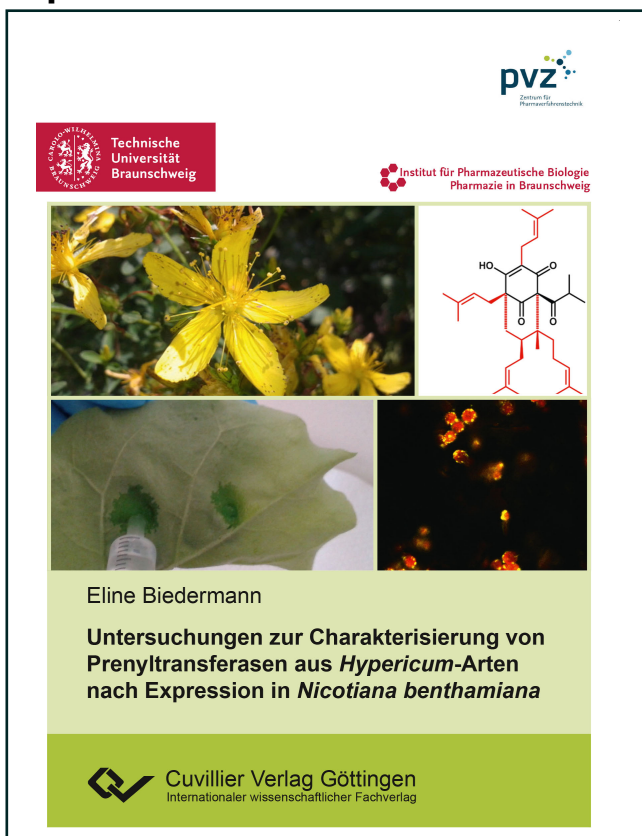




Eline Biedermann (Autor)
Untersuchungen zur Charakterisierung von Prenyltransferasen aus *Hypericum*-Arten nach Expression in *Nicotiana benthamiana*



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/7653>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>



1. Einleitung

1.1. Bedeutung und Nutzung von sekundären Pflanzenstoffen

Viele der mehr als 200.000 bisher bekannten sekundären Pflanzenstoffe werden heutzutage z.B. als Gewürze, Aromastoffe, Duftstoffe, Farbstoffe und Wirkstoffe in Lebensmitteln, Kosmetika oder Arzneimitteln verwendet. Pflanzen bilden diese Stoffe z.B. um Symbionten und Bestäuber anzulocken, Schädlinge abzuwehren oder sich vor abiotischen Umwelteinflüssen zu schützen (Hartmann und Ober, 2003). Das Vorkommen und der Gehalt der Sekundärstoffe sind oft abhängig von Pflanzenfamilie, Gattung und Art. Ferner variiert der Gehalt in Geweben, Entwicklungsstadien oder in Abhängigkeit von Umweltinteraktionen (Wink, 2015). Die Wirkung sekundärer Pflanzenstoffe wird bereits seit über Tausenden von Jahren genutzt. Schriftliche Aufzeichnungen wie das sogenannte „Papyrus Ebers“ (15 Jhd. v. Chr.) oder die *Materia medica* des griechischen Arztes Dioskurides (1. Jhd. n. Chr.) beschreiben mehrere hundert Pflanzen und deren Nutzen als Arzneimittel. So prägten diese Schriften über viele Jahrhunderte das Wissen um die Anwendung von Arzneipflanzen in der europäischen Heilkunde (Dias et al., 2012) (Anagnostou et al., 2016). Heutzutage werden pflanzliche Sekundärstoffe in Form von Tees oder Extrakten aus pflanzlichen Drogen oder in Form isolierter Substanzen verwendet. Außerdem dienen sekundäre Pflanzenstoffe als Leitstrukturen oder als Ausgangsstoffe für chemisch-synthetische Veränderungen (Hartmann und Ober, 2003) (Wink, 2015).

1.2. Gewinnung von Wirkstoffen aus Arzneipflanzen

Arznei- und Gewürzdrogen werden durch Wildsammlung oder kontrollierten Feldanbau gewonnen. Die Sammlung aus wilden Vorkommen unterliegt der *Convention on Biological Diversity (CBD)*, die 1992 von 168 Nationen auf der Konferenz von Rio unterzeichnet wurde (United Nations, 1992). Die Ziele dieses internationalen Umweltabkommens waren:

- a) der Schutz der Biodiversität
- b) die nachhaltige Nutzung der natürlichen Ressourcen
- c) das gemeinsame Nutzen und Teilen von Vorteilen und Wissen

Zudem wurden Richtlinien zur guten landwirtschaftlichen Praxis im Arzneipflanzenanbau (GAP = *Good Agricultural Practice*) erstellt (WHO, 2003) (EMA, 2006). Zukünftig sollen zum Schutz der natürlichen Ressourcen Wildsammlungen nach Möglichkeit durch Feldanbau geeigneter Arzneipflanzen ersetzt werden. Mittels Züchtung und Selektion werden dann Arzneipflanzen mit gewünschten pharmazeutischen (z.B. Wirkstoffspektrum und -gehalte), pflanzenbaulichen (z.B. Wachstum, Ertrag und Resistenzen) oder produktionstechnischen (z.B. Lagerungsfähigkeit) Eigenschaften kultiviert (Franz, 1999) (Atanasov et al., 2015).



<p><u>Pflanzenspezifische Faktoren:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Genetische Variabilität (Wirkstoffgehalt abhängig von Sorte, Mutation, Selektion) - Morphogenetische Variabilität (Wirkstoffgehalt abhängig von Pflanzenorgan) - Ontogenetische Variabilität (Wirkstoffgehalt abhängig vom Vegetationszyklus) 	<p><u>Umweltfaktoren:</u></p> <p>Geographische Lage, Klima, Bodenbeschaffenheit, Nährstoffverfügbarkeit, Mikroflora, Naturkatastrophen, Ackerbegleitflora, Schädlinge (Insekten, Mikroorganismen)</p>
<p><u>Gesellschaftliche Faktoren:</u></p> <p>Politisches Interesse, Länderspezifische Gesetze, Umweltschutz, Ressourcenschutz, Internationale Vorschriften und Exportbestimmungen (Rio de Janeiro, Brazil, 1992)</p>	<p><u>Anbau-, Ernte- und Verarbeitungsfaktoren:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - Sortenwahl, Standort, Fruchtfolge, Anbautermin, - Düngung, Herbizid- und Pestizideinsatz, - Verunreinigungen durch Beikräuter/Ackerbegleitflora, Rückstandsproblematik von Herbiziden und Pestiziden - Erntemethoden, Lagerung und Weiterverarbeitung - physikalischen oder chemischen Verfahren zur Verringerung der Keimzahl

Abbildung 1 Faktoren, welche die Qualität und Quantität beim Anbau von Arzneipflanzen beeinflussen (aus Franz, 1999 und Atanasov et al., 2015).

In Deutschland werden die meisten Arzneipflanzen importiert und nur auf ca. 13.000 Hektar wird ein kontrollierter Arzneipflanzenanbau betrieben (Hoppe und Plescher, 2016). Dabei wird die Qualität und Quantität der Arzneidrogen von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst (Abb. 1). Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich, wenn es sich um langsam wachsende Pflanzen handelt, der Gehalt an interessanten sekundären Pflanzenstoffen gering ist oder die Stoffe schwer extrahierbar sind (Smetanska, 2008). Insgesamt ist die Züchtung von Pflanzen mit gewünschten Eigenschaften sehr zeit-, arbeits- und kostenaufwändig. Ferner gibt es Arzneipflanzen, die aufgrund von notwendigen speziellen Wachstumsbedingungen nicht in Kultur genommen werden können. Beispielsweise benötigt der Sonnentau (*Drosera rotundifolia*) moorige Böden oder die Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens*) die harschen Bedingungen der Kalahari (Kaden, 2011).

Neben der klassischen Züchtung von Arzneipflanzen durch Selektion, natürliche Mutation oder gezielte Kreuzung finden gentechnisch veränderte Pflanzen als Produzenten therapeutischer Proteine Anwendung (Yao et al., 2015). Für die Gewinnung von sekundären Pflanzenstoffen spielen gentechnisch veränderte Pflanzen eine untergeordnete Rolle. Die Arbeit von Zhang et al. (2015) zeigt eine Möglichkeit transgene Tomatenpflanzen als Produzenten der Naturstoffe Genistein (aus Sojabohne) und Resveratrol (aus Wein) zu nutzen.

Außerdem gibt es bereits seit mehreren Jahrzehnten Bestrebungen Sekundärstoffe durch chemische Total- oder Partialsynthese zu gewinnen (Nicolaou et al., 2000). Allerdings besteht häufig das Problem, dass die chemischen Synthesen für sehr komplexe Zielstrukturen z.B. Morphin, Paclitaxel oder Hyperforin wegen ihrer stereochemischen Eigenschaften nicht wirtschaftlich genug oder sogar nicht möglich sind (Smetanska, 2008).



1.3. Homologe und heterologe *in vitro*-Systeme zur Produktion von pflanzlichen Wirkstoffen

In vitro-Systeme können eine Möglichkeit zur wirtschaftlichen Gewinnung von pflanzlichen Sekundärstoffen darstellen (Wilson und Roberts, 2012). Sie sind im Vergleich zum Feldanbau unabhängig von umweltbedingten und politisch-wirtschaftlichen Faktoren (Abb. 1), benötigen wenig Platz und können in kurzer Zeit kostengünstig den gewünschten Sekundärstoff produzieren (Diettrich, 1999) (Smetanska, 2008). Ebenso zeichnen sich die bisher erfolgreich etablierten *in vitro*-Systeme durch eine gleichbleibende Qualität auch in Bezug auf den gewünschten Sekundärstoffgehalt aus. Dabei ist es auch möglich, durch Selektion geeigneter Linien, Einbringen zusätzlicher Mutationen, Veränderung der Kulturbedingungen, Vergrößerung des Reaktorvolumens (Scale up), Automatisierung von Prozessen oder Zugabe von Elicitoren wie beispielsweise Methyljasmonat, Hefeextrakt oder von biosynthetischen Vorstufen die Produktivität der gewünschten Sekundärstoffe zu steigern (Verpoorte et al., 2002). Ferner wurden in einigen *in vitro*-Systemen auch Verbindungen detektiert, die in Feldpflanzen nicht gefunden wurden. Beispielsweise enthält *H. calycinum in vivo* kein Hypericin, Pseudohypericin oder Hyperforin (Stojanović et al., 2013), hingegen bilden *in vitro*-Zellsuspensionskulturen von *H. calycinum* Adhyperforin und geringe Mengen Hyperforin (Klingauf et al., 2005). Weshalb sich dennoch die Nutzung von *in vitro*-Systemen bislang im Vergleich zu Feldanbau oder Wildsammlungen noch nicht durchgesetzt hat, liegt im Wesentlichen an der geringen Ausbeute der gewünschten Sekundärstoffe. Bisweilen sind die benötigten Ausgangsverbindungen nur begrenzt verfügbar, ist die Transkription der beteiligten Gene zu gering, können die notwendigen Reaktionsbedingungen nicht gewährleistet werden oder es fehlen wichtige Cofaktoren für die Biosynthese (Diettrich, 1999).

Insgesamt gibt es nur wenige Sekundärstoffe, die sich homolog in Zell- oder Gewebekulturen (Suspensions-, Kallus-, Spross-, Wurzel-, *Hairy-root*-), mit guter Ausbeute, verglichen mit der Gewinnung aus Feldpflanzen, produzieren lassen (Tab. 1) (Nosov, 2012). Ein Problem homologer *in vitro*-Systeme, insbesondere von Kallus- und Suspensionskulturen, stellen somaklonale Variationen dar. Dabei kommt es im Laufe der Kultur zu genetischen Veränderungen im Vergleich zu der ursprünglichen Kultur bzw. Ausgangspflanze (Evans, 1989). Zudem findet manchmal keine Bildung des Sekundärstoffes in undifferenzierten Zellkulturen (Kallus-/Suspensionskulturen) statt, weshalb differenzierte Zellkulturen (z.B. Spross- oder Wurzelkulturen) verwendet werden (Pasqua et al., 2003).

Tabelle 1 Gehalte an Sekundärstoffen in *in vitro*-Zellkulturen oder Feldpflanzen (aus Smetanska, 2008 und Nosov, 2012).

Verbindung	Pflanze	Gehalt in % Trockengewicht		Industrielle Produktion
		<i>In vitro</i> Zellkultur	Feldpflanze	
Anthocyane	<i>Euphorbia milli</i>	4	0,3	Nippon Paint Company (Japan)
Berberin	<i>Thalictrum minus</i>	10	0,01	Mitsui Chemicals, Inc. (Japan)
	<i>Coptis japonica</i>	13	4	
Ginsenoside	<i>Panax ginseng</i>	27	4,5	Nitto Denko Corporation (Japan), CBN Biotech (Nordkorea)
Rosmarinsäure	<i>Coleus blumei</i>	27	3	A. Nattermann GmbH (Deutschland)
Shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1,5	Mitsui Chemicals, Inc. (Japan)



Industriell werden homologe Zellkulturen bereits zur Gewinnung z.B. von Berberin, Rosmarinsäure oder Paclitaxel genutzt (Diettrich 1999) (Nosov 2012). Paclitaxel kommt nur in geringen Mengen (ca. 0,01% des Trockengewichts) in der Rinde der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) vor. Dabei besteht ein hoher Bedarf an dieser Verbindung, die zur Behandlung verschiedener Krebsarten (Brust-, Eierstock- und Gebärmutterhalskrebs) als Zytostatikum unter dem Handelsnamen Taxol in Deutschland zugelassen ist (Schäfer, 2011). Die chemische Totalsynthese ist aufgrund der Komplexizität der Struktur und Bildung von toxischen Nebenprodukten nicht wirtschaftlich (Nicolaou et al., 1994) (Holton et al., 1994 a,b). Ebenso ist es bislang nicht gelungen Paclitaxel oder dessen Intermediate in ausreichender Menge heterolog in *E.coli*, *S. cerevisiae* oder *Arabidopsis thaliana* zu produzieren (Huang et al., 2001) (Besumbes et al., 2004) (DeJong et al., 2006). Ende der 80er Jahre wurde ein Verfahren etabliert, um Paclitaxel partialsynthetisch aus 10-Deacetylbaccatin III, das aus den Nadeln der Europäischen Eibe (*T. baccata*) isoliert werden kann, zu erhalten (Denis et al., 1988). In Deutschland werden große Mengen Paclitaxel standardisiert in Zellsuspensionskulturen von *T. brevifolia* hergestellt (phytonbiotech). Mit Hilfe von Methyljasmonat als Elicitor wird die Ausbeute an Paclitaxel in den Zellkulturen gesteigert (Yukimune et al., 1996).

Eine Produktion in heterologen Systemen findet statt, wenn der komplette Biosyntheseweg eines pflanzlichen Sekundärstoffes in einen anderen Wirtsorganismus übertragen wird. Als Wirtsorganismen kommen pro- und eukaryotische Mikroorganismen wie *E. coli* oder *S. cerevisiae*, aber auch pflanzliche oder tierische Systeme zur Anwendung (Luo et al., 2015). Dazu müssen die beteiligten Biosynthesegene zur Bildung des Sekundärstoffes bekannt sein, was häufig nicht der Fall ist. Außerdem besteht bei heterologen Systemen die Herausforderung darin, dass in Protein-kodierenden Genen verschiedener Organismen jeweils bevorzugte Codons für einzelne Aminosäuren genutzt werden (*Codon Usage*), was bei Transfer in ein heterologes Wirtssystem problematisch sein kann. Bei Auswahl eines Wirtsorganismus muss beachtet werden, dass manche Enzyme posttranslational modifiziert werden, die Enzyme nativ in speziellen Kompartimenten lokalisiert sein können oder mit anderen Proteinen interagieren. Zudem können modifizierte oder heterolog eingebrachte Gene bzw. die kodierten Enzyme den Stoffwechsel des Wirtsorganismus beeinflussen (Yesilirmak und Sayers, 2009). In prokaryotischen Systemen werden anders als in eukaryotischen Systemen kaum posttranslationale Modifikationen vollzogen. Zudem sind zum Teil wichtige subzelluläre Komponenten wie z.B. Chloroplasten nicht vorhanden. Weiterhin bilden sich in *E. coli* durch fehlerhafte oder unvollständige Faltung der Fremdproteine Einschlusskörper (intrazelluläre Aggregate), sogenannte „Inclusion bodies“, aus. Dieses kann bei heterologer Expression in *E. coli* zu Einschränkungen der Funktionalität oder gar zum Ausbleiben der Enzymaktivität der Fremdproteine führen (Fakruddin et al., 2012). Ferner müssen Wachstums- und Reaktionsbedingungen, Cofaktoren, Aktivatoren oder Hemmstoffe berücksichtigt werden (Diettrich, 1999). Zudem sind häufig auch Kenntnisse zu Transport und Speicherung der Zielverbindungen oder Intermediaten von Vorteil, um eine stabile Gewinnung und Steigerung der Produktion zu erreichen (Luo et al., 2015). In einigen Fällen werden die Sekundärstoffe aber auch nicht akkumuliert, sondern von den Zellen wieder abgebaut oder anderweitig im Metabolismus verwertet (Diettrich, 1999). Auch kann eine Akkumulation toxisch für die Zellen sein. Dies ist z.B. bei der Gewinnung von Vanillin mit Hilfe von Mikroorganismen zu beobachten (Priefert et al., 2001) (Hansen et al., 2009).



Ein Beispiel für die erfolgreiche Produktion eines pflanzlichen Naturstoffes in einem heterologen Expressionssystem stellt Artemisinin dar. Artemisinin ist im Einjährigen Beifuß (*Artemisia annua*) enthalten und wird bereits seit Jahrhunderten in der traditionellen chinesischen Medizin verwendet. Im Rahmen des Projektes „523“ wurde es als Mittel gegen Malaria beschrieben, wofür Youyou Tu 2015 den Nobelpreis erhielt (Tu, 2011) (Su und Miller, 2015). Trotz intensiver Züchtungsversuche ist der Gehalt an Artemisinin in Feldpflanzen gering und sehr variabel ($\leq 20 \mu\text{g}/\text{mg}$) (Graham et al., 2010). Zur effizienteren Gewinnung von Artemisinin wurde 2004 ein Artemisininprojekt gestartet. Ziel des Projektes war es Artemisinin bzw. die Vorstufe Artemisininsäure mittels Mikroorganismen in hoher Ausbeute und kostengünstig zu produzieren (Paddon und Keasling, 2014). Die Biosynthese von Artemisinin im Einjährigen Beifuß startet mit der Umsetzung von Glucose aus der Photosynthese zu Acetyl-CoA, welches in mehreren Schritten über Melavonat zu Farnesylpyrophosphat umgesetzt wird. Nach der Reaktion mit Amorphadiensynthase entsteht Amorphadien, woraus sich anschließend entweder Artemisininsäure oder Dihydroartemisininsäure bildet. Zum Schluss reagiert Dihydroartemisininsäure unter Lichteinfluss zu Artemisinin (Bertea et al., 2005). Zu Projektbeginn wurde die Biosynthese von Amorphadien in *E. coli* realisiert (Martin et al., 2003) (Tsuruta et al., 2009). Eine Gewinnung von Artemisininsäure gelang nicht, da sich das notwendige Cytochrom-P450-Enzym (CYP71AV1) aus *A. annua* in *E. coli* nicht funktionell exprimieren ließ. Hingegen gelang die Expression von CYP71AV1 in einem optimierten Hefestamm. Da *S. cerevisiae* den Mevalonatweg für die Biosynthese von Ergosterol nutzt, mussten für die Biosynthese der Farnesylpyrophosphate (FPP) keine Fremdgene eingeführt werden. Stattdessen wurde in die Regulation der FPP-Ergosterol-Biosynthese der Hefe eingegriffen, sodass FPP in ausreichender Menge für die Biosynthese von Amorphadien zur Verfügung stand. Mit Hilfe der Überexpression mehrerer Enzyme aus *A. annua* wie der Amorphadiensynthase (ADS), der Cytochrom-P450-Reduktase (CPR1), des Cytochrom b_5 (CYB5), der Artemisininaldehyddehydrogenase (ALDH1) und der Artemisininalkoholdehydrogenase (ADH1) wurde eine Produktion von 25 g/l Artemisininsäure realisiert (Ro et al., 2006) (Westfall et al., 2012) (Paddon et al., 2013). Nachfolgend führt eine photochemische Umwandlung der aufgereinigten Artemisininsäure zur Gewinnung von Artemisinin (Turconi et al., 2014).

Bei der Etablierung der Artemisininproduktion in Hefe wurde deutlich, dass es zunächst zwar wichtig ist den natürlichen Biosyntheseweg zu kennen und die einzelnen Schritte zu verstehen. Es zeigte sich aber auch, dass die Produktion von mehreren Faktoren und Interaktionen abhängig ist. So wurde beispielsweise im Laufe des Projektes beobachtet, dass die transferierten Gene und deren Produkte inhibierend auf das Wachstum des Wirtsorganismus wirken, da sie einen Einfluss auf Prozesse des Primärstoffwechsels haben. Weiterhin war eine Optimierung der Wirtsstämme und des Fermentationsprozess nötig. Die Nutzung codon-optimierter Gene war für die wirtschaftliche Produktion ebenfalls entscheidend (Paddon und Keasling, 2014).

Der Einsatz des heterologen Systems zur Artemisinin-Produktion zeigt, ebenso wie die Gewinnung von Paclitaxel durch ein homologes System, dass es prinzipiell möglich ist hohe Mengen an Sekundärstoffen *in vitro* zu erhalten. Das wachsende Wissen über Biosynthesegene und Biosynthesemechanismen in Pflanzen sowie die Optimierung der Kulturbedingungen wird zukünftig sicherlich die Produktion weiterer Sekundärstoffe in *in vitro*-Systemen erlauben. Wobei für jedes System und jeden Biosyntheseweg jeweils individuell die Stellschrauben zur Steigerung der Ausbeute gefunden werden müssen.



1.4. Johanniskraut als moderne Arzneipflanze

1.4.1. Inhaltsstoffe und Bedeutung im Arzneischatz

Das um den Johannistag am 24. Juni leuchtend gelb blühende Echte Johanniskraut (*Hypericum perforatum* L., Hypericaceae) wächst weltweit in den gemäßigten Zonen (Robson, 2003) und wird bereits seit der Antike als Arzneipflanze medizinisch verwendet (Czygan, 2003) (Istikoglou et al., 2010). Insgesamt sind ca. 500 *Hypericum*-Arten bekannt (Nürk et al., 2013), die aber bislang nicht pharmazeutisch genutzt werden (Stojanovic et al., 2013). Zu den wichtigsten Inhaltsstoffen in *Hypericum*-Arten, zählen Naphthodianthrone (z.B. Hypericin, Pseudohypericin), Phloroglucinole (z.B. Hyperforin, Adhyperforin), Xanthone (z.B. 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon, Mangiferin), Flavonoide und ätherische Öle (Nahrstedt und Butterweck, 1997) (Richard, 2014). Der Gehalt an diesen Inhaltsstoffen kann abhängig von der Population, der Entwicklung der Pflanzen, den Umweltbedingungen oder dem Standort variieren (Büter et al., 1998) (Tekel'ová et al., 2000).

In Deutschland wird der standardisierte Gesamtextrakt von *H. perforatum* zur Behandlung von leichter bis mittelschwerer Depression genutzt. Die antidepressive Wirksamkeit ist durch klinische Studien belegt (Linde et al., 2008). Die Droge ist im Europäischen Arzneibuch monographiert (Ph. Eur. 8.0/1438: Johanniskraut – „Hyperici herba“). Bislang wurde noch nicht abschließend geklärt, ob ein einzelner Inhaltsstoff oder die Interaktion mehrerer Inhaltsstoffe für die antidepressive Wirkung von Bedeutung ist. Aus diesem Grund wird der Gesamtextrakt als Wirkstoff angesehen (Butterweck und Schmidt, 2007). Das polyprenylierte Acylphloroglucinolderivat Hyperforin spielt nach den aktuellen Kenntnissen eine wichtige Rolle für die antidepressive Wirkung. Hyperforin wirkt unselektiv auf die synaptosomale Wiederaufnahme einiger Neurotransmitter wie Serotonin, Dopamin, Noradrenalin, Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) (Chatterjee et al., 1998). Anders als synthetische Wiederaufnahmehemmer hemmt Hyperforin nicht den Neurotransmitter-Transporter. Stattdessen aktiviert Hyperforin den nichtselektiven Kationenkanal TRPC6 (*transient receptor potential channel*) (Leuner et al., 2007). Diese Aktivierung von TRPC6 führt zum Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Zelle. Daraus resultiert eine Verringerung des transmembranären Natrium-Gradienten, der die Wiederaufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt antreibt. So wird die Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt erhöht (Müller, 2003) (Leuner et al., 2007). Die Aktivierung von TRPC6 könnte auch zur hemmenden Wirkung von Hyperforin auf die Proliferation von Keratinozyten beitragen, die in Deutschland zur Therapie der Neurodermitis genutzt wird (Müller et al., 2008). Zudem werden Hyperforin weitere pharmazeutisch relevante Wirkungen zugeschrieben (Richard, 2014) (Tab. 2).

Tabelle 2 Pharmakologische Wirkungen von Hyperforin

Wirkung von Hyperforin	Referenzen
antidepressiv	Chatterjee et al., 1998, Linde et al., 2008 (Cochrane-Studie)
antiplasmodial	Verotta et al., 2007
antibakteriell	Schempp et al., 1999, Schiavone et al., 2013
antitumoral	Schempp et al., 2002, Hostanska et al., 2003, Wiechmann et al., 2015
antientzündlich	Albert et al., 2002



Hyperforin liegt in *H. perforatum* im ätherischen Öl in den durchscheinenden schizogenen Ölbehältern der Blätter und Öl-Kanälen der Blüten sowie Früchte vor (Cicarelli et al., 2001) (Soelberg et al., 2007). Der Gehalt steigt während der Entwicklung der Pflanze von 2,5 % DW in Knospen bis zu einem maximalen Gehalt von 8,5 % DW in unreifen Früchten an (Tekel'ová et al., 2000). Die Verbindung dient der Pflanze vermutlich zum Schutz gegen Fraßfeinde. Zur Gewinnung des verwendeten Gesamtextrakts aus Knospen und Blüten erfolgt die Kultivierung von Johanniskraut im Feldanbau. Dabei sind die Pflanzen verschiedenen Umweltfaktoren ausgesetzt, die einen Einfluss auf Qualität und Ertrag haben (Abb. 1). Dazu zählen im Speziellen auch Erkrankungen wie die Rotwelke (Erreger: *Colletotrichum gloeosporioides*) (Gärber und Schenk, 2002) oder Schädlinge wie der Johanniskraut-Blattkäfer (*Chrysolina hyperici*) (Morrison et al., 1998), aber auch Verunreinigungen mit unerwünschten, zum Teil gesundheitsschädlichen Beikräutern (PZ 2016a, b).

1.4.2. Ansätze zur Gewinnung von Hyperforin

Hyperforin wurde erstmals 1975 von Bystrov et al. isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt. Ein grundsätzliches Problem bei der Gewinnung von Hyperforin liegt in seiner hohen Sensitivität gegenüber Sauerstoff, Licht, hoher Temperatur und apolaren Lösungsmitteln. Die Verwendung als Dicyclohexylamin (DCHA)-Salz kann zu einer Stabilisierung von Hyperforin führen (Chatterjee et al., 2002). Die Totalsynthese von Hyperforin ist sehr komplex, aufwendig und deshalb bisher nicht wirtschaftlich (Richard, 2014) (Ting und Maimone, 2015). Zur Gewinnung von Hyperforin und weiterer interessanter Verbindungen aus *Hypericum*-Arten mit pharmazeutischem Potenzial wurden bereits erfolgreich *in vitro*-Zell-, Spross- oder Wurzelkulturen eingesetzt (Gaid et al., 2017a, b). Der Zusatz von Elicitoren kann die Bildung der sekundären Pflanzenstoffe steigern (Namdeo, 2007) (Shakya et al., 2017). In einer Zellkultur von *H. calycinum* wurden hauptsächlich Adhyperforin (0,25 mg/g DW) und geringe Mengen Hyperforin gefunden (Klingauf et al., 2005). Hierbei führte die Zugabe von 100 µmol/l Methyljasmonat oder 100 µmol/l Jasmonoyl-Isoleucin als Elicitor nicht zu einer Steigerung der Hyperforinbildung. Dies war auch bei anderen *Hypericum*-Arten (*H. androsaemum*, *H. gnidoides* und *H. perforatum*) zu beobachten (Klingauf et al., 2005). Nach Zugabe von 3 g/l Hefeextrakt als Elicitor wurde eine Steigerung der Xanthonbildung in einer Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* beobachtet (Fiesel et al., 2015). Dies deutet auf eine mögliche Rolle der Xanthone in der pflanzlichen Abwehr hin. In einer Sprosskultur von *H. perforatum* wurde unter Zugabe von 1 mg/l Methyljasmonat zusammen mit 30 g/l Saccharose eine relativ hohe Menge Hyperforin (13,5 mg/g DW) erhalten (Pavlik et al., 2007). Aus Auxin-induzierten Wurzelkulturen wurden 5 mg/g DW Hyperforin isoliert (Gaid et al., 2016). Cui et al. (2010) stellten eine Methode vor, bei welcher Adventivwurzeln von *H. perforatum* zur Produktion von Hypericin verwendet wurden. Bei Produktion in einem 500-Liter Bioreaktor wurde eine Ausbeute von 0,04 mg/g DW Hypericin erhalten (Cui et al., 2014). Eine Steigerung der Ausbeute an Hypericin (1,61 mg/g DW) wurde durch Zugabe von 350 µM Methyljasmonat erreicht (Wu et al., 2014). In einer Sprosskultur von *H. perforatum* wurde bei Zugabe von 1-5 mM L-Valin (als Vorstufe für Hyperforin) nur eine geringe, nicht signifikante Steigerung des Hyperforingehaltes im Vergleich zur unbehandelten Kultur gefunden (Kappinnen et al., 2007). Dies deutete daraufhin, dass Valin in der Kultur nicht der limitierende Faktor für die Biosynthese von Hyperforin ist.



1.4.3. Biosynthese von Hyperforin

Die Kenntnis des Biosyntheseweges von Hyperforin ist notwendig, um diesen in heterologe Systeme einbringen zu können. Bisher ist der Biosyntheseweg von Hyperforin nicht vollständig bekannt. Die Grundstruktur Phlorisobutyrophenon wird über den Polyketidweg gebildet, indem Isobutyryl-CoA sequenziell mit drei Malonyl-CoA kondensiert und es dann zu einer Zyklisierung mittels Claisen-Esterkondensation kommt. Klingauf et al. (2005) wies diese Reaktion im zellfreien Extrakt (Überstand nach 12.000 x g Zentrifugation) einer Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* nach. Zudem zeigte Adam et al. (2002) mit Hilfe von markierter Glukose, dass Isobutyryl-CoA aus Valin gebildet wird und dass die Isopren-einheiten aus dem Methylerythritolphosphat-Weg der Plastiden stammen. In den nachfolgenden Schritten wird Phlorisobutyrophenon mehrfach mit Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Geranylpyrophosphat (GPP) prenyliert (Abb. 2). Abschließend findet ein intramolekularer Ringschluss durch eine elektrophile Substitutionsreaktion an der Doppelbindung des aromatischen Akzeptormoleküles (Friedel-Crafts-Reaktion) statt, wodurch ein zweiter Ring ausgebildet wird (Abb. 2) (Beerhues, 2006). Das Enzym, welches den Ringschluss katalysiert ist ebenfalls noch unbekannt.

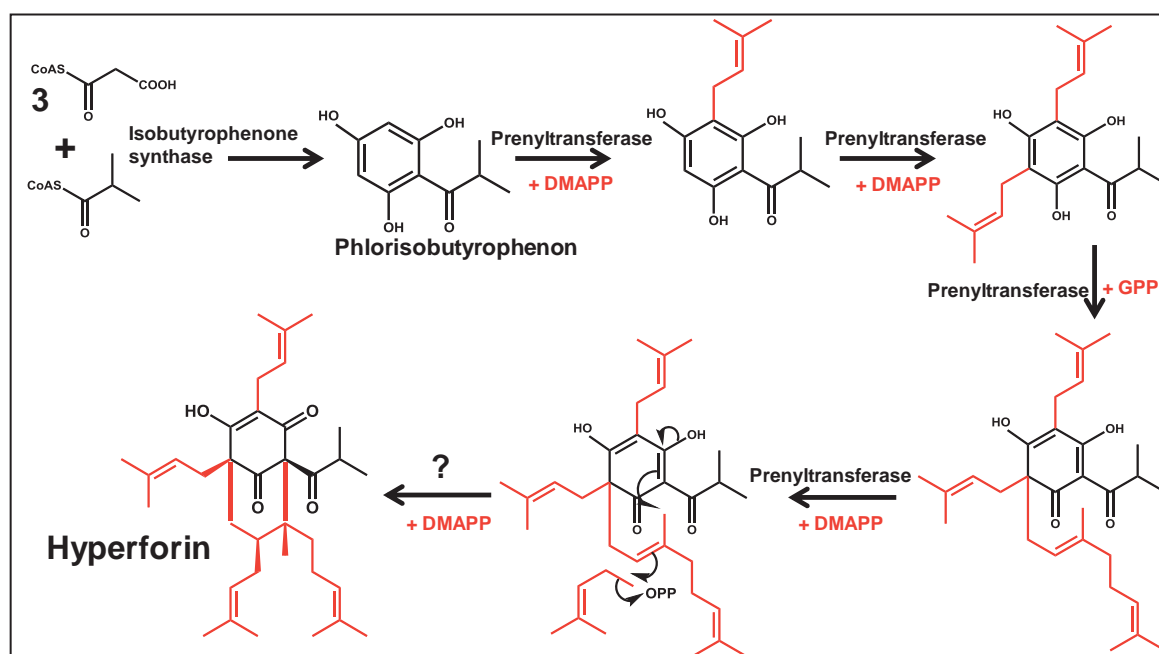


Abbildung 2 Biosyntheseweg von Hyperforin nach Beerhues (2006). Die Grundstruktur Phlorisobutyrophenon wird schrittweise durch Prenyltransferasen prenyliert. GPP (Geranylpyrophosphat), DMAPP (Dimethylallylpyrophosphat)

Neben Hyperforin und Adhyperforin finden sich in *Hypericum*-Arten noch andere prenylierte Verbindungen wie z.B. 1,3,6,7-Tetrahydroxy-8-prenylxanthon, das eine vermutliche Zwischenverbindung für Hyperxanthon E darstellt (Fiesel et al., 2015). Eine erste mögliche Prenylierungsreaktion von Phlorisobutyrophenon mit DMAPP wurde in Zellkulturen von *H. calycinum* ermittelt. Dabei wurde nach Extraktion und Zentrifugation bei 100.000 x g für 30 min mit dem Überstand gearbeitet, sodass in dieser Arbeit davon ausgegangen wurde, dass eine lösliche und Fe²⁺-abhängige Prenyltransferase beteiligt ist (Boubakir et al., 2005). Müller (2013) isolierte zwei cDNAs einer Zellsuspensionskultur von *H. calycinum* und eine cDNA aus Blüten von *H. perforatum* mit Sequenzähnlichkeit zu membrangebundenen Prenyltransferase-cDNAs aus anderen Pflanzen. Die Charakterisierung dieser und weiterer cDNAs und der codierten Enzyme erfolgte erst bei Fiesel (2016) und im Rahmen dieser Arbeit.



1.5. Prenylierende Enzyme in Pflanzen

Prenylierte Verbindungen finden sich bei Pflanzen zum Einen im Primärstoffwechsel, z.B. Ubichinon, Plastochinon, Vitamin E (Tocopherol) oder Vitamin K2 (Menachinon), und zum Anderen im Sekundärstoffwechsel, z.B. unter den Flavonoiden (Borra et al., 2005), Cumarinen (Devji et al., 2011), Chalconen (Miranda et al., 2000) und Xanthonen (Pinto et al., 2005) (Genovese et al., 2016). Dabei haben prenylierte Verbindungen häufig eine stärkere Wirkung als die unprenylierten Verbindungen (Alhassan et al., 2014). Die Erhöhung der biologischen Aktivität der prenylierten Verbindungen wird auf das Einführen der lipophilen Struktur zurückgeführt, was zu einer verbesserten Interaktion mit der Biomembran führt und die erhöhte Affinität zu möglichen Zielproteinen erklären könnte (Botta et al., 2005). Die Anlagerung eines Prenylrestes wird von prenylierenden Enzymen katalysiert, die nicht nur in Pflanzen, sondern in allen Organismen vertreten sind (Heide, 2009). Sie verknüpfen Isopreneinheiten miteinander, zyklisieren Isoprenoide (Terpenzyklasen) und katalysieren die Anlagerung von Isopreneinheiten an Akzeptormoleküle (Prenyltransferasen). Die notwendigen Isopreneinheiten (C5) Isopentenylpyrophosphat (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) entstehen aus dem Mevalonsäure-Weg im Cytoplasma oder dem Methylerythritolphosphat-Weg in den Plastiden. Neben diesen beiden Isopreneinheiten stehen noch deren Kondensationsprodukte Geranylpyrophosphat (GPP, C10), Farnesylpyrophosphat (FPP, C15) oder Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP, C20) zur Verfügung. Die Prenyltransferasen werden je nach Prenylakzeptor in unterschiedliche Gruppen klassifiziert (Winkelblech et al., 2015).

Isoprenyldiphosphatsynthasen (IPPS) sind an der mehrstufigen Kettenverlängerung von DMAPP mit einzelnen Isopreneinheiten zur Bildung einer Vielzahl von Terpenoiden beteiligt. Aufgrund der Konfiguration der Isopreneinheiten bei der Verknüpfung der Produkte wird zwischen cis- und trans- Prenyltransferasen unterschieden (Liang et al., 2002). Trans-Prenyltransferasen sind immer abhängig von Mg^{2+} , besitzen zwei aspartatreiche Motive und bestehen aus α -Helices. Ein Beispiel ist die Farnesyldiphosphat-Synthase, welche die Bildung von Farnesylpyrophosphat katalysiert (Poulter et al., 2006). Cis-Prenyltransferasen sind ebenfalls Mg^{2+} abhängig, besitzen aber kein aspartatreiches Motiv (Guo et al., 2005). Die erste cis-Prenyltransferase, die charakterisiert wurde, ist die Undecaprenyldiphosphat-Synthase, die an der bakteriellen Zellwandsynthese beteiligt ist (Allen, 1985) (Teng und Liang, 2012).

Protein-Prenyltransferasen sind an der posttranslationalen Modifikation von Proteinen in Eukaryoten beteiligt. Sie katalysieren den Transfer von Farnesylpyrophosphat (FTase) oder Geranylgeranylpyrophosphat (GGTase) auf einen Cystein-Rest (CaaX-Motiv) am C-Terminus, sodass die prenylierten Proteine mit Hilfe der hydrophoben Isoprenoidreste eine Interaktion mit der Membran oder eine Protein-Protein-Wechselwirkung eingehen können (Maurer-Stroh et al., 2003).



Aromatische Prenyltransferasen katalysieren die Übertragung eines Isoprenrestes auf ein aromatisches Akzeptormolekül (Yazaki et al., 2009). Diese Enzymgruppe umfasst sowohl membrangebundene als auch lösliche Proteine. Lösliche Prenyltransferasen finden sich in Pilzen und Bakterien (Saleh et al., 2009) (Metzger et al., 2009). Beispiele hierfür sind CloQ (Pojer et al., 2003), NphB (Yang et al., 2012), Fng26 (Haagen et al., 2007) oder pilzliche Indolprenyltransferasen (Tello et al., 2008). Charakteristisch für die löslichen Prenyltransferasen ist ihre α - β - β - α -Struktur und das Fehlen des aspartatreichen Motives. Zum Teil besteht eine Mg^{2+} -Abhängigkeit (Li, 2009). Die membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen katalysieren nur C-Prenylierungen und sind im Primärstoffwechsel beispielsweise an der Bildung von Ubichinon (UbiA aus *E.coli*, Melzer und Heide, 1994) (Bräuer et al., 2008) (AtPPT1 aus *A. thaliana*, Okada et al., 2004) (OsPPT1 aus *O. sativa*, Ohara et al., 2006), Plastochinon oder Vitamin E (Tocopherol) Tocochromanol (Venkatesh et al., 2006) (Sadre et al., 2006) (Yang et al., 2011) beteiligt. Im Sekundärstoffwechsel katalysieren sie die Übertragung eines Prenylrest (von DMAPP oder GPP) auf aromatische Akzeptormoleküle wie Flavonoide, Cumarine, Xanthone und Acylphloroglucinol (Tab. 3) für die Bildung der Zielverbindung oder eines Zwischenproduktes wie z.B. bei der Biosynthese des zyklisch-aromatischen Kohlenstoffgerüst der Furano- und Pyranocumarine (Karamat et al., 2014). Bislang wurden nur wenige molekularbiologische Untersuchungen von membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen des Sekundärstoffwechsels in Pflanzen durchgeführt. Die bisher publizierten Prenyltransferasen wurden in Pflanzen aus den Familien Fabaceae, Cannabaceae, Moraceae, Boraginaceae, Rutaceae oder Apiaceae identifiziert (Tab. 3). Die cDNAs dieser Prenyltransferasen wurden kloniert und heterolog in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*), Sf9-Insektenzellen (*Spodoptera frugiperda*) oder Tabak (*Nicotiana benthamiana*) exprimiert und charakterisiert. Diese Prenyltransferasen weisen folgende typische Charakteristika auf (Yazaki et al., 2009):

- zwei aspartatreiche konservierte Motive (N(Q/E)xxDxxxD) und (KD(I/L)xDx(E/D)GD),
- Abhängigkeit von einem divalenten Kation, meist Mg^{2+} ,
- mehrere Transmembranhelices,
- N-terminales Transitpeptid und Lokalisation in/ an den Plastiden,
- hohe Spezifität gegenüber Prenyldonoren,
- enges Spektrum der Prenylakzeptoren.

Für die membrangebundenen Enzyme ist eine Isolation zur Ermittlung der Struktur schwierig, sodass nur Strukturmodelle von UbiA aus *E. coli* (Bräuer et al., 2008) und LePGT1 aus *Lithospermum erythrorhizon* (Ohara et al., 2009) vorhanden sind, die durch Mutationsexperimente unterstützt wurden. Die 4-Hydroxybenzoesäure-Geranyltransferase LePGT1 katalysiert einen Schritt der Shikonin-Biosynthese und ist anders als die anderen membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Neben LePGT1 wurde nur für CIPT1 aus *Citrus limon* (Munakat et al., 2014) und CsPT1 aus *Cannabis sativa* (Page und Boubakir, 2014) eine Reaktion mit dem Prenyldonor GPP beschrieben. Die anderen publizierten membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen aus Pflanzen nutzen DMAPP (Tab. 3).